บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1. การเตรียมสาร

3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1.1 Luria-Bertani medium (LB)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ ปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{0}ซ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^{2} นาน 15 นาที

3.1.1.2 อาหารสูตรปรับต่ำ (minimum medium)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

$(NH_4)_2SO_4$	1.3	กรัม
K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

yeast extract	0.1	กรัม
olive oil	10.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ ปรับ pH เป็น 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร แล้วเติม olive oil จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารแข็ง (minimum medium agar plate) ให้เติม Bactoagar 15 กรัม ใน minimum medium จำนวน 1 ลิตร

3.1.2 การเตรียมสารในการหาแอคติวิตีของไลเปส

3.1.2.1 การเตรียมอีมัลชันของสับสเตรท (1.5% olive oil emulsion)

ดัดแปลงจากวิธีของ Sugihara และคณะ (1991) ในสารละลายประกอบด้วย

1% (w/v) gum arabic solution	300	มล.
1 M NaCl	30	มล.
2% (w/v) $CaCl_2$	7	มล.

ผสมทั้ง 3 ส่วนให้เข้ากันดีแล้วเติม olive oil 1.5 มล. ต่อ ส่วนผสม 100 มล. แล้ว ปั่นด้วยเครื่องปั่น moulinex ความเร็วสูงสุดนาน 5 นาที

3.1.2.2 การเตรียม 0.05 M Acetate buffer , pH 5.0-5.5

-0.05 M Sodium acetate

ละลาย CH_3COONa 2.051 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

-0.05 M Acetic acid

ผสมกรดอะซิติก 1.43 มล.ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล.

ในกรณีที่จะเตรียมบัฟเฟอร์ pH 5.0 ผสมสารละลายกรดอะซิติกกับสารละลายโซเดียมอะซิเตทในอัตราส่วน 50:86.9 มล.

ในกรณีที่จะเตรียมบัฟเฟอร์ pH 5.5 ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วน 20:109.9 มล.

3.1.2.3 การเตรียม 0.05 M Potassium phosphate buffer, pH 6.0-7.5

-0.05 M K_2HPO_4

ละลาย K_2HPO_4 4.3545 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

-0.05 M KH_2PO_4

ละลาย KH_2PO_4 3.4022 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

ในกรณีเตรียมบัฟเฟอร์ pH 6.0 ผสม 0.05 M K_2HPO_4:0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 13.04:89.96 มล.

ในกรณีเตรียมบัฟเฟอร์ pH 6.5 ผสม 0.05 M K_2HPO_4:0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 32.43:67.57 มล.

ในกรณีเตรียมบัฟเฟอร์ pH 7.0 ผสม 0.05 M K_2HPO_4:0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 60.16:39.84 มล.

ในกรณีเตรียมบัฟเฟอร์ pH 7.5 ผสม 0.05 M K_2HPO_4:0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 82.73:17.27 มล.

3.1.2.4 การเตรียม 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0

ละลายทริส 1.212 กรัมในน้ำ 100 มล. นำสารละลายนี้มา 50 มล.แล้วปรับ pH ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

3.1.3 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford,1976)

3.1.3.1 สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 มก. ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 50 มล. เติม 85% กรดฟอสฟอริกปริมาตร 100 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.3.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (1 มก./มล.)

ละลาย Bovine serum albumin 10 มก.ในน้ำกลั่น 10 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20^{0}ซ

3.1.4 การเตรียมสารละลายสำหรับเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส

3.1.4.1 สารละลายอะไครลาไมด์ (สารละลาย A)(30 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์, 0.8 เปอร์เซนต์บิส-อะไครลาไมด์)

นำอะไครลาไมด์ 29.2 กรัมและบิส-อะไครลาไมด์ 0.8 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ

3.1.4.2 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 8.8 เข้มข้น 2 โมลาร์

ชั่งทริส 24.2 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มล. ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

3.1.4.3 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 6.8 เข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งทริส 12.1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มล. ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

3.1.4.4 สารละลาย 10 เปอร์เซนต์เอสดีเอส

ละลายเอสดีเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล.

3.1.4.5 สารละลาย 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล

ผสม 50 มล.กลีเซอรอลเข้มข้น 100 เปอร์เซนต์กับน้ำกลั่น 50 มล.

3.1.4.6 สารละลาย 1 เปอร์เซนต์โบรโมฟีนอลบลู

ละลายโบรโมฟีนอลบลู 100 มก.ในน้ำกลั่น 10 มล.

