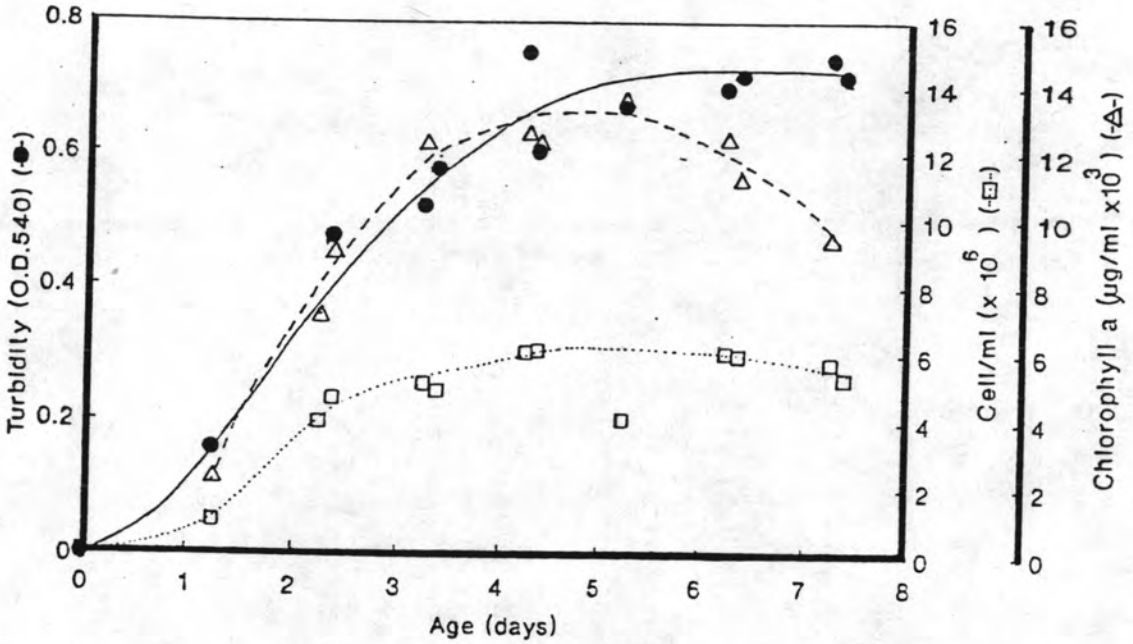
บทที่ 4

ผลการทดลอง

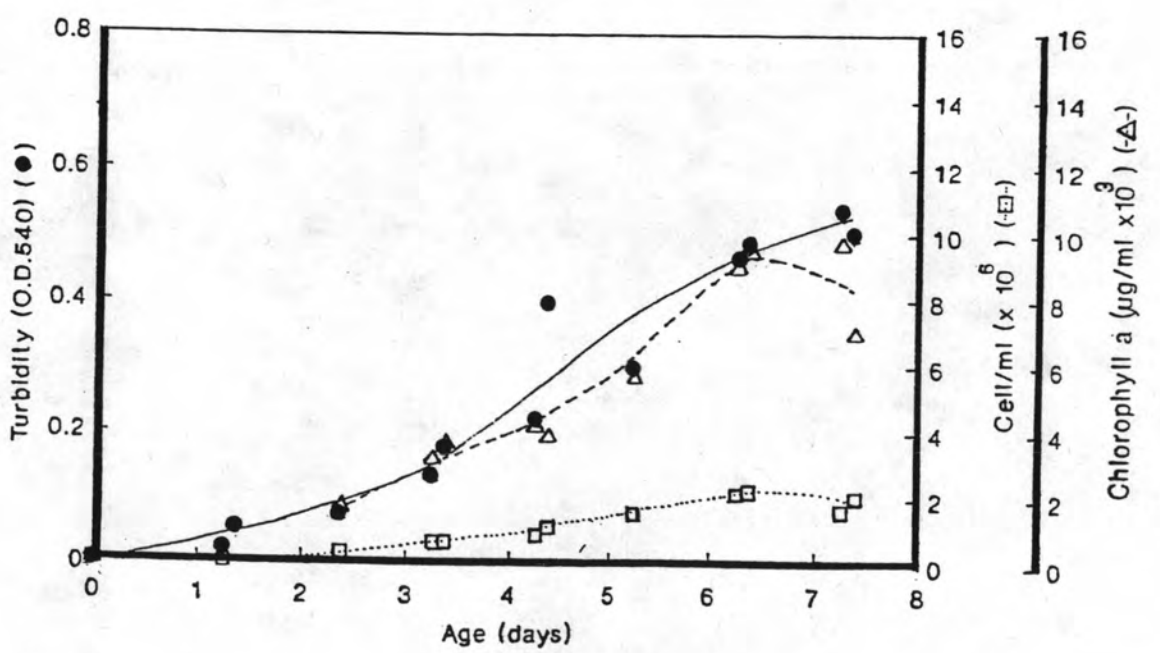
4.1 การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะและรูปแบบการเจริญของ C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิม(137c)และสายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3)

เมื่อเพาะเลี้ยง C. reinhardtii ในอาหาร TMP ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในขวดก้นชมพู่ขนาด 4 ลิตร ที่ผ่านอากาศปลอดเชื้อที่ปรับแรงดันและปริมาตรให้มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2-5% อุณหภูมิ 25°ซ ติดตามการเจริญพร้อมทั้งวัดปริมาณโปรตีน (วิธีลอรี) และแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR (โดยการรีดิวซ์สี DCPIP ด้วย NADPH)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะและรูปแบบการเจริญของสาหร่ายสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท (รูปที่ 4.1) จะเห็นว่าการเจริญของสายพันธุ์ดั้งเดิมจะเจริญเร็วกว่า โดยจะเจริญถึงจุดสูงสุดใช้เวลา ประมาณ 5-6 วัน ในขณะที่สายพันธุ์ต้านพาราควอทใช้เวลาถึง 7-8 วัน โดยค่าการเจริญสูงอยู่ระหว่า 0.9-1.0 ทั้งสองสายพันธุ์ โดยในสายพันธุ์ดั้งเดิมมีปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ ประมาณ 31 ไมโครกรัม/10^7เซลล์ และสายพันธุ์ต้านพาราควอทมีจำนวนประมาณ 54 ไมโครกรัม/10^7เซลล์ โดยจำนวนเซลล์สูงสุดในสายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าสูงสุด 5×10^6 เซลล์/ มล.อาหาร ซึ่งในสายพันธุ์ต้านพาราควอทจะมีจำนวนเซลล์ เพียง 2.4×10^6/ มล.อาหาร



รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของ C. reinhardtii ในอาหารสูตร TMP ในขวดก้นชมพู่ขนาด 4 ลิตร ติดตามการเจริญโดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{540}) จำนวนเซลล์ และปริมาณคลอโรฟิลล์เอ ก. สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) ข. สายพันธุ์ต้านพาราควอท(PPQ-10/3)



4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแยกเอนไซม์

สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการแยกสกัดจะใช้สารละลายทริสบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 ที่เสริมด้วยบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ EDTA 1.0 มิลลิโมลาร์

4.2.1 ผลการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii ด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง

นำเซลล์ที่เก็บได้จากระยะการเจริญช่วงอายุของการเจริญทวิคูณไปทำให้แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicator)(ข้อ 3.2.1) โดยเปิดเครื่องที่ 50% duty cycle output 6 ปริมาตร 6-10 มล. เป็นเวลาต่าง ๆ กัน(0.5,1,4, และ 8 นาทีตามลำดับ) นำส่วนโฮโมจีเนตทั้งหมด (Whole homogenate) ไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์และวัดปริมาณโปรตีนจากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้นี้ไปปั่นแยกส่วนใสและตะกอนออกจากกัน (10,000 rpm 1 ชั่วโมง) โดยนำแต่ละส่วนไปหาโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR ผลที่ได้ดัง ตารางที่1

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 จะแสดงให้เห็นว่าการทำให้เซลล์แตกเป็นเวลา 0.5 นาที จะได้เอนไซม์ FNR ละลายออกมาในส่วนสารละลายใสมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดและจะลดตามระยะเวลาที่ทำให้เซลล์แตกเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณแอคติวิตีรวมจะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับส่วนตะกอนนั้นค่าแอคติวิตีจำเพาะจะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น และปริมาณแอคติวิตีลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเช่นกัน เพื่อให้การสกัดเอนไซม์ได้ดีที่สุดจึงเลือกที่เวลา 2 นาที เพราะแอคติวิตีรวมจะสูงอยู่ในระดับคงที่และแอคติวิตีจำเพาะต่ำลงไม่มากนัก ดังนั้นจึงนำผลการของการทดลองนี้มาใช้ในการทำให้เซลล์แตกสำหรับการเตรียมเอนไซม์ปริมาณน้อยและการติดตามปริมาณการผลิตโปรตีนและเอนไซม์ในระหว่างการเจริญของสาหร่าย

ตารางที่ 1 ผลการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง

เวลา (นาที)	โปรตีน (%ทั้งหมด)		แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)		แอคติวิตี (%ทั้งหมด)	
	ส่วนใส	ตะกอน	ส่วนใส	ตะกอน	ส่วนใส	ตะกอน
0.5	59.7	42.1	0.098	0.040	43.6	12.9
1	68.0	32.0	0.08	0.025	85.4	14.6
2	71.8	28.2	0.088	0.025	87.6	12.4
4	73.1	26.9	0.073	0.024	89.2	10.8
8	81.2	18.8	0.053	0.020	91.9	8.1

4.2.2 ผลการศึกษาปริมาณบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ FNR

ทำการเตรียมสารละลายโดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างจำนวนกรัมของเซลล์เปียกต่อมล. ของบัฟเฟอร์ที่กระจายเซลล์เป็น 1:2, 1:3 และ 1:4 เมื่อทำให้เซลล์แตกและนำไปเซนตริฟิวจ์เก็บส่วนใสซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์แล้วนำไปวัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของ FNR

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 2) จะเห็นว่าที่สัดส่วนของเซลล์ต่อบัฟเฟอร์ 1:3 จะสามารถแยกเอนไซม์ออกมาได้ดีโดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด เนื่องจากที่ความเข้มข้นเซลล์สูงเกินไป (1:2) เอนไซม์จะละลายออกมาในสารละลายบัฟเฟอร์ได้น้อย ส่วนที่ความเข้มข้นในเซลล์ต่ำ (1:4) อาจทำให้เซลล์แตกไม่สมบูรณ์เนื่องจากการเบียดกันระหว่างเซลล์น้อย

ดังนั้นจึงได้นำผลการทดลองนี้ไปใช้ในการเตรียมเซลล์เพื่อสกัดเอนไซม์ FNR ปริมาณมากโดยกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์ให้มีสัดส่วน 1:3

4.2.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเอนไซม์ปริมาณมาก

เนื่องจากในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์นั้นจำเป็นต้องใช้เอนไซม์เริ่มต้นจำนวนมากจึงต้องรวบรวมเซลล์ให้ได้ปริมาณเซลล์ประมาณ 100-200 กรัมเซลล์เปียกกระจายในบัฟเฟอร์ด้วยสัดส่วน 1:3 จะใช้วิธีทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำให้เซลล์แตกชนิดแรงดันสูงแบบเฟรนช์ (French Pressure Cells) โดยใช้ความดัน 8,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) ปรับอัตราเร็วของการไหลผ่านของเซลล์ในเครื่องประมาณ 3-5 มล./นาที โดยได้แปรผันอัตราการไหลผ่านของเซลล์ที่เหมาะสมจนกระทั่งได้สภาวะที่ทำให้เซลล์แตกสมบูรณ์(ดูจากกล้องจุลทรรศน์)และวัดแอคติวิตีเริ่มต้นของเอนไซม์ FNR ได้ใกล้เคียงกับค่าที่วัดได้จาก

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาอัตราส่วนของเซลล์ C. reinhardtii ต่อบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการสกัดแยกเอนไซม์ FNR

อัตราส่วน (กรัม เซลล์/มล.บัฟเฟอร์)	ปริมาณโปรตีน มก./กรัมเซลล์เปียก	แอคติวิตีจำเพาะ หน่วย/มก.โปรตีน	แอคติวิตี หน่วย/มก.เซลล์เปียก
1:2	41.07	0.047	1.95
1:3	50.23	0.054	2.73
1:4	61.70	0.042	2.62

เมื่อใช้เครื่องทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง สารละลายโฮโมจีเนตทั้งหมดที่ได้นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 ชั่วโมง เก็บสารละลายเอนไซม์ (crude) ที่ได้ ซึ่งจะเป็นสารละลายเริ่มต้นใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.2.4 ผลการศึกษาความเร็วของการเซนติฟิวล์ในการแยกเอนไซม์ FNR ออกจากสารละลายเอนไซม์

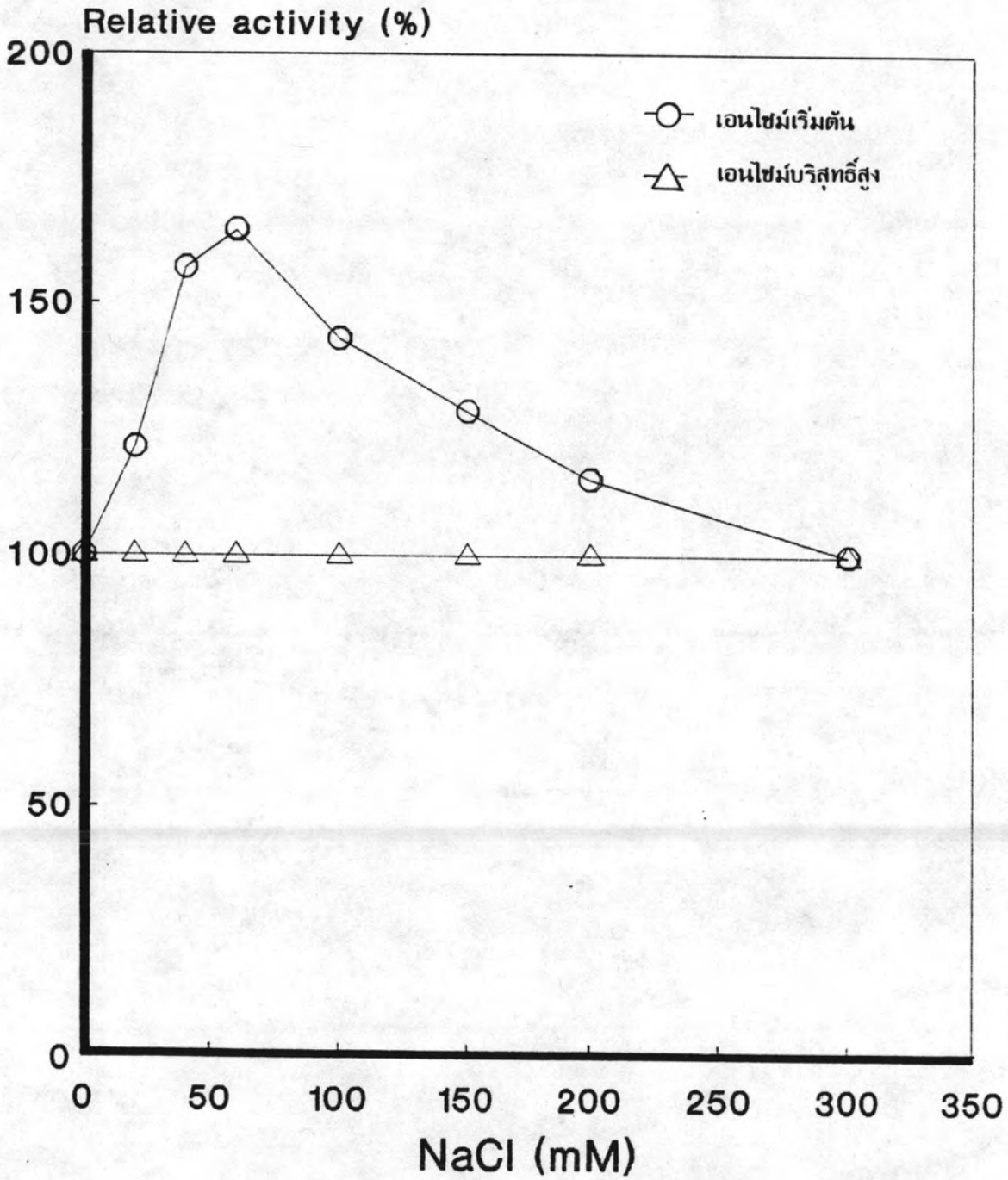
เมื่อทำการศึกษาวิธีการแยกสกัดเอนไซม์ FNR ออกจาก C. reinhardtii ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3) ที่ระยะการเจริญช่วงอายุของการเจริญแบบทวิคูณ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง แล้วนำไปปั่นแยกส่วนสารละลายใส และส่วนตะกอนออกจากกันด้วยความเร็วที่ต่างกันนำไปหาโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนสารละลายใสโดยเปรียบเทียบที่ระยะปลายของการเจริญแบบทวิคูณ (late log) ซึ่งมีแอคติวิตีสูงสุด ในสายพันธุ์ดั้งเดิมเอนไซม์ในส่วนใสจะมีแอคติวิตีมากกว่าในส่วนตะกอนประมาณ 5 เท่า ในทำนองเดียวกันในสายพันธุ์ต้านพาราควอทในส่วนสารละลายใสจะมีแอคติวิตีมากกว่าในตะกอนประมาณ 5 เท่า เช่นกัน