3.1.4.7 สารละลายทริส-ไกลซีน อีเลคโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3

ชั่งทริส 3.0 กรัม เอสดีเอส 1.0 กรัม ไกลซีน 14.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 900 มล.ปรับ pH เป็น 8.3 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.1.4.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลาย 0.1 กรัมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตในน้ำกลั่น 1.0 มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้

3.1.4.9 สารละลายสำหรับ separating gel (สารละลาย B)

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 8.8	75 มล.
สารละลาย 10 เปอร์เซนต์เอสดีเอส	4 มล.
น้ำกลั่น	21 มล.

3.1.4.10 สารละลายสำหรับ stacking gel (สารละลาย C)

สารละลายทริส-ไฮโดรคลอริก pH 6.8	50 มล.
สารละลาย 10 เปอร์เซนต์เอสดีเอส	4 มล.
น้ำกลั่น	46 มล.

3.1.4.11 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (Sample buffer)

สารละลายทริสไฮโดรคลอริก pH 6.8	0.6 มล.

สารละลาย 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล	5.0 มล.
สารละลาย 10 เปอร์เซนต์เอสดีเอส	2.0 มล.
2-mercaptoethanol	0.5 มล.
สารละลาย 1 เปอร์เซนต์โบรโมฟีนอลบลู	1.0 มล.
น้ำกลั่น	0.9 มล.

3.1.4.12 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

ละลาย Coomassie Blue R-250 1 กรัมในเมทิลแอลกอฮอล์ 450 มล. เติมกรดอะซิติก 100 มล.และน้ำกลั่น 450 มล.

3.1.4.13 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

ผสมเมทิลแอลกอฮอล์ 100 มล.กับกรดอะซิติก 100 มล.เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เก็บใน LB ในหลอดที่มีฝาเกลียวปิดและปิดทับด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่ -20^{0}ซ เมื่อต้องการใช้เชื้อในการทดลองให้นำมาเลี้ยงบน minimum medium agar plate ใหม่

3.3. การเลี้ยงเชื้อและการติดตามการเจริญของเชื้อ

3.3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum)

เขี่ยเชื้อในอาหารวุ้น 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37^{0}ซ ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 15 ชม.

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.3.1 ปริมาตร 7.5 มล. ลงในขวดรูปกรวยที่มีอาหารสูตรปรับต่ำปริมาตร 250 มล. นำมาเขย่าต่อที่ 37°ซ

3.3.3 การติดตามการเจริญของเชื้อ

เทน้ำเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.3.2 ประมาณ 5 มล. ที่เวลาต่างๆออกมาวัดการเจริญ(ความขุ่น) ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic 20D)

3.4. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

3.4.1 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.3 โดยมีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ได้แก่ peptone, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ หรือ $(NH_4)_2HPO_4$ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งไนโตรเจน 0.13% (w/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.3 โดยมีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันได้แก่ olive oil, กลูโคส, กาแลคโตส, ฟรุกโตส, มอลโตส หรือ ซูโครส ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งคาร์บอน 1% (w/v หรือ v/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม แล้วหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไลเปส โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.4.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 โดยเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33, 37 และ 40^{0}ซ

3.5. การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล.กับอีมัลชันของสับสเตรท 15 มล.และบัฟเฟอร์ 5 มล.ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ เขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 95% เอทิลแอลกอฮอล์(ซึ่งมีฟีนอล์พทาลีนละลายอยู่ในสัดส่วน 0.43%) 20มล. แล้วนำไปไตเตรทกับ 0.05 M KOH จนฟีนอล์พทาลีนเปลี่ยนเป็นสีชมพู เพื่อหาปริมาณกรดไขมันที่ถูกปลดปล่อยออกมาเนื่องจากการย่อยน้ำมันมะกอก

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของกรดไขมัน(fatty acid)ที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกที่ 37^{0}ซ ในเวลา 30 นาที ในภาวะที่ทำการทดลองโดยคิดเป็นไมโครโมลของกรดไขมัน

3.6. การวัดปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล.ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีน 0-15 ไมโครกรัม

3.7. ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์และการทำให้บริสุทธิ์

ในการเตรียมเอนไซม์ปริมาณมาก เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 3.3 ในภาวะที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.4. หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที ที่ 4^{0}ซ นาน 30 นาทีแยกเก็บส่วนน้ำใส เรียกส่วนนี้ว่า crude enzyme นำไปเก็บไว้ที่ 4^{0}ซ เพื่อจะนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.7.1 การทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน

กรอง crude enzyme ผ่านอุลตราฟิลเตรชันยูนิตซึ่งใช้แผ่นกรอง(membrane)เบอร์ YM10 ซึ่งกรองโมเลกุลที่มีขนาด 10,000 ดาลตันขึ้นไป โดยมีแก๊สไนโตรเจนช่วยดันที่ความดัน 55 psi กรองจนเหลือปริมาตรประมาณ 40 มล.เก็บสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่เหลือนี้ไว้ที่ -20^{0}ซ เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.7.2 การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

3.7.2.1 การเตรียมคอลัมน์

แช่ Sephadex G-100 ซึ่งแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 4,000-150,000 ดาลตัน ปริมาณ 20 กรัม ใน 0.05 M Potassium phosphate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 600 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. หรือนำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 3 ชม. เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.0x55 ซม. ให้ได้เจลสูง 50 ซม. ผ่านสารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 6.0 อีกประมาณ 15 ชม.ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเด็กซแทรน 4 มก./มล. และโปแทสเซียมไดโครเมต 1 มก./มล.

3.7.2.2 การใช้คอลัมน์

ผ่านสารละลายเอนไซม์เข้มข้นปริมาตร 3 มล.ลงในคอลัมน์ที่ 25^{0}ซ เก็บสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 5 มล.ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของไลเปส แล้วนำหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์มารวมกันเพื่อนำไปใช้ต่อไป

3.7.3 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยวิธีไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization)

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.7.2.2 ใส่ในหลอดทนความเย็น แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°ซ ข้ามคืน นำหลอดบรรจุสารละลายแช่แข็งนี้ไปใส่ในขวด (freeze-drying flask) เพื่อนำไปต่อเข้ากับตัวเครื่อง (freeze-dryer) ซึ่งมีอุณหภูมิ -50°ซ จากนั้นเปิดปั๊มสูญญากาศจนภายนอกของ freeze-drying flask อุ่นขึ้นจนเท่าอุณหภูมิห้อง จึงจะแสดงว่ากระบวนการเสร็จสิ้น นำผงเอนไซม์ที่ได้มารวมกันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.7.4 การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ Phenyl-Sepharose CL-4B

3.7.4.1 การเตรียมคอลัมน์

นำ Phenyl-Sepharose CL-4B ซึ่งแช่อยู่ในเอทธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 20 เปอร์เซนต์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 10 ปริมาตร แล้วนำส่วนเจลมาแช่ใน binding buffer คือ 0.05M Potassium phosphate buffer, pH 6.0 ที่มี 1.7M $(NH_4)_2SO_4$ จากนั้นนำไป de-gas แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.0x30 ซม. ให้ได้เจลสูง 25 ซม. แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ต่ออีก 3 ปริมาตร

3.7.4.2 การใช้คอลัมน์

ละลายเอนไซม์ปริมาณ 1 มก. ใน binding buffer แล้วผ่านสารละลายเอนไซม์ลงไปในคอลัมน์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย linear gradient ของ $(NH_4)_2SO_4$ จากความเข้มข้น 1.7-0 โมลาร์ เก็บสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 10 มล.ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของไลเปส

3.8. การทำเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น

3.8.1 การเตรียมเจล (สำหรับเจล 2 แผ่น)

เตรียม 12.5% separating gel โดยผสมสารละลายดังนี้

สารละลาย A 8.34 มล.

สารละลาย B	5.0	มล.
น้ำกลั่น	6.66	มล.
สารละลาย 10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	100	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร

เตรียม stacking gel ผสมสารละลายดังนี้

สารละลาย A	1.34	มล.
สารละลาย C	2.0	มล.
น้ำกลั่น	4.6	มล.
สารละลาย 10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	60	ไมโครลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร

3.8.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างกับสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:4 ในหลอดขนาดเล็ก นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 4 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.8.3 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

ประกบแผ่นเจลกับ electrode assembly โดยให้ปลายด้านล่างของแผ่นเจลแช่อยู่ในถาดบัฟเฟอร์ แล้วเติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ในภาชนะบรรจุทั้งที่อยู่หลังแผ่นเจลและถาดด้านล่าง ปรับอุณหภูมิของภาชนะบรรจุบัฟเฟอร์ให้ได้ 4°ซ นำสารละลายโปรตีนที่เตรียมในข้อ 3.8.2 ไปหยอดลงในช่องบนผิวหน้าเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 40 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนลงไปจนถึงระยะอีก 0.5 ซม.จากปลายล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.8.4 การย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจล

แกะเจลจากแผ่นกระจกแล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีนทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชม. จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน จนกระทั่งเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน เก็บเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

3.9. การศึกษาสมบัติของไลเปสที่บริสุทธิ์บางส่วน

3.9.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชันและเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซีส

เซฟาเดกซ์ จี-150 เจลฟิลเตรชันคอลัมน์

แช่ Sephadex G-150 ซึ่งสามารถแยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,000-400,000 ดาลตัน ปริมาณ 20 กรัมใน 0.05 M Potassium phosphate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 800 มล. นำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 5 ชม. เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.3x90 ซม. ให้ได้เจลสูง 87 ซม. ผ่านสารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 6.0 อีกประมาณ 50 ชม. ด้วยอัตราการไหล 24 มล./ชม. เพื่อให้เม็ดเจล เรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเด็กซแทรน 4 มก./มล.และโพแทสเซี่ยมไดโครเมต 1 มก./มล.