4.2.5 ผลกระทบของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

เมื่อได้แปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-300 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาการรีดิวซ์ สี DCPIP ด้วย NADPHของเอนไซม์ FNR ในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น และเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง ในสภาวะที่กำหนด

ผลการทดลอง (รูปที่ 4.2) จะเห็นว่าในเอนไซม์เริ่มต้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ แอคติวิตีจะสูงขึ้นตามลำดับ และจะสูงสุดที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ และจะค่อยๆ ลดลง โดยที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ จะมีแอคติวิตีเท่ากับปฏิกิริยาโดยไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ แต่ในเอนไซม์ FNR ที่มีความบริสุทธิ์สูงกลับไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ไม่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา



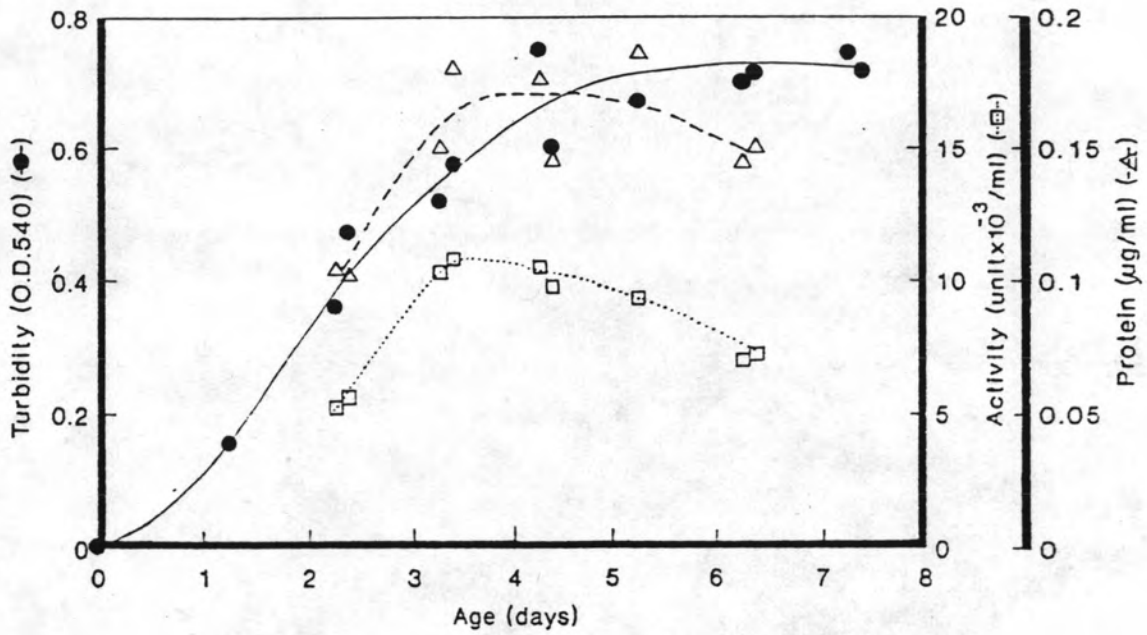
รูปที่ 4.2 ผลการแปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0-320 mM) ของการวัดปริมาณแอคติวิตีในปฏิกิริยาไดอะโฟเรสของเอนไซม์ FNR ในการรีดิวส์สี DCPIP ด้วย NADPH

4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของการผลิตเอนไซม์ FNR โดย C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท

เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย 2 สายพันธุ์ในขวดก้นชมพู่ขนาด 4 ลิตร ภายใต้สภาวะที่กำหนดเช่นเดียวกัน โดยติดตามรูปแบบการผลิตเอนไซม์ FNR ที่ระยะต่าง ๆของการเจริญ

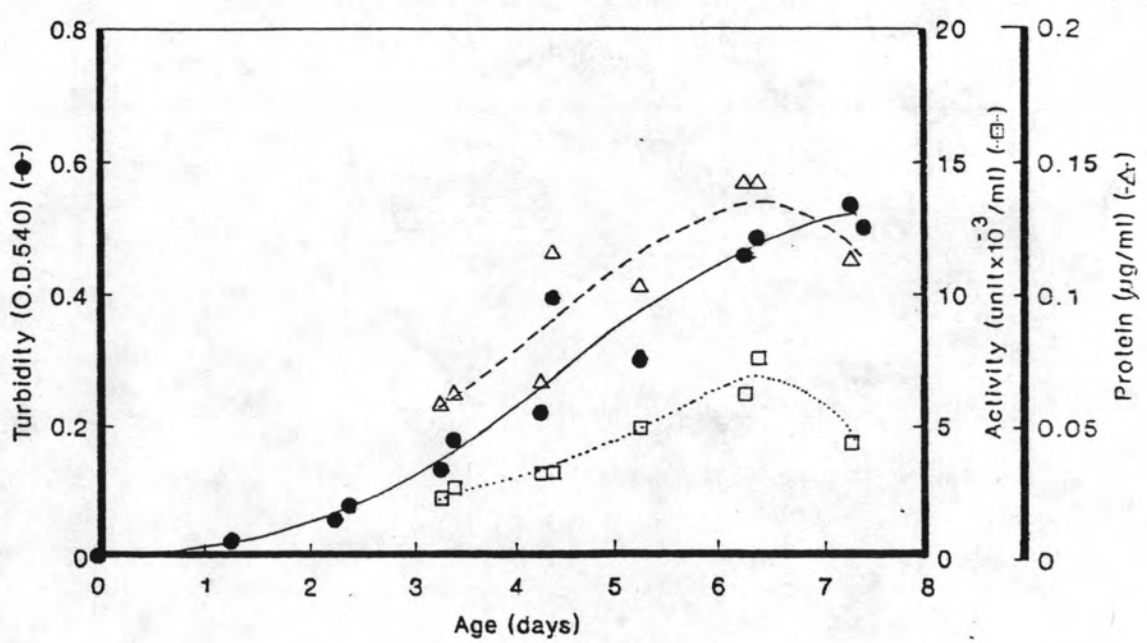
ผลการทดลอง (รูป 4.3) พบว่าสาหร่ายทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ระยะปลายของการเจริญแบบทวิคูณ โดยในสายพันธุ์ดั้งเดิมจะมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดประมาณ 10×10^{-3} หน่วย/มล.อาหาร ส่วนในสายพันธุ์ต้านพาราควอทจะมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดประมาณ 7.5×10^{-3} หน่วย/มล.อาหาร แต่ปริมาณแอคติวิตีต่อปริมาณเซลล์จะมีค่าประมาณ 0.021 และ 0.031 หน่วย/10^7 เซลล์ในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอทตามลำดับ ส่วนรูปแบบการผลิตโปรตีนก็จะมีลักษณะเช่นเดียวกันโดยสายพันธุ์ดั้งเดิมจะมีปริมาณโปรตีนสูงสุดประมาณ 0.35 ไมโครกรัม/ 10^7 เซลล์ ส่วนในสายพันธุ์ต้านพาราควอทจะมีปริมาณสูงสุดเพียง 0.57 ไมโครกรัม/10^7 เซลล์

ดังนั้นจะเห็นว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเซลล์เพื่อแยกสกัดเอนไซม์ FNR ของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์อยู่ที่ระยะปลายของการเจริญแบบทวิคูณ โดยสายพันธุ์ดั้งเดิมจะเก็บเซลล์ที่อายุประมาณ 3-4 วัน ในขณะที่สายพันธุ์ต้านพาราควอทจะต้องใช้เวลาเลี้ยงเซลล์นานกว่าโดยจะเก็บที่อายุ 5-6วัน



รูปที่ 4.3 รูปแบบการผลิตเอนไซม์ FNR และปริมาณโปรตีนที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญของ C. reinhardtii ที่เลี้ยงในอาหาร TMP (ข้อ 3.5.3)

ก. สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) ข. สายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ 10/3)



4.4 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเก็บรักษาเซลล์ C. reinhardtii เพื่อสกัดแยกเอนไซม์ FNR

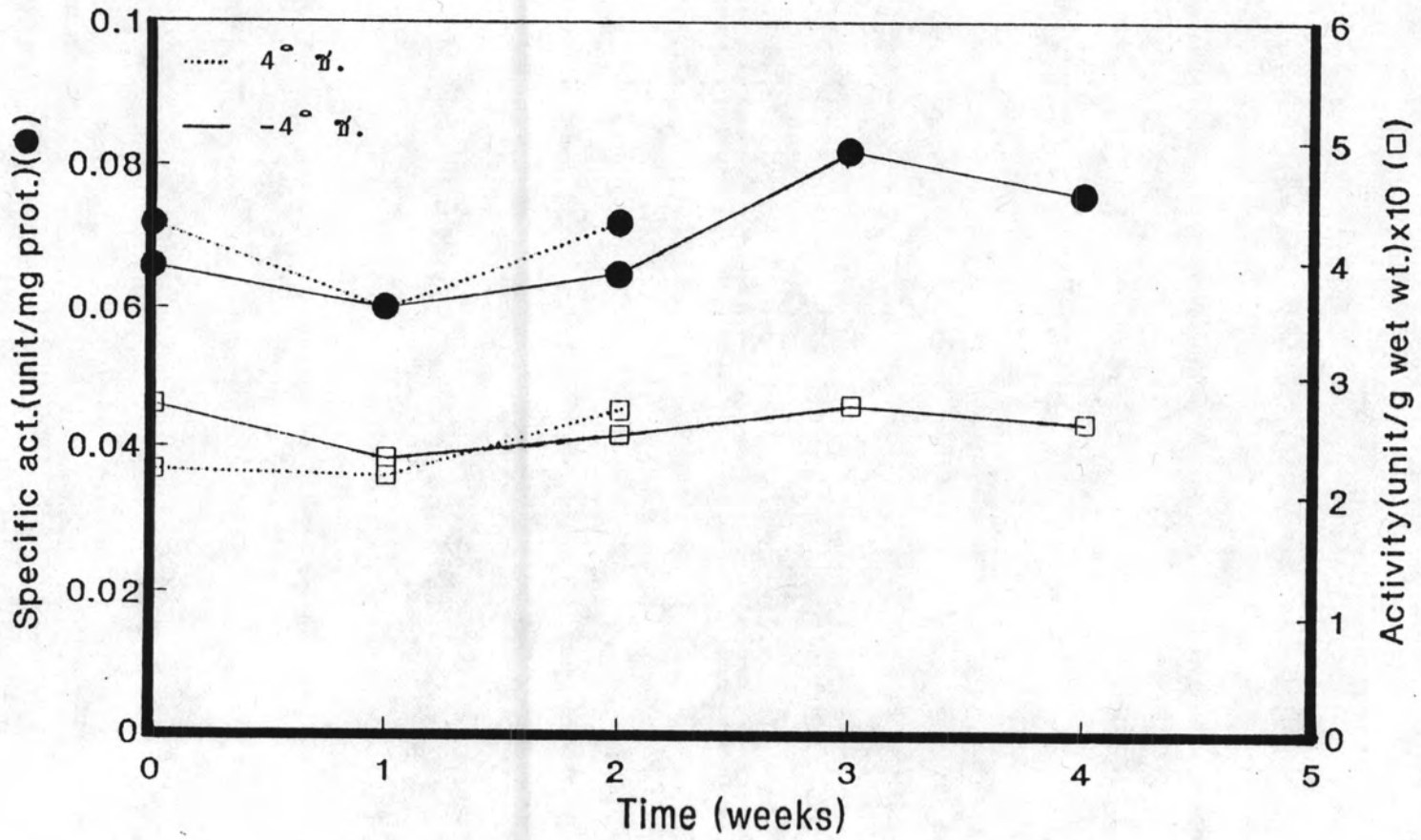
เมื่อทำการทดลองเก็บเซลล์ C. reinhardtii ในสภาพ Packed cell ที่อุณหภูมิ 4°ซ และ -4 °ซ เป็นช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กันเพื่อหาวิธีที่เหมาะสมในการเก็บเซลล์ไว้เป็นแหล่งของเอนไซม์ FNR ในการวิจัยนี้ พบว่าการเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิตู้เย็นธรรมดา (4°ซ) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จะเกิดการปนเปื้อนด้วยเชื้อราทำให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR ที่วัดได้ไม่แน่นอน แต่ที่อุณหภูมิช่องแช่แข็ง (-4°ซ) จะเก็บเซลล์ เป็นระยะเวลายาวนานจนถึง 4 สัปดาห์ แอคติวิตีของเอนไซม์ที่แยกได้จากเซลล์จะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.4)

4.5 ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการทำให้เอนไซม์ FNR จาก C. reinhardti สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) และสายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3) บริสุทธิ์

ในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จำเป็นต้องใช้เอนไซม์เริ่มต้น ปริมาณมากโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์และเก็บรวบรวมเซลล์ที่ระยะปลายของการเจริญแบบทวิคูณ ซึ่งจะใช้เวลา 3-4 วันในสายพันธุ์ดั้งเดิม และ 5-6 วันในสายพันธุ์ต้านพาราควอท นำเซลล์ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 5,000 rpm นาน 10 นาที เก็บเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -4° ซ. จนกว่าจะได้เซลล์มากพอที่จะนำมาเตรียมเอนไซม์ โดยทั่วไปจะสามารถเก็บเซลล์ได้ค่าเฉลี่ยประมาณ 15-20 กรัม น้ำหนักเปียก/ปริมาตร 10 ลิตร ของสายพันธุ์ดั้งเดิมและประมาณ 12-16 กรัม/ปริมาตร 10 ลิตรของสายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3)

จากนั้นจึงนำไปสกัดเอนไซม์ด้วยเครื่องทำให้เซลล์แตกชนิดแรงดันสูงแบบเฟรนช์ (ข้อ 4.2.3) แยกสารละลายใสซึ่งจะเป็นเอนไซม์เริ่มต้นนำไปทำให้

รูปที่ 4.4 ผลการเก็บรักษาเซลล์ C. reinhardtii ในสภาพ packed cell ที่อุณหภูมิ 4° ซ. และ -4° ซ. ที่สัปดาห์ต่าง ๆ (0-4 สัปดาห์) โดยการวัดปริมาณแอคติวิตี (□) และแอคติวิตีจำเพาะ (●)



บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

ทุกขั้นตอนของการทดลองดำเนินการโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 4-10° ซ และสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้จะเสริมด้วย เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์

4.5.1 ผลการศึกษาจำนวนไอโซไซม์ของ FNR ที่แยกจากสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท

นำสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นของสาหร่าย 2 สายพันธุ์นำมาแยกในโพลีอะไครลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส เพื่อเปรียบเทียบจำนวนไอโซไซม์โดยการย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR และเปรียบเทียบแถบของโปรตีน โดยการย้อมสีโปรตีน ซึ่งผลการเปรียบเทียบ (รูปที่ 4.5) ไม่สามารถแยกความแตกต่างของทั้งไอโซไซม์และแถบโปรตีนของทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยจะเห็นได้จากแถบไอโซไซม์ FNR ของเอนไซม์จากทั้ง 2 สายพันธุ์มีแถบสำคัญ (major band) อยู่ 2 แถบ (Rf 0.20 และ 0.28)

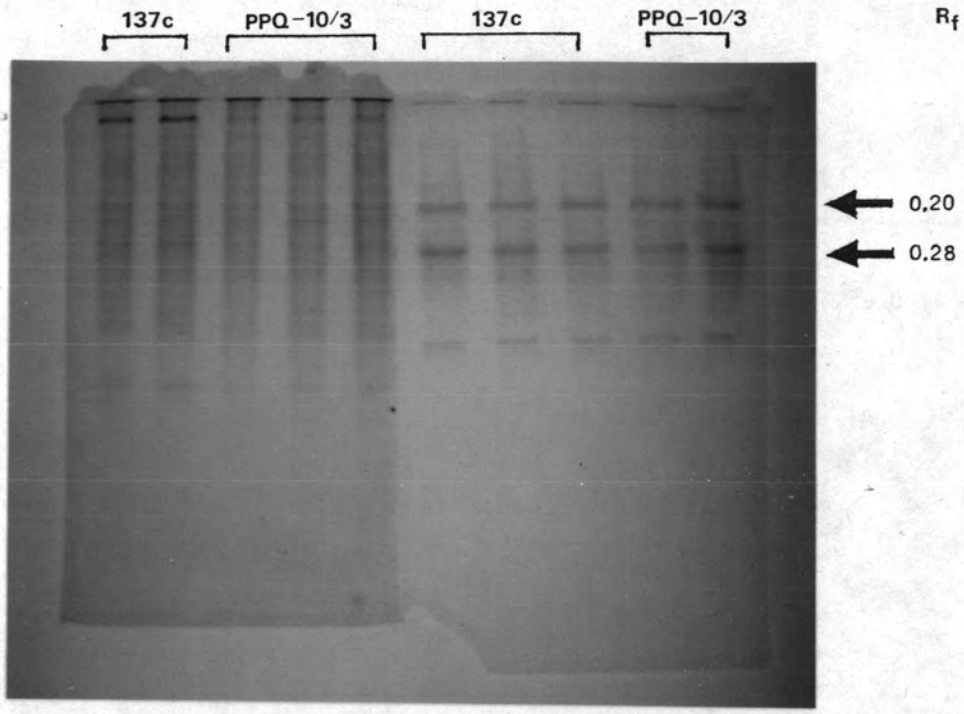
4.5.2 ผลการตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นมาตกตะกอนโปรตีนโดยการแปรเปลี่ยนปริมาณ ผงแอมโมเนียมซัลเฟตบดละเอียดตั้งแต่ 0-30 % จนถึง 0-80% ความเข้มข้นอิ่มตัว โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแฟรคชั่นละ 10% (ข้อ 3.11.2)

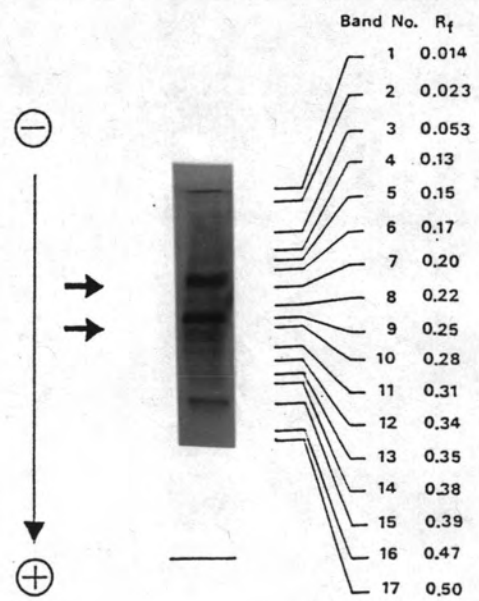
ผลการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่าโปรตีนจะตกตะกอนมากขึ้นตามความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ และ ในทำนองเดียวกัน แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นตามลำดับและคงที่ที่ 70% ขึ้นไป จึงเลือกที่จะตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม

ก

ข


137c
PPQ-10/3
137c
PPQ-10/3
Rf
0.20
0.28

ค


Band No. Rf
1 0.014
2 0.023
3 0.053
4 0.13
5 0.15
6 0.17
7 0.20
8 0.22
9 0.25
10 0.28
11 0.31
12 0.34
13 0.35
14 0.38
15 0.39
16 0.47
17 0.50

ตารางที่ 3 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 %โดย เพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตแฟรคชั่นละ 10% วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR และวัดประมาณโปรตีน

แฟรคชั่นของแอมโมเนียมซัลเฟต	โปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีรวม (หน่วย)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (%)
เอนไซม์เริ่มต้น	75.0	0.029	2.20	1.00	100.0
0-30	44.7	0.020	0.91	0.69	41.4
0-40	53.6	0.021	1.12	0.72	50.8
0-50	59.5	0.021	1.27	0.72	57.8
0-60	61.2	0.023	1.40	0.79	63.6
0-70	64.8	0.033	2.16	1.14	98.2
0-80	69.3	0.031	2.17	1.07	98.5

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ซัลเฟตอิ่มตัว 0-70% ซึ่งทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 1.14 เท่า

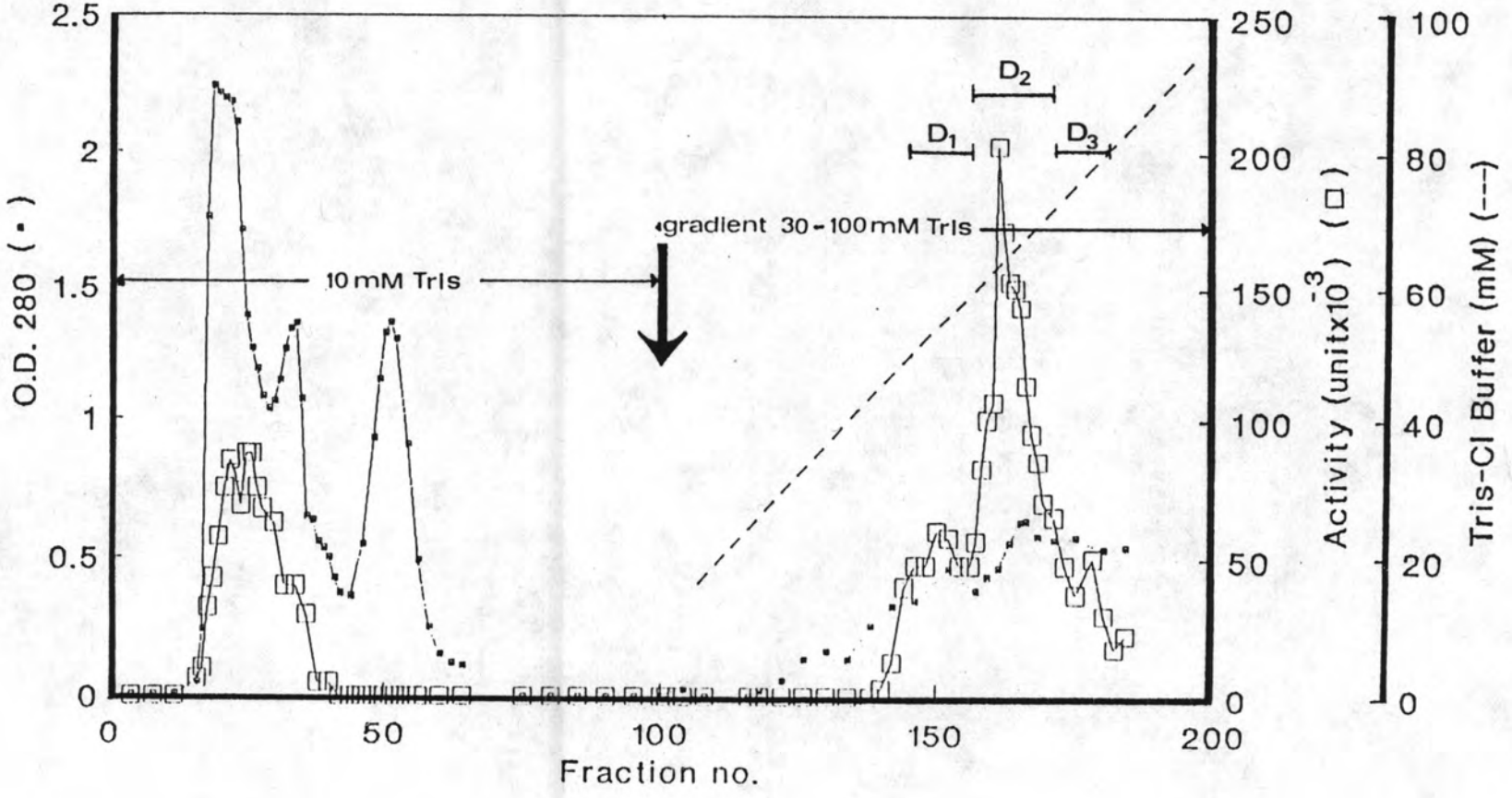
4.5.3 ผลการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ ดีอีเอดี ทริสซาคริล ครั้งที่ 1

น่าตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-70% ไปไดอะไลซ์ประมาณ 1000 เท่าในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ที่เสริมด้วย เมอร์แคบโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ หากมีตะกอนน่าไปปั่นแยกตะกอนออกไป แล้วน่าไปผ่านลงในคอลัมน์ ดีอีเอดี ทริสซาคริล (ข้อ 3.11.3) ชะด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรลดลงจนต่ำกว่า 0.05 แล้วจึงชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายทริสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น ระว่าง 30-100 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายแฟรคชั่นละ 5 มล. น่าไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

ผลการทดลอง (รูปที่ 4.6) จะเห็นว่าเมื่อชะด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ จะแยกโปรตีนส่วนใหญ่ออกมาได้โดยมีส่วนหนึ่งของเอนไซม์ FNR ถูกชะออกมาด้วยเล็กน้อย (1.12%)(ตารางที่ 4) ในขณะที่แอคติวิตีของ FNR ส่วนใหญ่ (>15%)จะออกมาเมื่อไล่ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์เมื่อความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 30-80 มิลลิโมลาร์ สามารถตรวจพบแอคติวิตีสูงสุดที่ความเข้มข้นของทริสบัฟเฟอร์ในคอลัมน์ประมาณ 60 มิลลิโมลาร์ จากการวิเคราะห์รูปของการแยกพบว่ามีช่วงของแอคติวิตีกว้างมากมีลักษณะของพีคแบ่งได้เป็น 3 ส่วนคือ D_1, D_2 และ D_3

เพื่อให้การแยกในคอมลัมน์นี้มีประสิทธิภาพที่สุดจึงแยกการรวมเอนไซม์เป็น 3 ส่วน ส่วนแรก (D_1) ถูกแยกออกมาที่ความเข้มข้นของทริส 30-50 มิลลิ

รูปที่ 4.6 ผลการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล (ครั้งที่ 1) ขนาด 2.4 x 28 ซม.)
ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 (10 mM) แล้วชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ (30-100 mM)



ตารางที่ 4 สรุปขั้นตอนเบื้องต้นของการทำให้เอนไซม์ FNR จาก C.reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิม บริสุทธิ์บางส่วน

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	โปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีรวม (หน่วย)	ผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
เอนไซม์เริ่มต้น	136	885.8	0.068	60.52	100	1
แอมโมเนียมซัลเฟต 0-70%	33.48	571.8	0.077	43.86	72.47	1.13
ดีอีเออี ทริสซาคริล ทริสบัฟเฟอร์ (10mM)	9.0	11.9	0.063	0.68	1.12	0.81
ดีอีเออี ทริสซาคริล เกรเดียนท์ทรัสบัฟเฟอร์(D_1)	7.33	17.28	0.184	3.17	5.24	2.7
ดีอีเออี ทรีสซาคริล เกรเดียนท์ทริสบัฟเฟอร์(D_2)	7.76	21.4	0.285	6.1	10.10	4.2
ดีอีเอดี ทริสซาคริล เกรเดียนท์ทริสบัฟเฟอร์ (D_3)	5.31	14.23	0.079	1.12	1.84	1.16
พี11ฟอสโฟเซลลูโลส เกรเดียนท์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	3.13	5.46	0.929	5.07	8.38	13.7
เซฟฟาเด็กซ์ จี-100	4.41	1.78	1.69	3.0	5.0	24.8

โมลาร์ ส่วนที่ 2(D_2) ที่ 50-70 มิลลิโมลาร์ ส่วนที่ 3(D_3) ที่ 70-80 มิลลิโมลาร์

เมื่อนำเอนไซม์ที่แยกได้แต่ละส่วนมาเปรียบเทียบลักษณะไอโซไซม์โดยนำไปแยกในโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส ย้อมสีแอคติวิตี และย้อมสีโปรตีน เปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นและเอนไซม์ส่วนที่ถูกชะออกมาโดยยังไม่ผ่านเกรเดียนท์ของทริสบัฟเฟอร์

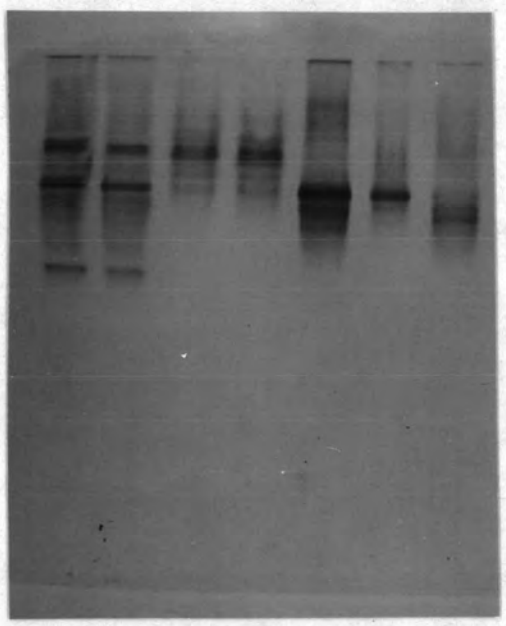
ผลการทดลอง (รูปที่ 4.7 ก.) จากไอโซไซม์ของ FNR แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เริ่มต้นมีแถบสำคัญ (major band) อยู่ที่ Rf 0.20 และ 0.28 โดยเอนไซม์ที่ D_1 จะพบแถบที่ Rf 0.28 เข้มที่สุดและมีแถบอื่น ๆ (Rf 0.13,0.15,0.17 และ 0.31) รวม 6 แถบ ส่วน D_2 ก็จะมีแถบเข้มที่ Rf 0.28เช่นกันและแถบอื่น ๆ อีก(Rf=0.053,0.13,0.15,0.170.22,0.25,0.31, 0.34,0.35 และ 0.38) รวม 11 แถบและส่วน D_3 พบ Rf 0.28 เข้มที่สุดในท่านองเดียวกันและแถบอื่น ๆ (Rf 0.15,0.31 และ 0.34) รวม 4 แถบ

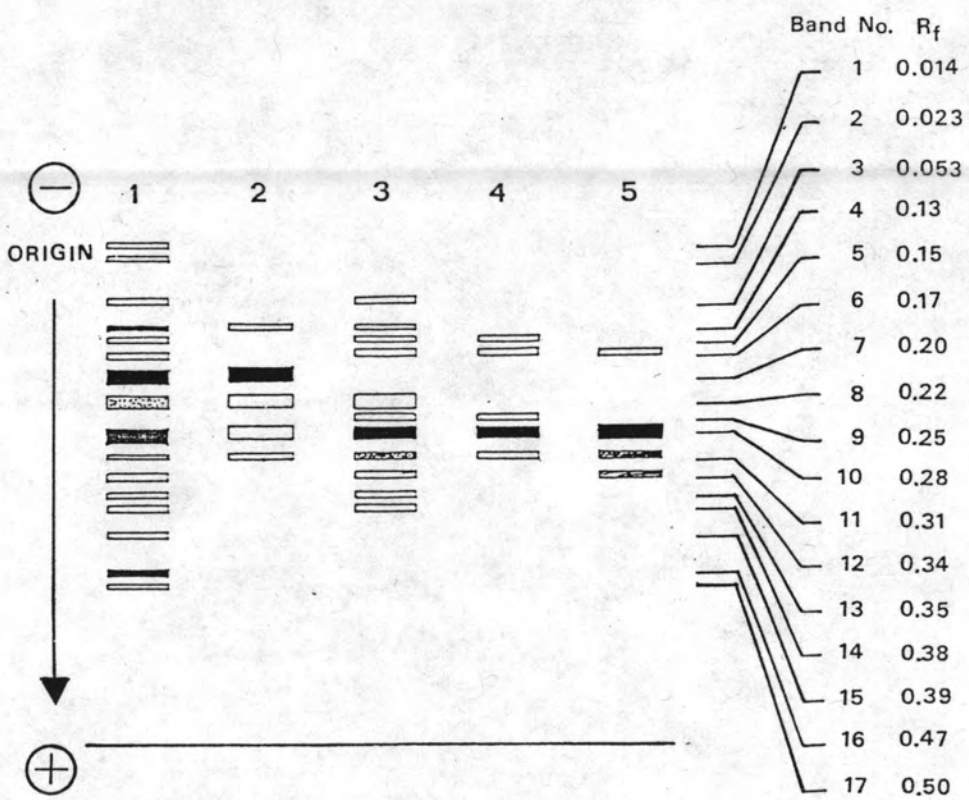
เมื่อศึกษาแถบโปรตีน (รูป 4.7 ข.) ใน D_1 จะพบแถบเข้มที่ Rf 0.28 และ 0.16 และแถบอื่น ๆ (Rf 0.063,0.11,0.25,0.43 และ 0.46) รวมทั้งหมด 7 แถบในส่วน D_2 จะพบแถบโปรตีนเข้มที่ Rf 0.28 และ0.16 เช่นกันโดยพบแถบอื่น ๆ อีกรวม 9 แถบ (Rf 0.053,0.11,0.19,0.25,0.31 และ 0.44) และใน D_3 นั้น พบแถบ Rf 0.28 เช่นกัน แต่แถบ Rf 0.16 พบเพียงจาง ๆ และแถบอื่น ๆ อีกรวม 10 แถบ (Rf 0.11,0.25,0.27,0.31, 0.34,0.37,0.43 และ 0.44) ซึ่งจากการเปรียบเทียบจำนวนไอโซไซม์แล้วจึงเลือกที่จะรวม D_2 และ D_3 เข้าด้วยกันเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปเนื่อง

รูปที่ 4.7 รูปแบบไอโซไซม์ของ FNR จาก C. reinhjardtii ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออี. ทริสซาคริล เปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น โดยนำมาแยกด้วยวิธีโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส ย้อมสีแอคติวิตี (ก) และย้อมสีโปรตีน (ข) แล้วนำมาเขียนรูปแบบง่าย ๆ ของแถบต่าง ๆ ที่แสดงความเข้มของแต่ละแถบ