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ Bovine serum albumin (BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน Chymotrypsinogen A น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน และMyoglobin น้ำหนักโมเลกุล 17,200 ดาลตัน ในปริมาณ 5 มก./มล. ยกเว้นไลเปสซึ่งใช้ 2 มก./มล.

เก็บสารละลายซึ่งแยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 3 มล. ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วัดแอคติวิตีของเอนไซม์และวัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนผ่านออกมาจากคอลัมน์ นำไปคำนวณค่า K_{av} ดังนี้

$$K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$$

V_e คือ elution volume ของโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์

V_0 คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเด็กซ์แทรนผ่านออกมา

V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่ (total bed volume) วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมทผ่านออกจากคอลัมน์

ผ่านสารละลายเอนไซม์ไลเปสลงในคอลัมน์ แล้วหา elution volume ของเอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตี คำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น

เอสดีเอส-<u>โพลีอะไครลาไมด์ เจลอีเลคโตรโฟรีซีส</u>

เตรียมเจล, สารละลายโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์ รวมทั้งทำอีเลคโตรโฟรีซีสในทำนองเดียวกับข้อ 3.8.

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ Fructose-6-phosphate kinase น้ำหนักโมเลกุล 85,204 ดาลตัน Glutamate dehydrogenase น้ำหนักโมเลกุล 55,562 ดาลตัน Aldolase น้ำหนักโมเลกุล 39,212 ดาลตัน และ Triose phosphate isomerase น้ำหนักโมเลกุล 26,626 ดาลตัน จาก Calibration protiens for SDS gel electrophoresis ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมสำเร็จ มีความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละชนิด 1-2 มก./มล.

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ทำได้โดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วคำนวณหา mobility ดังนี้

mobility = ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่/ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่

คำนวณค่า mobility ของเอนไซม์แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน

3.9.2 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของไลเปสตามวิธีในข้อ 3.5. โดยบ่มสารละลายเอนไซม์กับสับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 5.0-5.5 (อะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์), 6.0-7.5 (โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์), 8.0 (ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์)

3.9.3 การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ (pH stability)

นำเอนไซม์มาบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่างๆ คือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวในข้อ 3.1.2 ที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือตามวิธีในข้อ 3.5.

3.9.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของไลเปสตามวิธีในข้อ 3.5. ที่อุณหภูมิต่างๆตั้งแต่ 25-50^{0}ซ

3.9.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ (Thermal stability)

นำเอนไซม์มาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆในช่วงระหว่าง 25-50^{0}ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์

ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ในระยะยาวด้วย โดยการนำเอนไซม์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80, -20 และ 4°ซ เป็นเวลา 1, 3, 7, 14 และ 20 วัน แล้วจึงนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์

3.9.6 การศึกษาผลของไอออนบางชนิดและตัวยับยั้งเอนไซม์บางชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล.กับสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 5.0 มล. ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารชนิดใดชนิดหนึ่งต่อไปนี้ คือ $MgCl_2.6H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, $MnCl_2.4H_2O$, $FeCl_3.6H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$, EDTA, SDS, KCl, NaCl อย่างละ 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 37°ซ นำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.5.

3.9.7 การหาความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรทธรรมชาติบางชนิด

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.5. โดยศึกษาผลของการใช้สับสเตรทชนิดอื่นเทียบกับน้ำมันมะกอก โดยให้ความเข้มข้นของสับสเตรทแต่ละชนิดเท่ากับ 1.5 เปอร์เซนต์โดยปริมาตร

3.9.8 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปส

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเตรียมสารละลายในการทำปฏิกิริยาดังข้อ 3.5. ยกเว้นใช้บัฟเฟอร์ pH 7.0 เตรียมสับสเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ และวัดแอคติวิตีด้วยวิธี pH-stat โดยการเติม 0.05 M KOH ลงไปใน reaction mixture เพื่อรักษา pH ให้คงที่ที่ 7.0 เติมเอนไซม์และจับเวลาแล้วอ่านปริมาณของ KOH ที่เติมลงไปทุกๆ 2 นาทีเป็นเวลา 10 นาที จะได้ปริมาณของ KOH ที่เติมลงไปทุก 2 นาทีมาคำนวณหาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการไตเตรท คำนวณหาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจากกราฟแล้วนำไปเขียนกราฟระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยากับความเข้มข้นของ

น้ำมันมะกอก และหาค่าKm และ Vmax ของสับสเตรทโดยอาศัยการพลอตแบบ Lineweaver Burk plot

I17256276