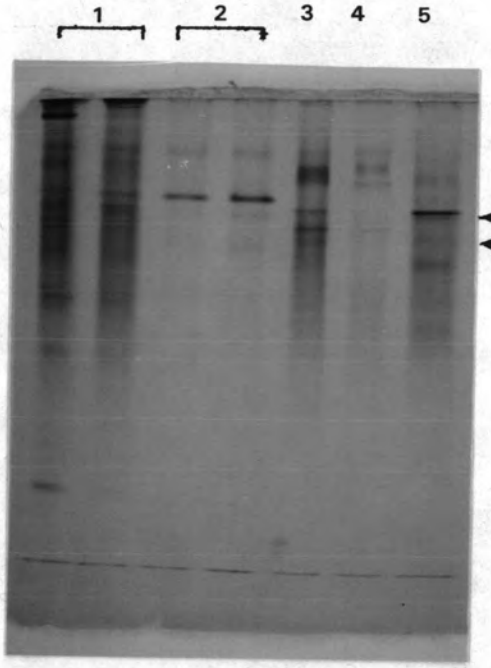
1. สารละลายเอนไซม์เริ่มต้น (3, 2 x 10^{-3} หน่วย, 110, 85 g)
2. FNR จากคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ (10 mM) (1, 2 x 10^{-3} หน่วย, 50 g)
3. FNR จากคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ชะด้วยเกรเดียนให้เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ (30-100 mM) D_2 (3.5 x 10^{-3} หน่วย, 80 g)
4. FNR จากคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ชะด้วยเกรเดียนที่เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ (30-100 mM) D_1 (1.5 x 10^{-3} หน่วย 70 g)
5. FNR จากคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ (30-100 mM) D_3 (1 x 10^{-3} หน่วย, 80 g)

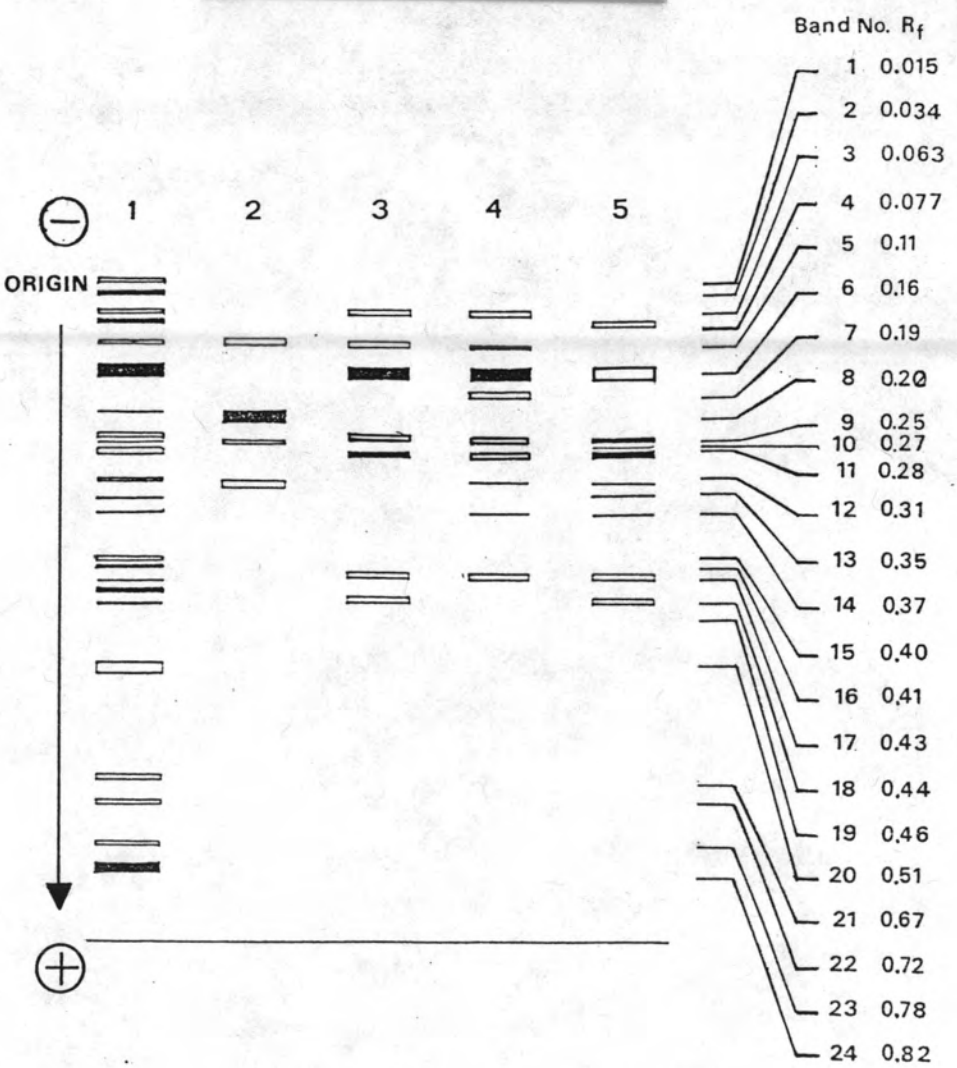
n


1
2
3
4
5
Rf
0.20
0.28


Band No. Rf
1 0.014
2 0.023
3 0.053
4 0.13
5 0.15
6 0.17
7 0.20
8 0.22
9 0.25
10 0.28
11 0.31
12 0.34
13 0.35
14 0.38
15 0.39
16 0.47
17 0.50
1
2
3
4
5
ORIGIN

ข


1
2
3
4
5
R_f
0.20
0.28


Band No. R_f
1 0.015
2 0.034
3 0.063
4 0.077
5 0.11
6 0.16
7 0.19
8 0.20
9 0.25
10 0.27
11 0.28
12 0.31
13 0.35
14 0.37
15 0.40
16 0.41
17 0.43
18 0.44
19 0.46
20 0.51
21 0.67
22 0.72
23 0.78
24 0.82
1
2
3
4
5
ORIGIN

จากได้แอคติวิตีสูงโดยสามารถแยกแถบโปรตีนที่ Rf 0.16 ที่ต้องการกำจัดออกไปได้ด้วย

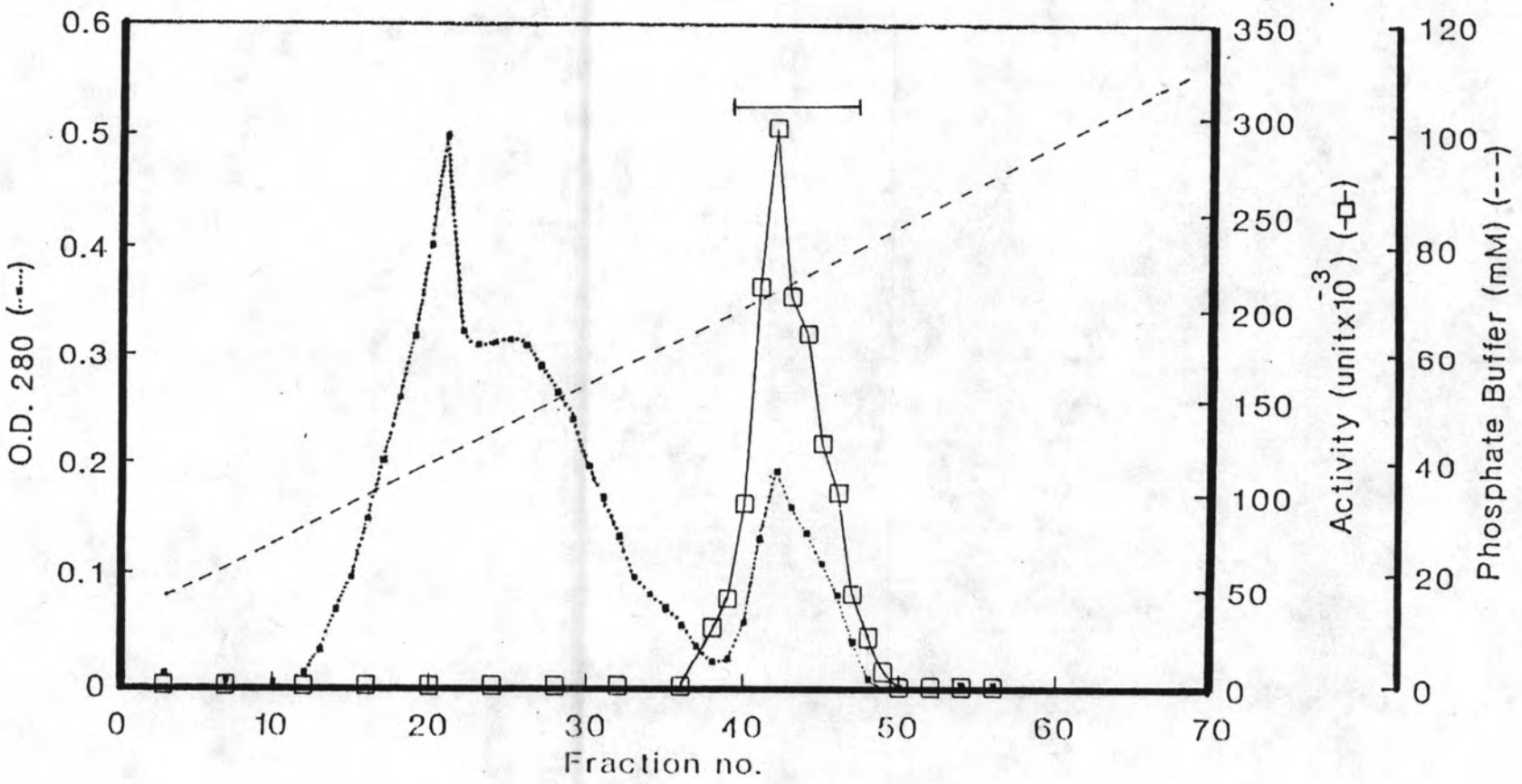
ส่วนเอนไซม์ที่ออกมาในช่วงการชะคอลัมน์ด้วยทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ นั้นเมื่อทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วนำไปแยกไอโซไซม์และย้อมสีแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR พบว่าแถบที่ Rf 0.20 ซึ่งเป็นแถบสำคัญจะถูกไล่ออกมาในส่วนนี้เสมอ เป็นไอโซไซม์ที่ไม่จับกับคอลัมน์ดีอีเออีที่ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ โดยจะพบแถบ Rf 0.28 เช่นกันแต่จางมาก

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริลนี้สามารถแยกเอนไซม์ FNR ออกมาได้หลาย ๆ รูปแบบ (form) และสามารถพบว่าจะมีรูปแบบที่คิดว่าเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ออกมาได้ แต่ยังมีแถบเอนไซม์ส่วนน้อยอื่น ๆ ปนออกมารวมทั้งโปรตีนชนิดอื่น ๆ ด้วย

4.5.4 <u>ผลการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส</u>

นำเอนไซม์ในแฟรคชั่นส่วน D_2 และ D_3 จากคอลัมน์ ดีอีเออี ทริสซาคริลมารวมกันแล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Ultrafiltration แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นในคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส (ข้อ 3.11.4) เมื่อชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ มีแอคติวิตีของเอนไซม์ออกมาเล็กน้อย (4%) ชะจนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรลดลงต่ำกว่า 0.05 เมื่อชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้นระหว่าง 10-250 มิลลิโมลาร์ จะมีโปรตีนออกมาในช่วงแรกมาก (รูปที่ 4.8) แต่ไม่มีแอคติวิตีออกมาด้วย เมื่อไล่ต่อไปอีกจะมีโปรตีนออกมาเพียงเล็กน้อยแต่แอคติวิตีของเอนไซม์ FNR ออกมาจำนวนมาก (10%)

รูปที่ 4.8 ผลการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส (ขนาด 1.5 x 30 ซม.) ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 (30-120 mM)



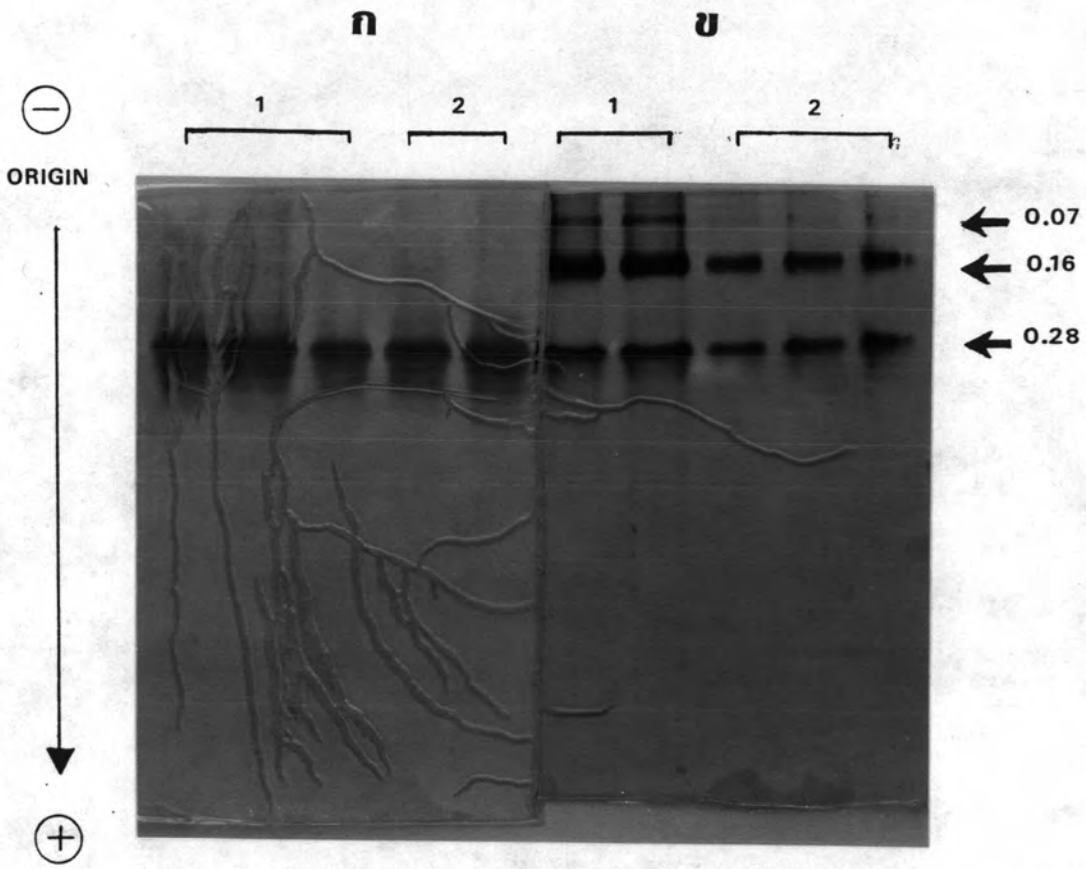
เมื่อนำเอนไซม์ที่แยกได้ไปศึกษารูปแบบไอโซไซม์ในโพลีอะไครลาไมด์เจล (รูป 4.9) พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ออกมาเมื่อชะด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์จะพบแถบเอนไซม์ที่ Rf 0.36 และ 0.38 ซึ่งไม่ใช่แถบสำคัญสำหรับเอนไซม์ที่แยกออกมาเมื่อชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีแอคติวิตีสูงสุดที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ประมาณ 80 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะพบแถบสำคัญที่ Rf 0.28 เข้มมากและมีแถบอื่น ๆ รวมทั้งหมด 6 แถบ (Rf 0.13,0.15,0.31,0.34 และ 0.35) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเจลที่ย้อมโปรตีน (รูป 4.9) จะเห็นว่าแถบโปรตีนที่ตรงกับแถบสำคัญ (Rf 0.28) จะเข้มมาก และมีแถบโปรตีนอื่น ๆ อีกโดยแถบที่ Rf 0.16 จะเข้มมากกว่าแถบสำคัญถึง 2-3 เท่า รวมทั้งหมด 4 แถบ (Rf 0.7,0.13)

ดังนั้นจากผลการแยกในคอลัมน์นี้สามารถแยกเอนไซม์ส่วนใหญ่ออกมาได้โดยกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้บางส่วนซึ่งจำเป็นต้องหาวิธีแยกด้วยวิธีการอื่นต่อไป

4.5.5 <u>ผลการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100</u>

นำเอนไซม์ที่รวมได้จากคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Ultrafiltration แล้วนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR และหาโปรตีนจากนั้นจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100 (ข้อ 3.11.5)

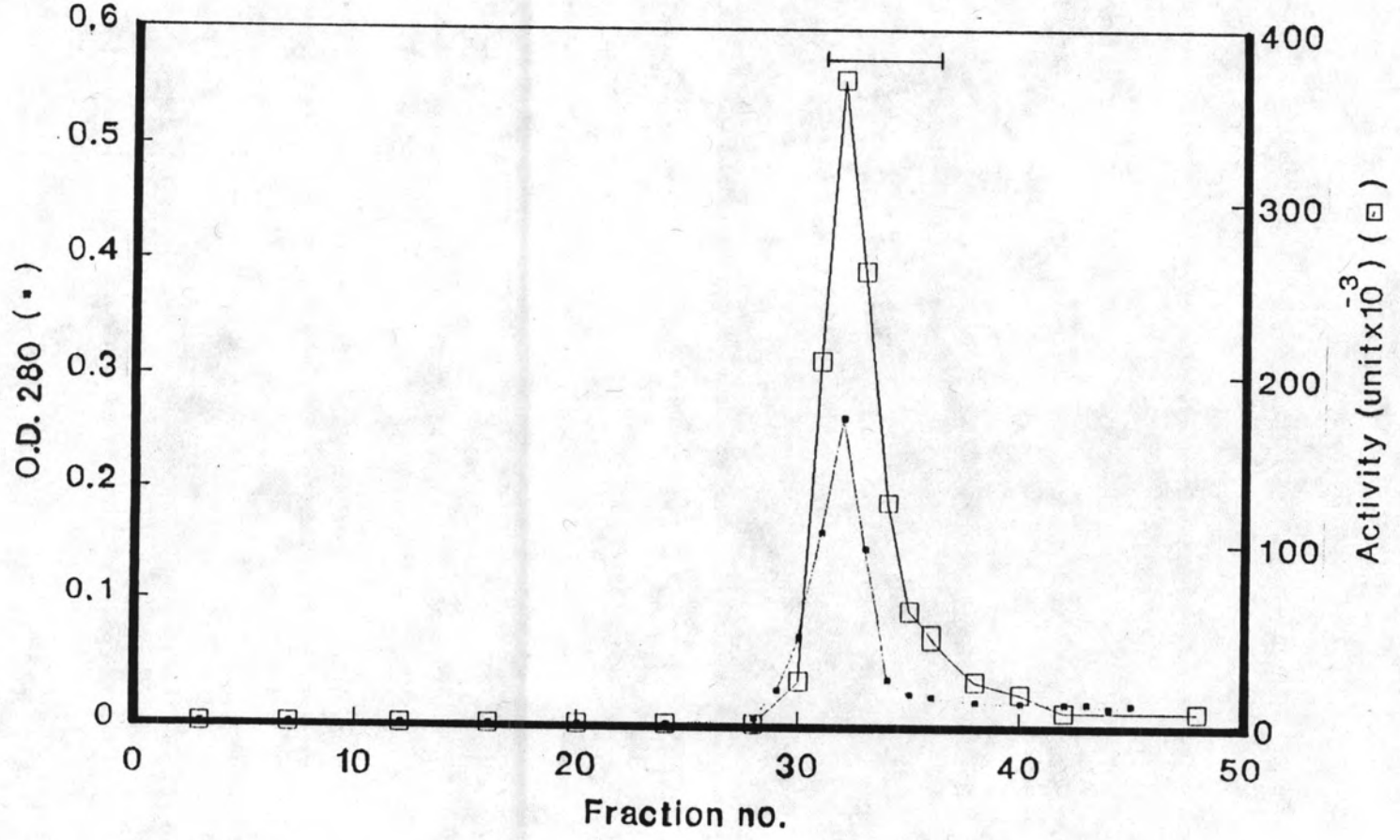
ด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้สามารถแยกเอนไซม์ FNR (รูปที่ 4.10) ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้ผลผลิต 5.6% ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส 2 เท่า (ตารางที่ 4) นำเอนไซม์ที่แยกได้ไปศึกษาเปรียบเทียบ ไอโซ



รูปที่ 4.9 รูปแบบของโปรตีนและไอโซไซม์ของการทำให้เอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii บริสุทธิ์ แยกโดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส

1. FNR จากคอลัมน์พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30-120 mM)
2. FNR จากคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100 (ทริสบัฟเฟอร์ 10 mM)
   ก. ย้อมแอคติวิตี (0.002-0.003 หน่วย)
   ข. ย้อมโปรตีน (50 ไมโครกรัม)

รูปที่ 4.10 ผลการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100 ชะด้วยทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 (10 mM)

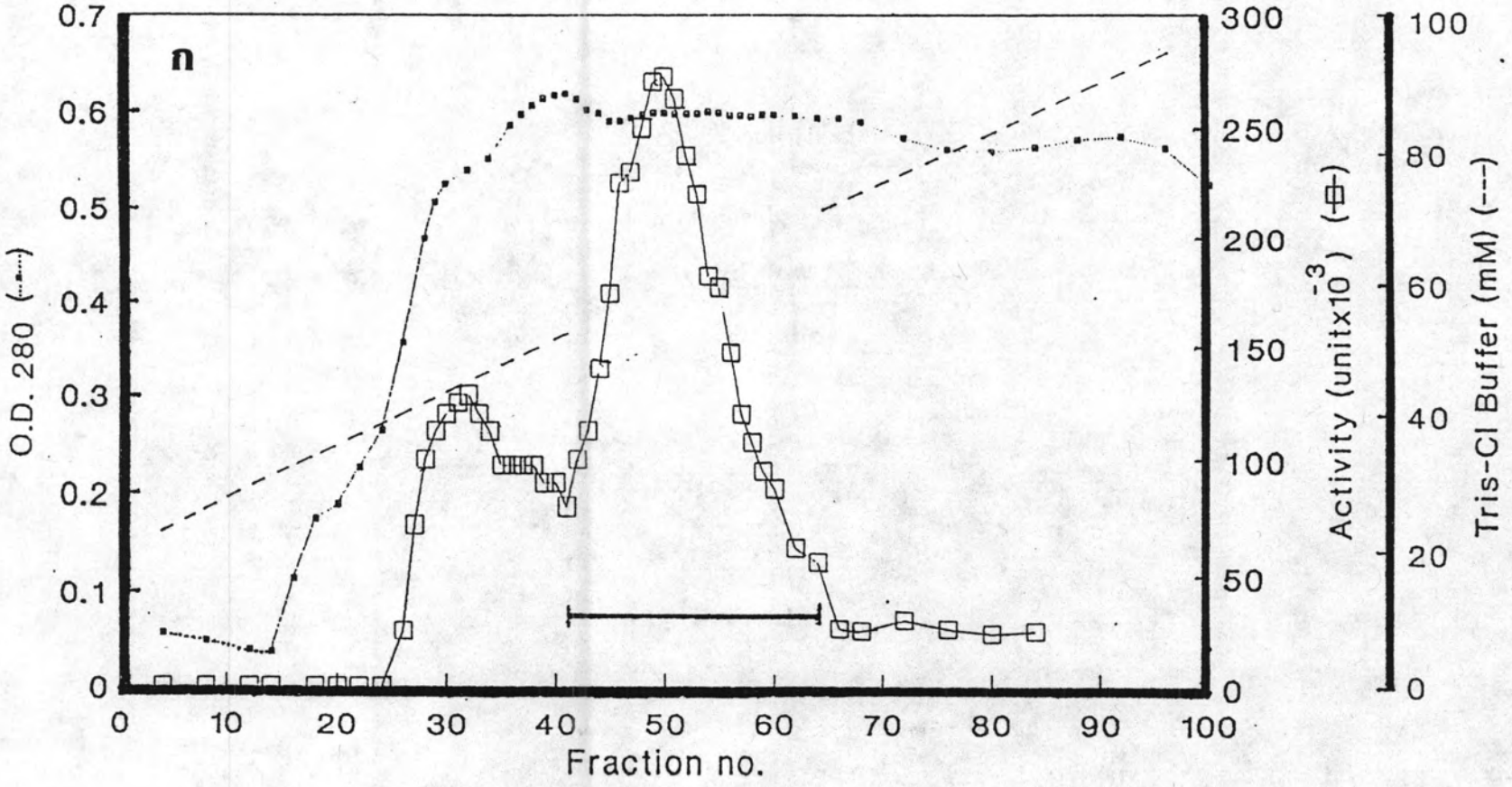


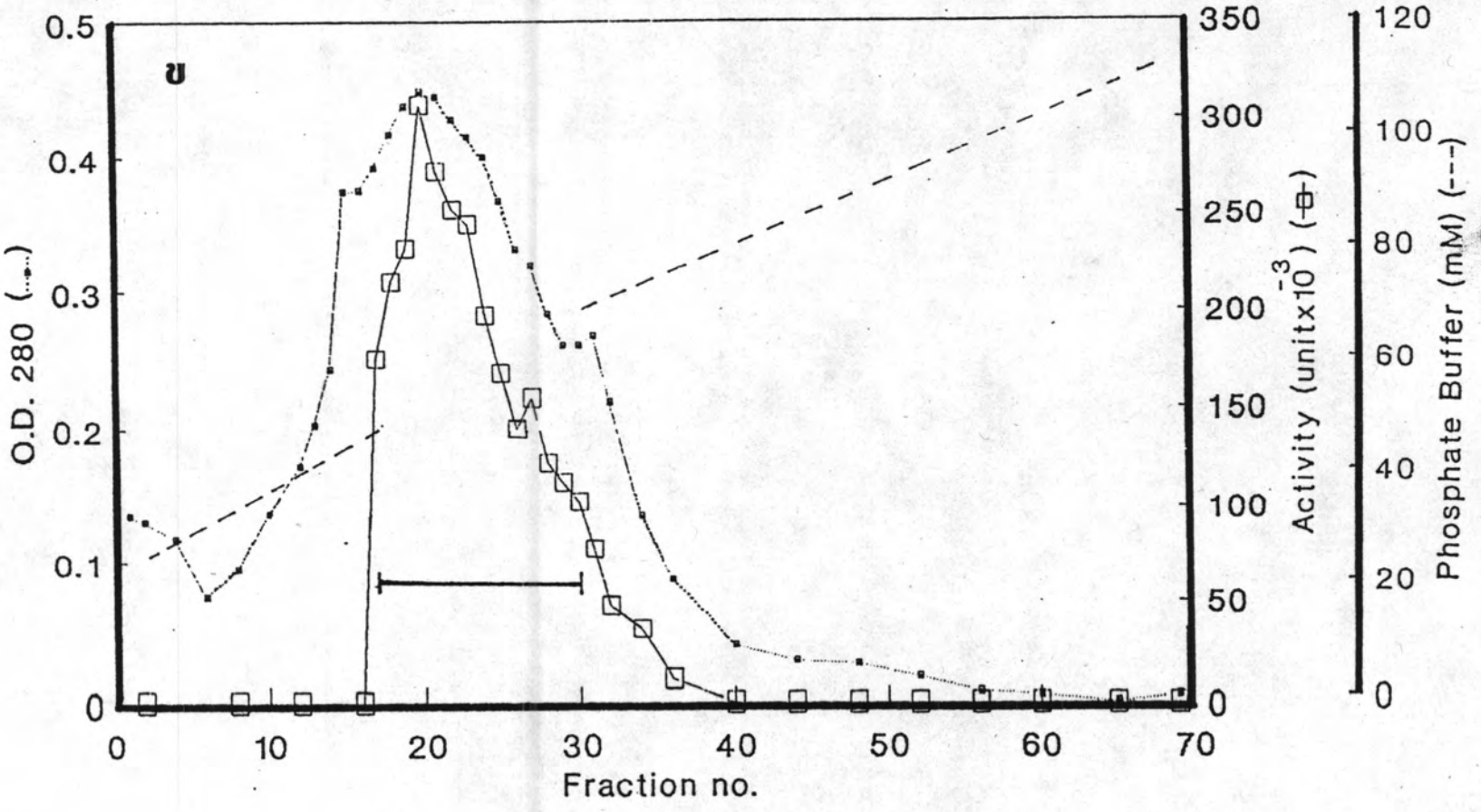
ไซม์ของ FNR ผลการทดลอง (รูป 4.9 ก.) พบว่าการแยกในคอลัมน์สามารถแยกแถบสำคัญ (Rf0.28) ออกมาได้โดยมีแถบอื่นอีก Rf 0.31,0.34 รวม 3 แถบ แสดงว่า สามารถแยกไอโซไซม์ อื่นออกไปได้ถึง 3 แถบ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการแยกในโพลีอะไครลาไมด์เจล แล้วย้อมสีโปรตีน (รูป 4.9ข) พบว่าแถบโปรตีนของเอนไซม์ FNR มีแถบสำคัญ (Rf0.28) ที่เข้มจัดแต่โปรตีนที่อื่นที่ Rf 0.16 ยังคงอยู่ แม้ว่าความเข้มจะลดลง มีปริมาณใกล้เคียงกับแถบสำคัญก็ตามและแถบที่ Rf 0.07 ยังคงอยู่แต่จางมากรวมเหลือ 3 แถบ

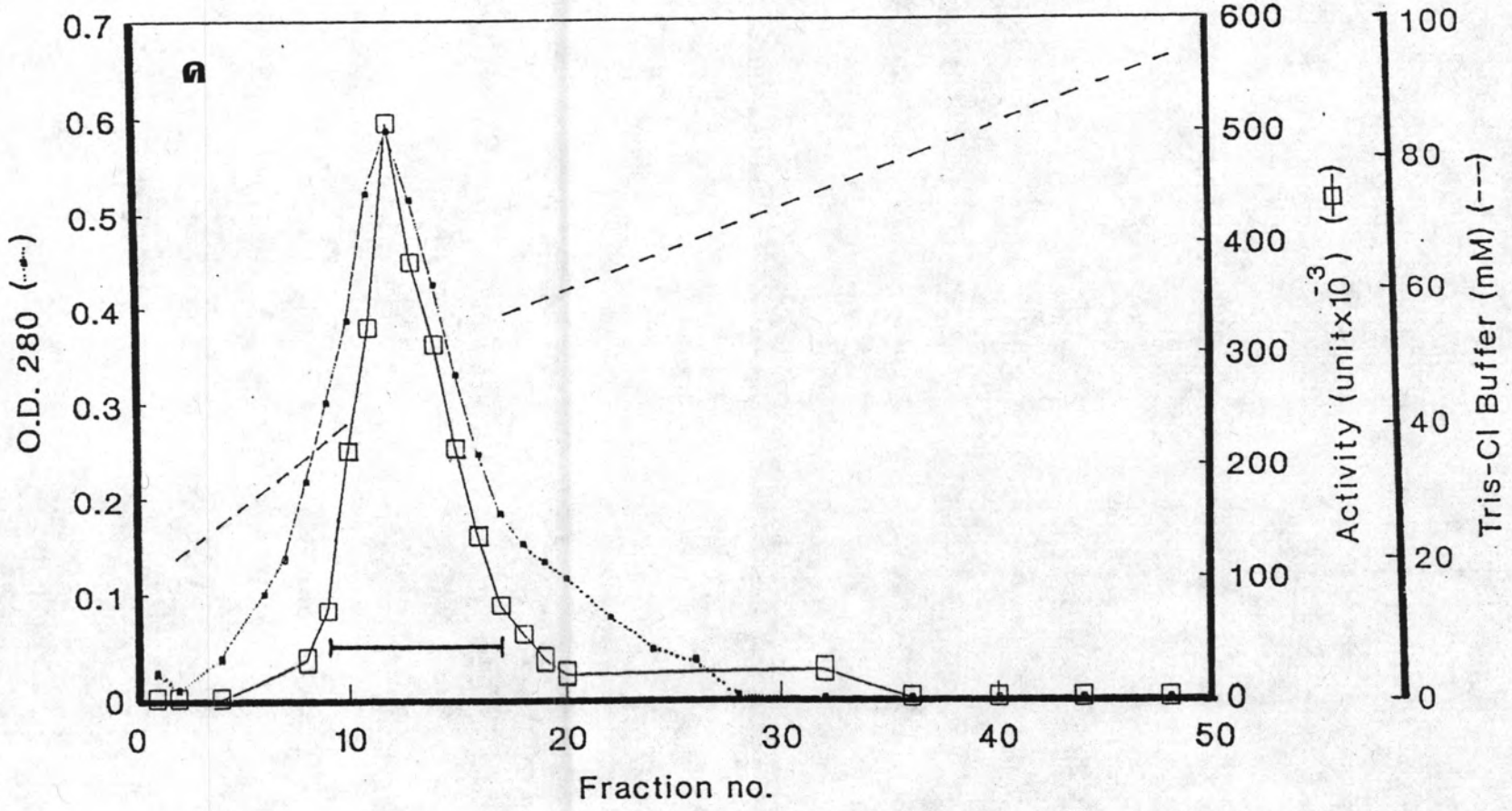
จากผลดังกล่าวแสดงว่าวิธีนี้ไม่สามารถทำให้เอนไซม์ FNR บริสุทธิ์ได้มากนัก น่าจะมีวิธีการที่สามารถกำจัดโปรตีนบางส่วน (Rf 0.07 และ 0.16) ออกไปได้ดีกว่านอกจากนั้นวิธีการดังกล่าวจะมีข้อจำกัดของวิธีการที่ต้องใช้ปริมาณตัวอย่างของเอนไซม์ค่อนข้างมาก และมีการสูญเสียภายในคอลัมน์มาก (% recovery ต่ำ) ดังนั้นจึงตัดขั้นตอนนี้ออกไป

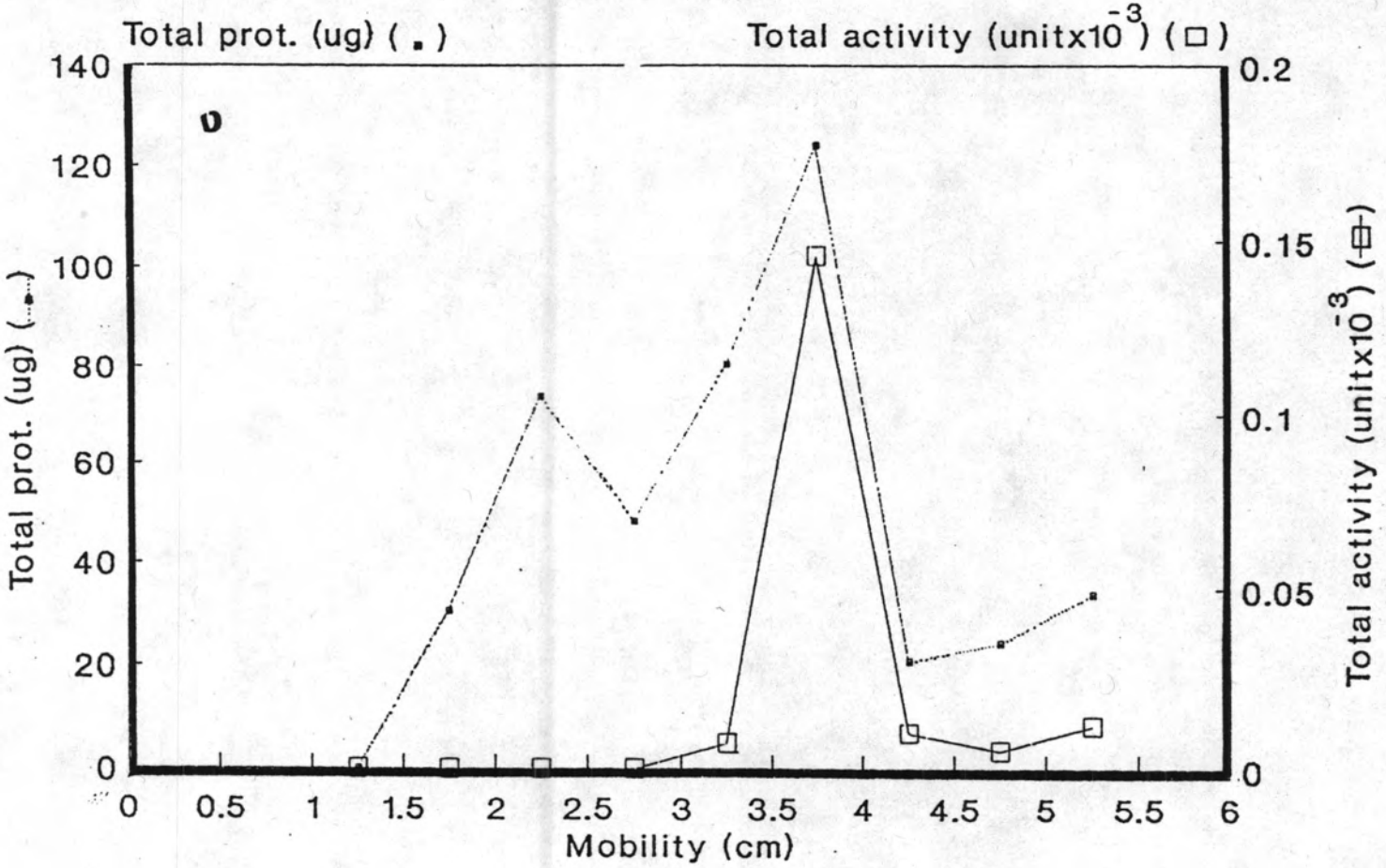
4.5.6 <u>ผลการแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล ครั้งที่ 2</u>

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Ultrafiltration และ ไดอะไลซ์ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ประมาณ 1,000 เท่า หากมีตะกอนนำไปปั่นแยกออกไปนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR และโปรตีน จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปแยกในคอลัมน์ดีอีเอดี-ทริสซาคริล ครั้งที่ 2 (ข้อ 3.11.6) เมื่อไล่ด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ จะไม่มีแอคติวิตีออกมา และเมื่อชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของสารละลายทริสบัฟเฟอร์ความเข้มข้นระหว่าง 30-100 มิลลิโมลาร์จะแยกเอนไซม์ FNR ออกมาได้ (รูป 4.11 ค.) โดยมีผลผลิตประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับการแยกในคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส (ตารางที่ 5)


n
O.D. 280 (----)
Activity (unitx10^{-3}) (⊟)
Tris-Cl Buffer (mM) (---)
Fraction no.
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
300
250
200
150
100
50
0
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100


ข
O.D. 280 (....)
Activity (unitx10^{-3}) (-⊟-)
Phosphate Buffer (mM) (---)
Fraction no.
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
350
300
250
200
150
100
50
0
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70


ก
O.D. 280 (—•—)
Activity (unitx10^-3) (⊟)
Tris-Cl Buffer (mM) (---)
Fraction no.
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
600
500
400
300
200
100
0
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50


Total prot. (ug) (.)
Total activity (unitx10^{-3}) (□)
140
120
100
80
60
40
20
0
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6
Mobility (cm)
Total prot. (ug) (...)
Total activity (unitx10^{-3}) (—)

ตารางที่ 5 สรุปผลการทำให้เอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) บริสุทธิ์สูงตามขั้นตอนต่าง ๆ

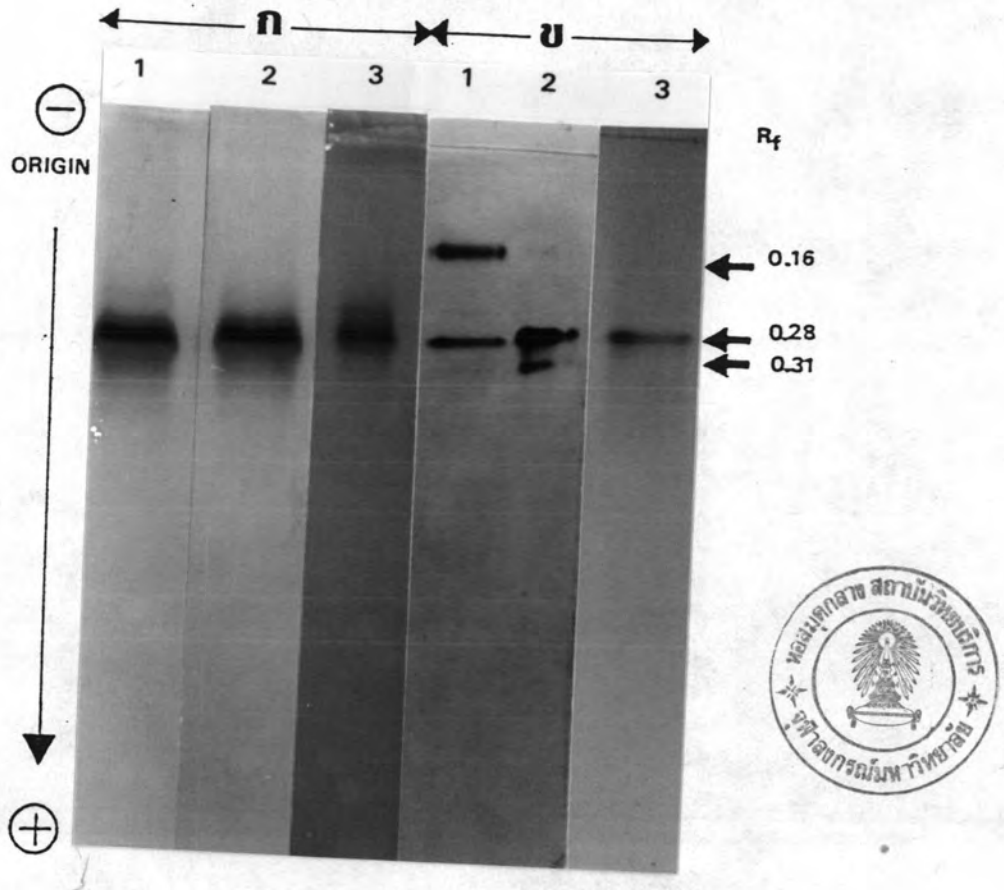
ขั้นตอน การทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	โปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	แอคติวิตีรวม (หน่วย)	ผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
เอนไซม์เริ่มต้น	650	3,478	0.0217	75.4	100	1.0
แอมโมเนียมซัลเฟต (0-70%)	108.8	2,140	0.0285	61.2	81.17	1.31
ดีอีเออี-ทริสชาคริล ครั้งที่ 1 (เกรเดียนท์ ทริสบัฟเฟอร์)	33.26	122.4	0.207	25.28	38.99	9.539
พี11 ฟอสโฟเซลลูโลส (เกรเดียนท์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์)	10.12	33.8	0.412	13.92	18.46	18.97
ดีอีเออี-ทริสชาคริล ครั้งที่ 2 (เกรเดียนท์ ทริสบัฟเฟอร์)	3.94	11.39	0.782	8.91	11.82	36.05
โพลีอะไครละไมด์เจล	5.64	0.124	1.177	0.146	0.19	54.24

เมื่อนำเอนไซม์ FNR ที่แยกได้มาศึกษารูปแบบไอโซไซม์ (รูป 4.12) พบว่าสามารถแยกแถบส่วนใหญ่ (Rf= 0.28) ออกมาได้มีความเข้มสูงที่สุดและมีแถบอื่นอีก (Rf 0.31,0.34) รวม 3 แถบ และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยดูจากแถบโปรตีนในโพลีอะไครลาไมด์เจลพบว่าแถบโปรตีนที่ชัดที่สุด คือ แถบสำคัญ (Rf0.28) แต่ยังคงมีแถบโปรตีนอื่นอยู่อีก (Rf 0.16) ซึ่งก็เหลือน้อยจนแถบโปรตีนจางมาก ดังนั้นจะต้องใช้วิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จากโปรตีนอื่นโดยการแยกจากโพลีอะไครละไมด์เจล

4.5.7 <u>ผลการทำให้เอนไซม์ FNR บริสุทธิ์ในโพลีอะไดลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u>

นำเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ ดีอีเออี ทริสซาคริล ครั้งที่ 2 นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Ultrafiltration หาแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR และโปรตีน แล้วนำไปแยกด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส ชนิดแผ่น (ข้อ 3.11.7) โดยตัดเจลออกไปหนึ่งช่องเพื่อย้อมเป็นต้นแบบในการตัดแถบเอนไซม์ FNR ที่ Rf 0.28 โดยตัดแถบกว้าง 0.5 ซม. และตัดแถบที่อยู่ด้านบน 4 แถบ และด้านล่างอีก3แถบ แยกแถบแต่ละแถบไปบดผ่านหลอดฉีดยา และบดต่อด้วยโฮโมจีไนเซอร์แก้วในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่เสริมด้วย บีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ นำไปปั่นแยกตะกอนเจลออกไป รวบรวมส่วนใสของแต่ละแถบ นำไปทำให้แห้งด้วยวิธีไลโอฟิลล์ไลซ์ (lyophilize) ละลายในบัฟเฟอร์เดียวกันด้วยปริมาตรน้อยที่สุด นำไปปั่นแยกตะกอน นำส่วนใสไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR และหาโปรตีน (ตารางที่ 5)

เมื่อนำเอนไซม์ FNR ไปศึกษาแถบไอโซไซม์ด้วยการแยกในโพลีอะไครละไมด์เจลย้อมสีแอคติวิตี ของ FNR พบว่ามีแถบที่ Rf 0.28 แถบเดียวเท่านั้น



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.12 รูปแบบไอโซไซม์ของ FNR จาก C. reinhardtii ที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ โดยนำมาเปรียบเทียบจำนวนแถบไอโซไซม์และโปรตีนโดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโพรีซิส ด้วยการย้อมสีแอคติวิตี (ก) และย้อมสีโปรตีน (ข)

1. FNR แยกจากคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์-จี-100 (3×10^{-3} หน่วย, 25 μg)
2. FNR แยกจากคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ครั้งที่ 2 ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ (30-100 มิลลิโมลาร์) (3×10^{-3} หน่วย, 25 μg)
3. FNR จากการแยกโดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโพรีซิส (1.5×10^{-3} หน่วย, 15 μg)

และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการย้อมสีโปรตีนพบว่ามีแถบ Rf 0.28 แถบเดียวเช่นกัน (รูป 4.12.) วิธีการนี้จึงสามารถแยกเอนไซม์ FNR ได้บริสุทธิ์เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

4.6 ผลการทำให้เอนไซม์FNR ที่แยกจาก C. reinhardtii สายพันธุ์ต้านพาราควอท(PPQ-10/3) บริสุทธิ์

เมื่อแยกเอนไซม์ FNR จากสาหร่ายสายพันธุ์ต้านพาราควอทนั้นได้ใช้วิธีการ ขั้นตอนตลอดจนสภาวะเดียวกันกันที่ใช้แยก และทำให้เอนไซม์ FNR จากสาหร่ายพันธุ์ดั้งเดิมบริสุทธิ์ ผลการทดลองคล้ายคลึงกับเมื่อใช้กับสายพันธุ์ดั้งเดิม ผลการทดลองสรุปได้ในตารางที่ 6 และรูป 4.13 ก,ข,ค,ง จะเห็นว่าสามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้ 30 เท่า ของแอคติวิตีเริ่มต้นและความบริสุทธิ์ที่แยกด้วยอิเลคโตรโฟรีซีสไว้ได้แถบสีแถบเดิมเดี่ยว ๆ (Rf 0.28) ด้วยเช่นเดียวกัน

4.7 ผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ FNR ที่มีความบริสุทธิ์สูงซึ่งแยกได้จาก C. reinhadtii สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c)และสายพันธุ์ต้านพาราควอท PPQ-10/3

4.7.1 ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาไดอะโฟเรส ในการรีดิวซ์ DCPIP ในสภาพที่มี NADPH ในสภาวะที่กำหนด (ข้อ 3.8) โดยแปรเปลี่ยนค่าพีเอชโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ พีเอช 6-8 (โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์) พีเอช 7-8 (HEPES บัฟเฟอร์) พีเอช 7-9.5 (ทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์) พีเอช 9-10 (คาร์บอเนต บัฟเฟอร์) โดยให้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดมีความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์

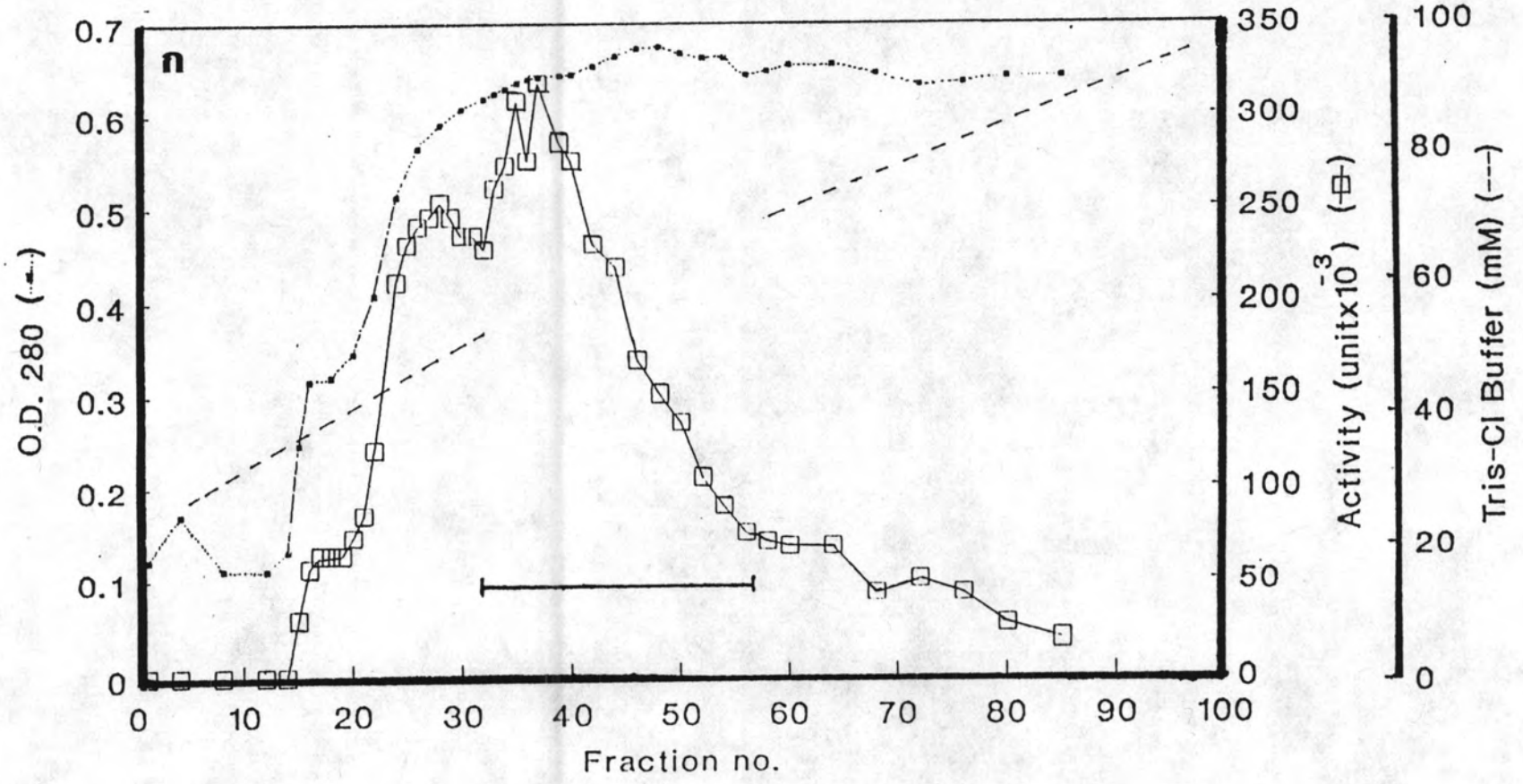
รูปที่ 4.13 ผลการแยกเอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii สายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3) ให้บริสุทธิ์ ตามขั้นตอนต่าง ๆ ตามลำดับ

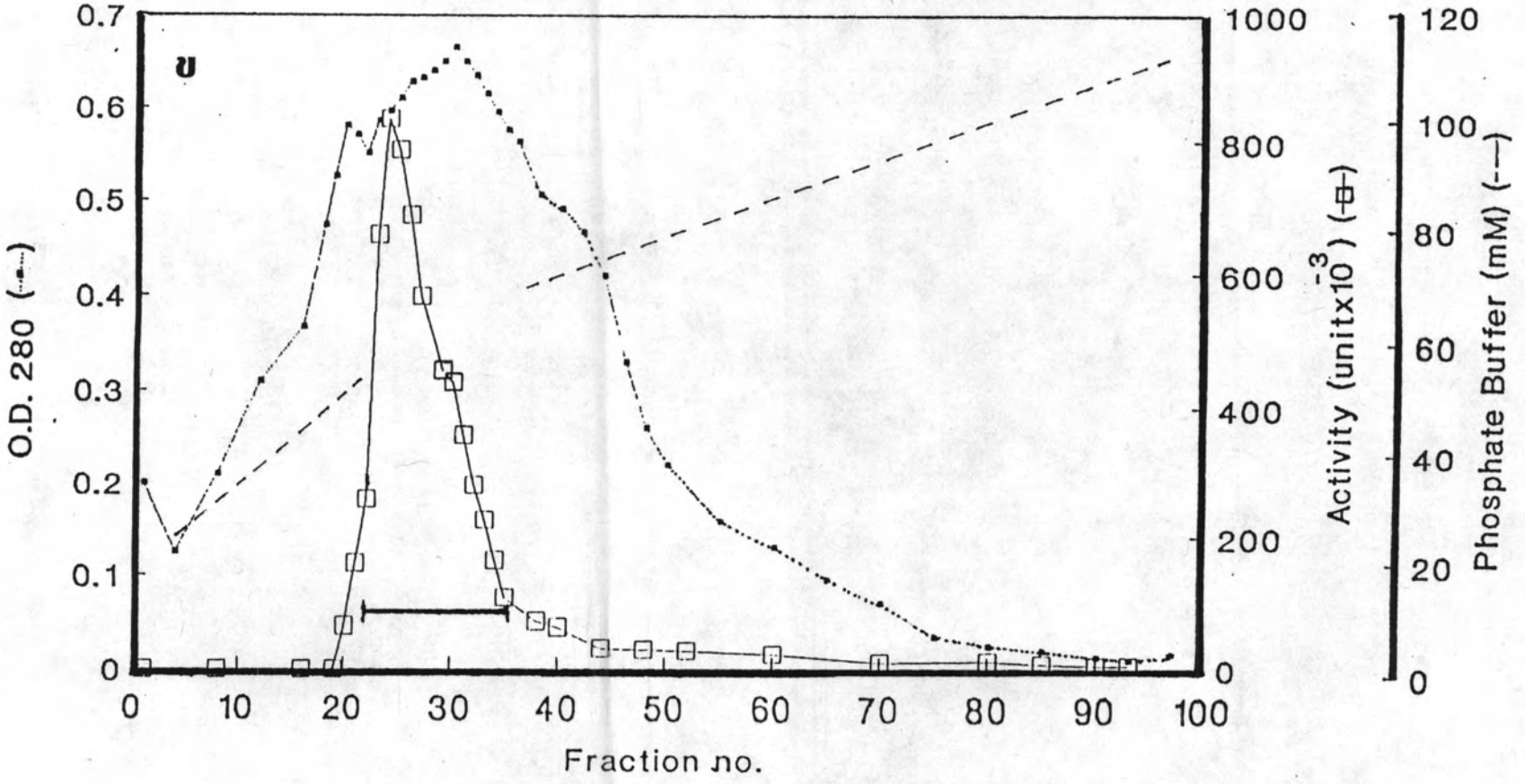
ก. FNR จากคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ครั้งที่ 1 ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ (30-100 mM)

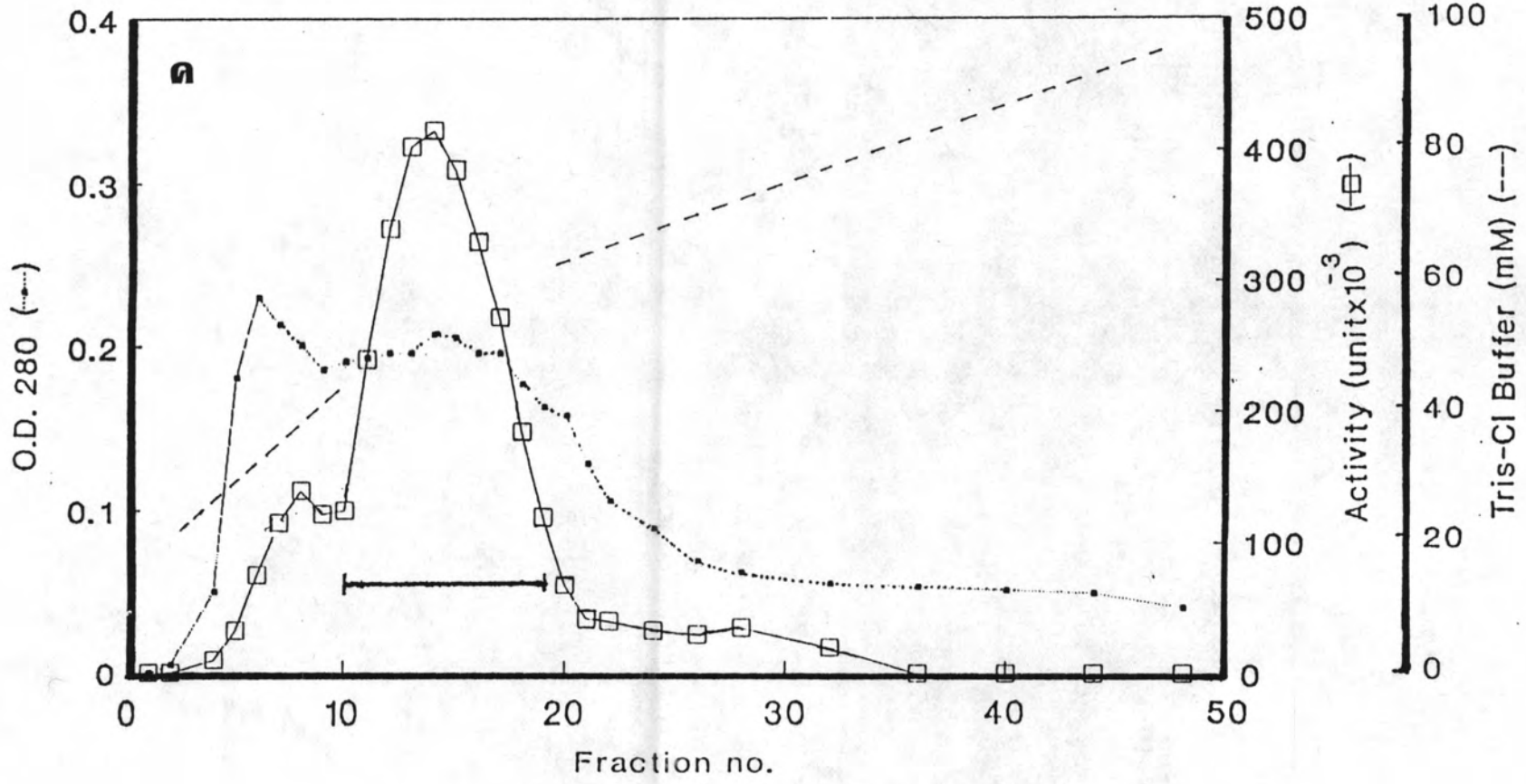
ข. FNR จากคอลัมน์พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (30-120 mM)

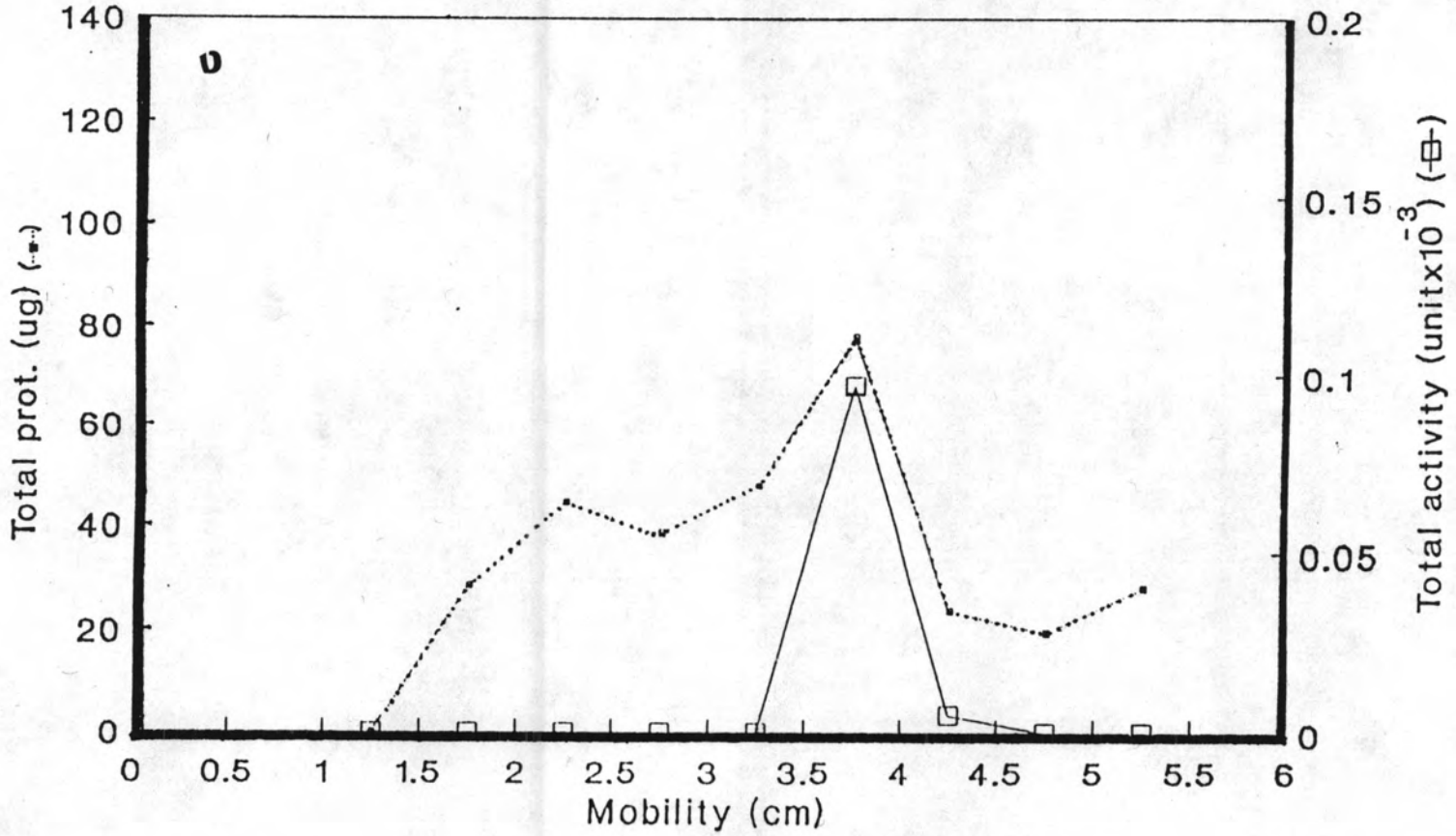
ค. FNR จากคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ครั้งที่ 2 ชะด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ (30-100 mM)

ง. FNR แยกจากโพลีอะไครลาไมด์ เจล


n
O.D. 280 (—•—)
Activity (unitx10^{-3}) (□)
Tris-Cl Buffer (mM) (---)
Fraction no.
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
350
300
250
200
150
100
50
0
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100


a
O.D. 280 (—•—)
Activity (unitx10^{-3}) (—□—)
Phosphate Buffer (mM) (- - -)
Fraction no.
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1000
800
600
400
200
0
120
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100


ก
O.D. 280 (—•—)
Activity (unitx10^{-3}) (—□—)
Tris-Cl Buffer (mM) (---)
Fraction no.
0.4
0.3
0.2
0.1
0
500
400
300
200
100
0
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50


140
120
100
80
60
40
20
0
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
4.5
5
5.5
6
Mobility (cm)
Total prot. (ug)
Total activity (unitx10^{-3})

ตารางที่ 6 สรุปผลการทำให้เอนไซม์FNR จาก C. reinhardtii สายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3) บริสุทธิ์สูงตามขั้นตอนต่าง ๆ

ขั้นตอน การทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	โปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ หน่วย/มก.โปรตีน	แอคติวิตี หน่วย	ผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
เอนไซม์เริ่มต้น	688	3,371.2	0.042	141.7	100	1.0
แอมโมเนียมซัลเฟต (0-70%)	86.1	2,230.9	0.044	99.0	69.87	1.05
ดีอีเออี-ทริสชาคริล ครั้งที่ 1 (เกรนเดียนท์ ทริสบัฟเฟอร์)	16.2	144.0	0.232	33.4	23.54	5.52
พี11 ฟอสโฟเซลลูโลส (เกรเดียนท์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์)	14.0	22.8	0.486	11.1	7.8	11.56
ดีอีเออี-ทริสชาคริล ครั้งที่ 2 (เกรเดียนท์ ทริสบัฟเฟอร์)	3.7	5.1	1.22	6.2	4.38	29.06
โพลีอะไครละไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส	40.2	0.82	1.25	1.02	0.72	29.76

ผลการทดลอง (รูปที่ 4.14) แสดงให้เห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาของ FNR ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์ ดีอีเออี ครั้งที่ 2 คือพีเอช 9.0 โดยทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอทจะมีพีเอชที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน

4.7.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ FNR

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยปฏิกิริยาไดอะโฟเรสในการรีดิวซ์ DCPIP ด้วย NADPH โดยการแปรเปลี่ยนอุณหภูมิตั้งแต่ 20-75°ซ

ผลการทดลอง(รูปที่ 4.15) แสดงว่าเอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) และสายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3) สามารถเร่งปฏิกิริยาไดอะโฟเรสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 65-70°ซ

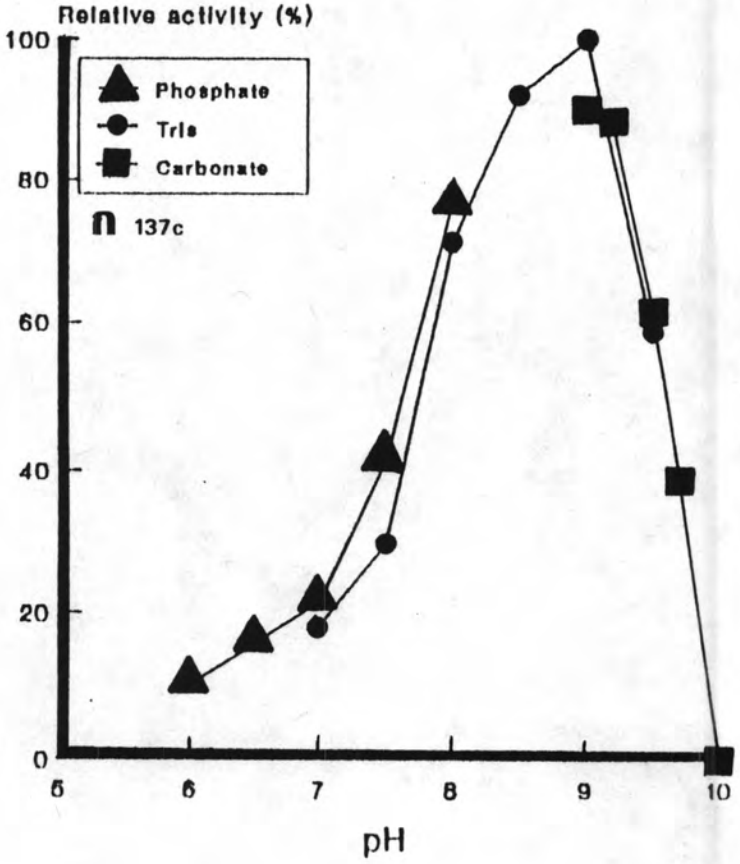
4.7.3 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR เมื่อใช้ NADPH เป็นสับสเตรตโดยให้ DCPIP คงที่และอิ่มตัวหลังจากทำ Lineweaver - Burk Plot ได้ค่า K_m โดยเปรียบเทียบค่า K_m ของเอนไซม์ที่ได้จากเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์ ดีอีเออี ทริสชาคริล ครั้งที่ 2 ของเอนไซม์ที่ได้จาก C. reinhardtii สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท กับเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์จากการแยกโปรตีนแถบเดียวโดยใช้โพลีอะไครละไมด์เจล ในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอท (รูปที่ 4.16 ก,ข,ค และ ง ตามลำดับ)

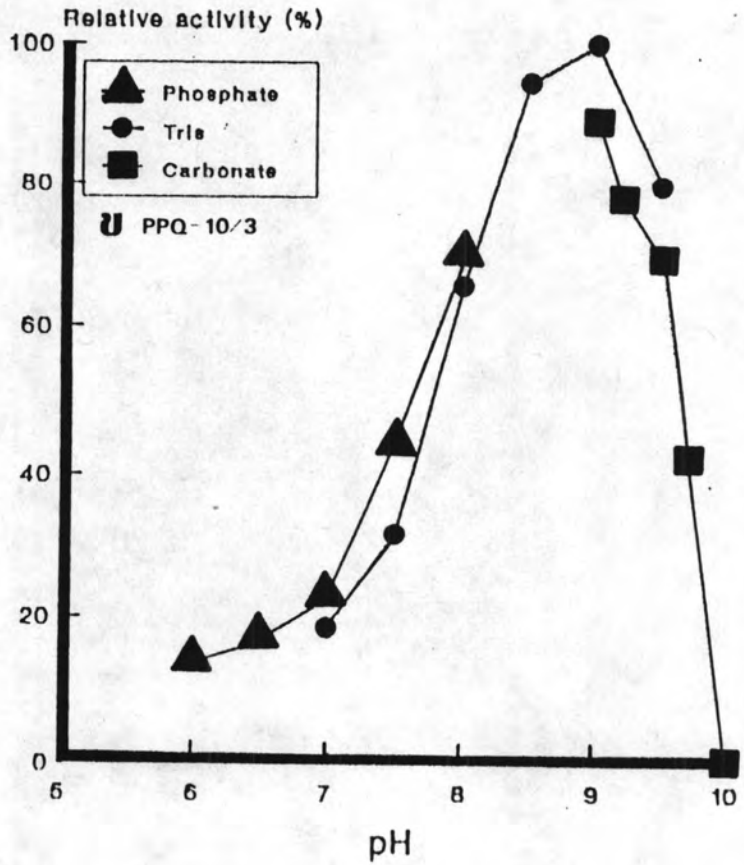
ผลการทดลองได้ค่าจลนศาสตร์ จากการคำนวณในสายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) ได้ค่า K_m ต่อ NADPH = 12.5 + 0.78 ไมโครโมลาร์ส่วนในสายพันธุ์

รูปที่ 4.14 ผลกระทบของพีเอชต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii ที่ทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นต่าง ๆ (ข้อ 4.6) ถึงคอลัมน์ดีเออีทริสชาคริล ครั้งที่ 2 วัดแอคติวิตีโดยวิธีไดอะโฟเรส ในสภาพที่กำหนดในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.03 M) ที่พีเอชต่าง ๆ (พีเอช 6-10)

ก. สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c)

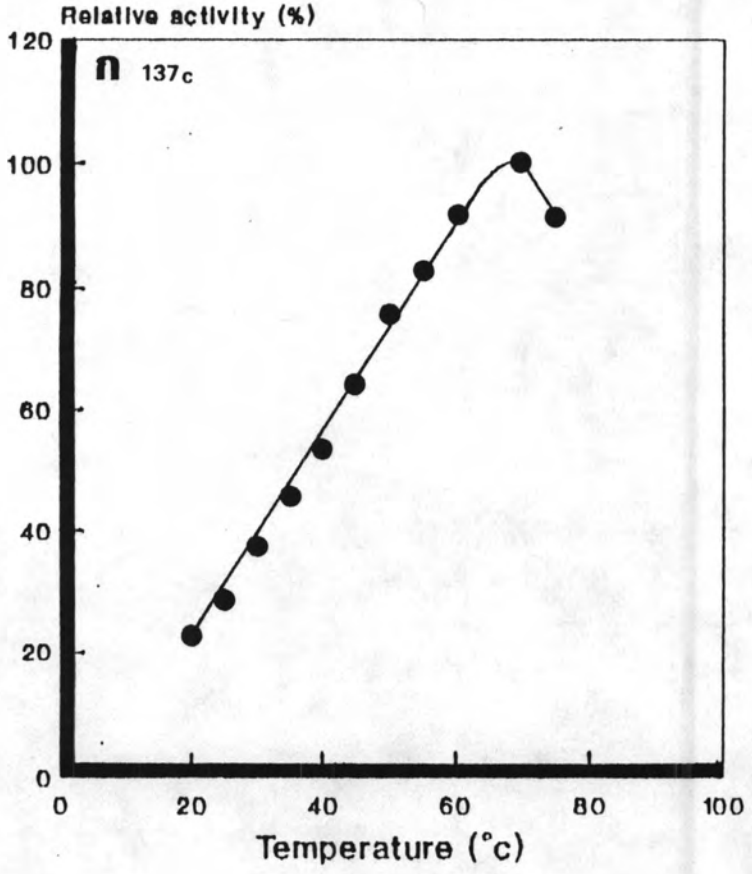


ข. สายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3)

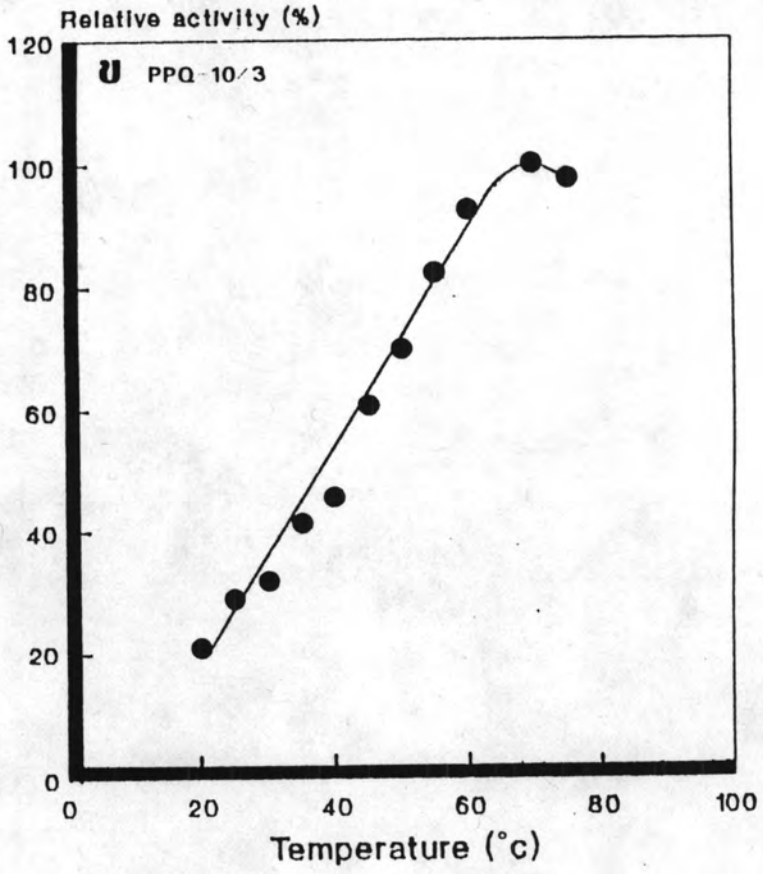


รูปที่ 4.15 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของ FNR จาก C. reinhardtii ที่ทำให้บริ
ต่าง ๆ (ข้อ 4.6) ถึงคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล ครั้งที่ 2 โดยปฏิกิริยาไออะโฟเรส ที่อุณหภูมิ

ก. สายพันธุ์ดั้งเดิม (137c)



ข. สายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3)



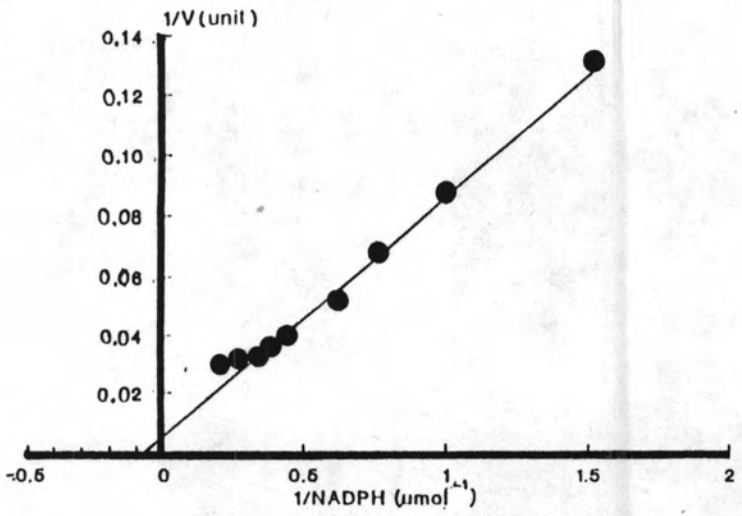
รูปที่ 4.16 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii สองสายพันธุ์ DCPIP ในสภาพที่มี NADPH (ข้อ 3.8) โดยการแปรเปลี่ยนค่า NADPH 0.3-1.5 ไมโครโมลาร์ โดยใช้เอนไซม์จาก

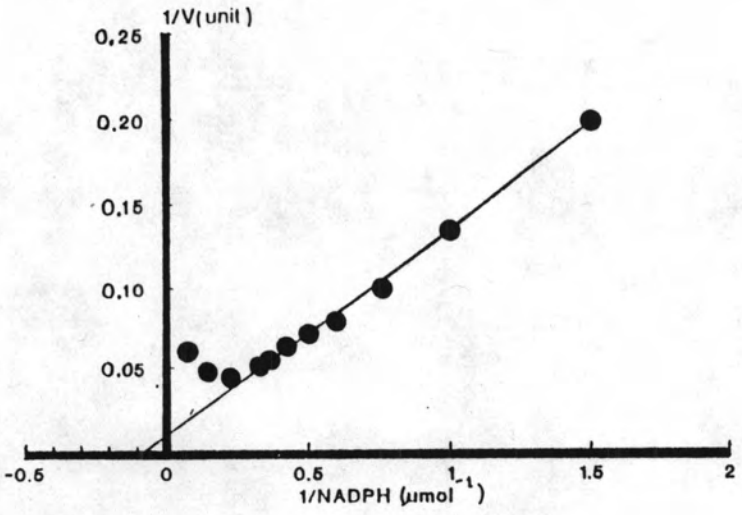
ก. FNR จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ครั้งที่ 2 ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (137c)

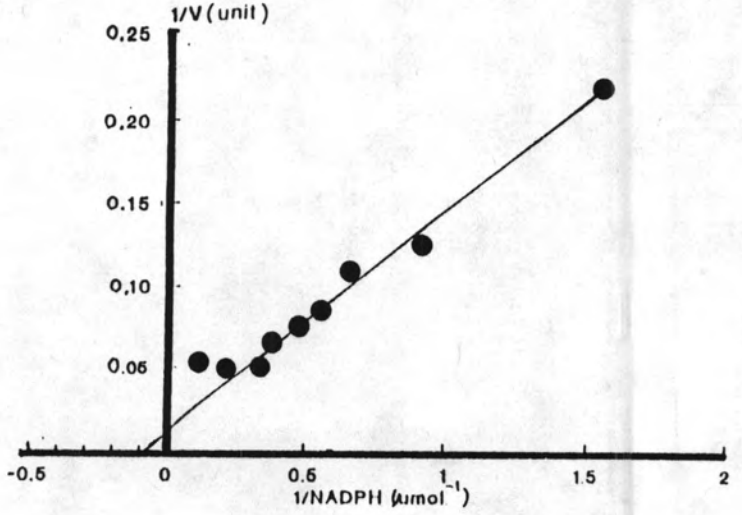
ข. FNR จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์ดีอีเออี-ทริสซาคริล ครั้งที่ 2 ของสายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3)

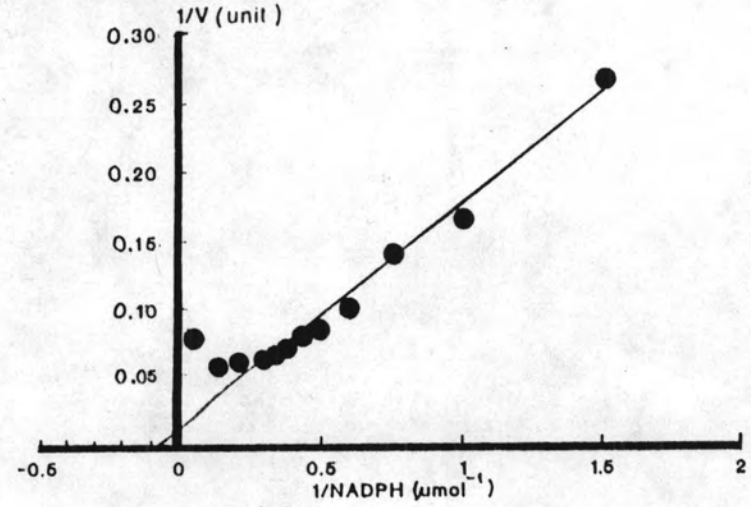
ค. FNR จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในโพลีอะไครลาไมด์เจล ของสายพันธุ์ดั้งเดิม (137c)

ง. FNR จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในโพลีอะไครลาไมด์เจล ของสายพันธุ์ต้านพาราควอท (PPQ-10/3)


1/V (unit)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
1/NADPH (μmol^{-1})


1/V(unit)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
1/NADPH (μmol^{-1})


1/V (unit)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
1/NADPH (μmol^{-1})

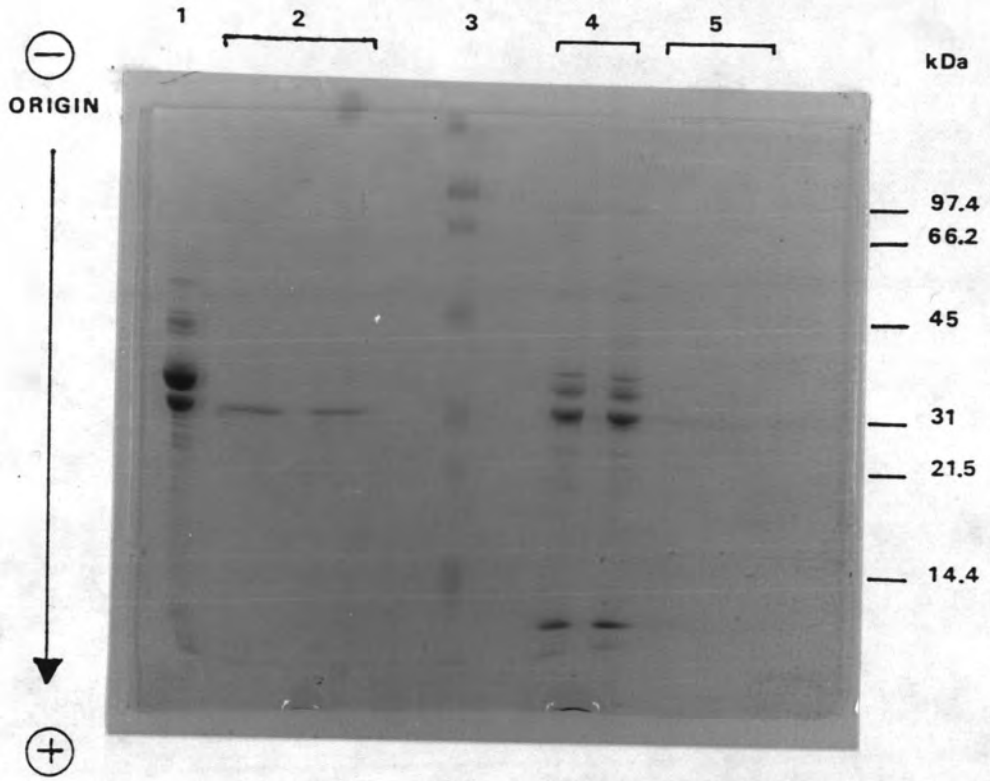

1/V (unit)
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
1/NADPH (μmol^{-1})

ต้านพาราควอท (PPQ -10/3) ได้ค่า K_m ต่อ NADPH = 13.3 + 0.89 ไมโครโมลาร์ ทั้งในเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและเอนไซม์ที่บริสุทธิ์สูง

4.7.4 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของเอนไซม์ FNR ด้วยวิธีโพลีอะไครละไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส ชนิดแผ่น

น่าสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์จากการแยกโปรตีนแถบเดียวโดยใช้โพลีอะไครละไมด์เจล ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ต้านพาราควอทน่ามาแยกด้วยวิธี เอสดีเอส โพลีอะไครละไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส (ข้อ 3.13)

ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ FNR จะมีระยะการเคลื่อนที่อยู่ที่ระยะประมาณ 4 ซม. ทั้ง 2 สายพันธุ์โดยโปรตีนมาตรฐานประกอบด้วย ฟอสโฟรีเลสบีโอวัลบูมิน, คาร์บอนิคแอนไฮเดรส ,ซอยบีน ทริปซินอินฮิบิเตอร์ และไลโซไซม์จะมีระยะการเคลื่อนที่เรียงตามลำดับดังนี้ 0.8,1.3,2.6,4.3,5.7 และ 7.3 ตามลำดับ (รูปที่ 4.17) เมื่อน่ามาเขียนกราฟมาตรฐานจากค่า mobolity ของโปรตีน ทั้งหมดและค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์ FNR จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 ดาลตัน (รูปที่ 4.18)



รูปที่ 4.17 ผลการเปรียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานกับเอนไซม์ FNR จาก C. reinhardtii สองสายพันธุ์ ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี เอสดี เอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

1. FNR ของ C. reinhardtii สายพันธุ์ 137c ที่ทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส
2. FNR ของ C. reinhardtii สายพันธุ์ 137c ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยแยกจากโพลีอะไครลาไมด์เจล
3. โปรตีนมาตรฐาน
4. FNR ของ C. reinhardtii สายพันธุ์ PPQ-10/3 ที่ทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส
5. FNR ของ C. reinhardtii สายพันธุ์ PPQ-10/3 ที่ทำให้บริสุทธิ์แยกจากโพลีอะไครลาไมด์เจล

รูปที่ 4.18 เส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง mobility และค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ FNR โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส