บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง C. reinhardtii

ตามวิธีการของ Surzycki (1971) การเตรียมสารละลาย

3.1.1 สารละลายฟอสเฟต I

ละลายไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 14.34 กรัม และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 7.26 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร

3.1.2 สารละลายฟอสเฟต II

ละลายไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 93.5 กรัม และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 63.0 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร

3.1.3 สารละลายธาตุอาหารรอง (Trace element solution)

Stock A : ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 550 มล. เติมสารละลายต่อไปนี้ตามลำดับ โดยให้สารละลายตัวที่เติมหมดก่อน แล้วจึงเติมสารละลายต่อไป

กรดบอริค (H_3BO_3)	11.4 กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)	22.0 กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2.4H_2O$)	5.06 กรัม

018131

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSo_4.7H_2O$) 4.99 กรัม

โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$) 1.16 กรัม

คอบเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 1.57 กรัม

แอมโมเนียมโมลิปเดท $[NH_4)Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 1.2 กรัม

Stock B : ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 250 มล.

ชั่ง อีดีทีเอ(EDTA ,(disodium salt) 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นด้วยการต้มจนละลายหมด แล้วนำไปผสมกับสารละลาย Stock A ซึ่งก่อนผสมทำให้ Stock A ร้อนอุณหภูมิ 100° ซ. หลังการผสมกับ Stock B แล้วอุณหภูมิจะลดลง ต้มให้ร้อนถึง 100° ซ. อีกครั้งแล้วจึงลดให้อุณหภูมิคงที่ 80-90° ซ. ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 6.5-6.8 ด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 20% ประมาณ100 มล. โดยตั้งมาตรฐานของเครื่องวัดพีเอชด้วยบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ75°ซ. ในระหว่างการปรับพีเอช ระวังอย่าให้อุณหภูมิต่ำกว่า 70°ซ. สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวก่อนและเกิดตะกอนหนักสีส้ม ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร หลังย้ายลงในขวดก้นชมพู่ขนาด 2 ลิตร ปิดปากหลวม ๆ ด้วยสำลี บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง และจะเกิดตะกอนสีส้ม (rust-colored precipitate) มีลักษณะเบาเป็นฝุ่น กำจัดออกโดยการกรอง โดยใช้แรงดูด (suction) สารละลายใสสีม่วงเก็บที่ -20°ซ. เป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี

3.1.4 <u>สารละลายเกลือ</u> (salt solution)

ชั่งแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 8 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. แล้วนำมาผสมกับสารละลายของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.H_2O$) 1 กรัม ละลายในน้ำ 300 มล.

3.1.5 <u>วิธีเตรียมอาหารสูตรต่ำ</u> (Tris minimal phosphate, TMP) จำนวน 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำกลั่น	950 มล.
ทริสมาเบส	2.42 กรัม
สารละลายเกลือ (ข้อ 3.1.4)	50 มล.
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ II (ข้อ 3.1.2)	1 มล.
สารละลายธาตุรอง (ข้อ 3.1.3)	1 มล.
กรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น	1.5 มล.
สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 1 โมลาร์	1 มล.

ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.6 <u>วิธีเตรียมอาหารสูตรแมกนีเซียมสูง</u> (minimal-high magesium, MM) จำนวน 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำกลั่น	900 มล.
สารละลายเกลือ (ข้อ 3.1.4)	50 มล.
สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ข้อ 3.1.2)	50 มล.
สารละลายธาตุรอง (ข้อ 3.1.3)	1 มล.
สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟต 1 โมลาร์	1 มล.

พีเอชของสารละลายที่เตรียมได้ควรประมาณ 7.0 เมื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจะเกิดตะกอนขุ่นขาว ซึ่งตะกอนจะหายไปเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงหากมีตะกอนเหลือเพียงเล็กน้อยก็จะไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์สาหร่าย

3.2 สารละลายสำหรับใช้ทำโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีสชนิดแผ่น (Slab-Polyacrylamide-Gel Electrophoresis)

3.2.1 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเจลที่ใช้แยก (Separating gel)

ละลายทริส 36.6 กรัมในกรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มอล 50มล. เติม TEMED 0.23 มล. ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มอลแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชาหรือขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4° ซ.

3.2.2 สารละลายบัฟเฟอร์สแตคกิงเจล (Stacking gel)

ละลายทริส 5.98 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มอล 48 มล. เติม TEMED 0.46 มล. ปรับพีเอชให้ได้ 6.7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค 1 นอร์มอล แล้วปรับปริมาณให้ครบ 100 มล. เก็บเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

3.2.3 สารละลายอะไครลาไมล์

ชั่งอะไครลาไมด์ 28.8 กรัม และทริส 0.735 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ100 มล. กรองด้วยกระดาษกรองเก็บเช่นเดียวกับข้อ3.2.1

3.2.4 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 10% เตรียม1มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2.5 สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์

ชั่งทริส 6 กรัม และไกลซีน 28.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ

พีเอชให้ได้ 8.3 และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. เวลาใช้เจือจาง 1:100 โดยปริมาตร

3.2.6 สารละลายสีตามรอย (tracking dye)

ชั่งโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.2.7 สารละลายสีย้อมโปรตีน (staining solution)

ละลายโคแมสซิบริลเลียนบลู อาร์-250(Coomassie brilliant blue R-250) 0.25 % ในเมทานอล 45% และกรดอะซิติก 7%

3.2.8 สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution)

ผสมเมทานอล 30% และกรดอะซิติก 7% ในน้ำกลั่น

3.2.9 สารละลายสำหรับย้อมแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR

สารละลายที่ใช้ดัดแปลงจากวิธีการของ Gozzerและคณะ(1977) ประกอบด้วย NADPH 0.2 มิลลิโมลาร์, INT 0.2 มิลลิโมลาร์ ทั้งหมดละลายอยู่ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 8.2

3.3 สารละลายสำหรับเตรียม เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น (Slab-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ดัดแปลงจาก Laemmli,U.K., 1970)

3.3.1 สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์(10 เท่า)

ประกอบด้วยสารละลายของ ทริส 0.25 โมลาร์,ไกลซีน 1.92 โมลาร์,เอสดีเอส 1% ปรับพีเอชของสารละลาย 8.3

3.3.2 สารละลายเจลบัฟเฟอร์ มี 2 ชนิดคือ

3.3.2.1 LGB (lower gel buffer) (4เท่า) ประกอบด้วยสารละลายทริส 1.5 โมลาร์ ,เอสดีเอส 0.4% ปรับพีเอชให้ได้ 8.8

3.3.2.2 UGB (upper gel buffer) (4เท่า) ประกอบด้วย สารละลายทริส 0.5 โมลาร์, เอสดีเอส 0.4% ปรับพีเอชให้ได้ 6.8

3.3.3 สารละลายบัฟเฟอร์เอสดีเอสสำหรับตัวอย่าง (SDS-Gel Loading Buffer) 10X

ใช้สารละลาย UGB เจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1 เท่า ผสมกับเอสดีเอส 4% และ บีต้าเมอร์แคปโตเอทานอล 5%, โบรโมฟีนอลบลู 0.002% และกลีเซอรอล 10%

3.3.4 สารละลายอะไครลาไมด์

ละลายอะไครลาไมด์ 30% และบิสอะไครลาไมด์ 0.8% เตรียมครั้งละ 100 มล. กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชาที่-อุณหภูมิ 7° ซ.

3.3.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 10%เตรียม 1 มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.4 วิธีการเพาะเลี้ยงสาหร่าย C. reinhardtii

3.4.1 การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็น stock culture

เลี้ยงในอาหารเกลือแร่สูตร TMP(ตามวิธีเตรียมในข้อ 3.1.5) โดยเติมวุ้น 1.5% ในหลอดแก้วขนาด 13x16 ซม. (slant culture) วางไว้ในที่มีความเข้มแสง 2,000 ฟุต-เทียน ช่วงให้แสง 16 ชั่วโมง และไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ เซลล์จะเจริญเต็มที่โดยสาหร่ายสายพันธุ์ปกติสามารถนำไปเก็บไว้ในที่มืดเย็น (4° ซ.) เป็นเวลาหลายเดือนหลังจากเจริญเต็มที่แล้ว แต่สายพันธุ์ต้านพาราควอทจะต้องเก็บไว้ในที่มีแสงเป็นเวลา 1 เดือน ดังนั้นจึงต้องเปลี่ยนอาหาร (sub culture) ทุก 1 เดือน

3.4.2 การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเป็น starter

เลี้ยงภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในอาหารเหลวเกลือแร่สูตร TMP (ตามวิธีเตรียมในข้อ 3.1.5) ในขวดก้นชมพู่ (flask)ขนาด 250 มล.ปริมาตรอาหาร 100 มล. โดยใช้เซลล์จาก stock culture ในข้อ 3.4.1 จำนวน 2 ลูป(loop) ตั้งไว้ในที่มีความเข้มแล้วประมาณ 2,000 ฟุต-เทียน ช่วงให้แสง16 ชั่วโมง และไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25° ซ. เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์

3.4.3 การเลี้ยงสาหร่ายเพื่อเตรียมเอนไซม์

เลี้ยงสาหร่ายภายใต้สภาวะปลอดเชื้อในอาหารเกลือแร่สูตรMMP (ตามวิธีเตรียมในข้อ 3.1.6ในขวดก้นชมพู่ ขนาด 4 ลิตร ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร โดยใช้เซลล์จาก Starter ในข้อ 3.4.2 ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^3 -10^5 เซลล์/มล.อาหารโดยให้มีความเข้มแสงที่ข้างขวดเพาะเลี้ยง 4,000 ฟุต-เทียน ช่วงให้แสง 12 ชั่วโมง และไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง ผ่านอากาศปลอดเชื้อให้มีก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ 2-5% โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 25° ซ. เป็นเวลาประมาณ 5-7 วัน (รูปที่ 3.1)

3.5 วิธีการติดตามการเจริญของ C. reinhardtii

ติดตามการเจริญได้ 3 วิธี คือ

3.5.1 วัดปริมาณ ความหนาแน่นของเซลล์ด้วยค่าความขุ่นโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

3.5.2 นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Bright-Line hemacytometer) โดยการตรึงเซลล์ด้วยกลีเซอรอล 5% แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Houtz และคณะ, 1985)

3.5.3 วัดปริมารคลอโรฟิลล์ เอ โดยนำเซลล์ที่ต้องการวัดมากรองแยกอาหารออกด้วยกระดาษกรอง (GF/B Whatman glass filter paper) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.4 ซม. แล้วนำไปสกัดด้วยอะซีโตน 80% จำนวน 10 มล. เก็บไว้ในที่มืดและเย็น (4° ซ.) ทิ้งข้ามคืนแล้วนำมาปั่นแยกตะกอนออกไป นำส่วนใสไปวัดการดูดกลืนแล้วที่ความยาวคลื่น 665, 645 และ 630 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณ คลอโรฟิลล์ เอ จากสูตร (Hansmann, 1975)

คลอโรฟิลล์ เอ (มิลลิกรัม/ลิตร) = $11.6\ OD_{665} - 1.3\ OD_{645} - 0.14\ OD_{630}$ ได้ปริมาณคลอโรฟิลล์ เอ เป็นไมโครกรัม/มล. อาหารหรือไมโครกรัม/10^7 เซลล์

รูปที่ 3.1 การเพาะเลี้ยง C. reinhardtii ในขวดก้นชมพู่ขนาด 4 ลิตร ปริมาตร อาหาร 3 ลิตร ที่ผ่านอากาศปลอดเชื้อที่ปรับแรงดันและปริมาตร ให้มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2-5%อุณหภูมิ 25°ซ ความเข้มแสงที่ด้านข้างขวดประมาณ 4,000 ฟุต-เทียน (Lux)

3.6 การเตรียมเซลล์เพื่อสกัดเอนไซม์

เมื่อเซลล์เจริญถึงระยะที่ต้องการแล้วนำมาปั่นแยกอาหารเพาะเลี้ยงออกไปและล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์(100 มิลลิโมลาร์,พีเอช8.0) ซึ่งมีสารละลายอีดีทีเอ(1.0 มิลลิโมลาร์) เก็บเซลล์ในรูปเซลล์เปียก (packed cell)(Spano และ Schiff,1987)

3.7 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

3.7.1 การเตรียมเอนไซม์ปริมาณน้อย

นำเซลล์ที่เตรียม (ข้อ 3.4) 0.05-0.5 กรัม น้ำหนักเปียก กระจายในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์,พีเอช 8.2 ปริมาตร 6-8 มล. จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (sonictor) ที่ 50% duty cycle output 6 นำสารละลายที่ได้นี้ไปปั่นแยกส่วนใสและตะกอนออกจากกัน (Beckman, J-21C, 10,000 rpm , 1 ชั่วโมง)

3.7.2 การเตรียมเอนไซม์ปริมาณมาก

นำเซลล์ที่เตรียม (ข้อ 3.6) 100-200 กรัม น้ำหนักเปียก กระจายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (10 มิลลิโมลาร์, พีเอช 7.4) มีบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ อีดีทีเอ 1.0 มิลลิโมลาร์, และพีเอมเอสเอฟ (PMSF) 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเปียก จากนั้นจึงทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องใช้แรงดันสูงแบบเฟรนช์ (French Pressure cell) ที่ความดัน 8,000 psi แยกเศษเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเก็บสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.8 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

วิธีการของ Melammed-Harel และคณะ (1985) โดยวัดการรีดิวส์ DCPIP ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR ในสารละลายที่ประกอบด้วย NADPH 33 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย HEPES บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 60 มิลลิโมลาร์ โดยวัดการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 27° ซ. ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณที่ใช้ในการรีดิวส์ 1 ไมโครโมลของ DCPIP ที่สภาวะที่กำหนดในเวลา 1 นาที

3.9 การวัดปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ, 1951)

3.9.1 การเตรียมสารละลายสำหรับหาโปรตีน

3.9.1.1. ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ในน้ำ 100 มล. เก็บไว้ในที่มืดและเย็น (4° ซ.)

3.9.1.2 ละลายไดโซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรด 2% เตรียม 100 มล. เก็บไว้ในที่มืดและเย็น (4° ซ.)

3.9.1.3. ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2% ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

3.9.1.4. สารละลาย A

นำสารละลายในข้อ 3.9.1.1, 3.9.1.2, 3.9.1.3 มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:100 โดยจะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.9.1.5 สารละลาย B (สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์)

ผสมโซเดียมทังสเตต 50 กรัม, โซเดียมโมลิบเดต

12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มล. 85%กรดฟอสฟอรัส 25 มล. และกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 50 มล. ริฟลักซ์ (reflux) ด้วยความร้อนต่ำ ๆ นาน 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม, น้ำกลั่น 25 มล. และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอ ประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มล. เก็บในขวดสีชาป้องกันแสงและเก็บในตู้เย็น เมื่อจะใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร

3.9.2 <u>การวัดปริมาณโปรตีน</u>

นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางด้วย สารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ ให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 20-100 ไมโครกรัม และปริมาตรอยู่ในช่วง 20-100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมสารละลาย A (ข้อ 3.9.1.4) 3 มล. เขย่า (vortex) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย B ในข้อ 3.9.1.5 เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีประมาณ 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากอัลบูมินของซีรัมวัว (Bovine Serum Albumin) (ภาคผนวกที่2)

3.10 <u>การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีการจับกับโคแมสซิบลู</u> (Coomassie Blue Binding) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Bradford, 1976)

3.10.1 ชั่งโคแมสซิบริลเลียน บลู จี-250 100 มก. นำมาละลายอย่างรุนแรงในเอทานอล 95% จำนวน 50 มล. หรือให้สีละลายหมดแล้วผสมกรดฟอสฟอริค 85% จำนวน 100 มล. แล้วจึงเติมน้ำให้ได้ปริมาตรทั้งหมด

1 ลิตร กรองสารละลายที่ได้เก็บในที่มืดและเย็น (4° ซ.)

3.10.2 การวัดปริมาณโปรตีน

นำสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการปริมาณโปรตีนเจือจางด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์10 มิลลิโมลาร์ ที่มีบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 10 มิลลิโมลาร์ ให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 1-10 ไมโครกรัม แล้วจึงเติมสารละลายสำหรับหาโปรตีน (ข้อ 3.10.1) 1 มล.เขย่า นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ภายในเวลา 3-30 นาที หลังจากเติมสารละลายหาโปรตีน นำผลที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากอัลบูมินของซีรัมวัว (Bovine Serum Albumin) (ภาคผนวกที่3)

3.11 วิธีและขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

นำเซลล์สาหร่ายที่เตรียมไว้ในรูป packed cell จำนวนประมาณ 100 -200 กรัม ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์แต่ละครั้ง

3.11.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

เตรียมเอนไซม์เริ่มต้น (ข้อ 3.7.2) นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่าง ๆ โดยสรุปไว้ในแผนภาพในรูปที่ 3.2 ทุกขั้นตอนของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 4-10° ซ. ตลอดการทดลอง

3.11.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ เริ่มต้นมาตกตะกอนโดยการเติมผงเกลือแอมโม

สารละลายเอนไซม์เริ่มต้น

↓

ตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70%

↓

แยกในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล ครั้งที่ 1

(เกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ 10-100 มิลลิโมลาร์)

↓

แยกในคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส

(เกรเดียนท์เส้นตรงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 30-100 มิลลิโมลาร์)

↓

แยกในคอลัมน์ ดีอีเออี ทริสซาคริล ครั้งที่ 2

(เกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ 30-100 มิลลิโมลาร์)

↓

แยกในโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

↓

เอนไซม์ FNR ที่บริสุทธิ์

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ FNR จาก C.reinhardtii ให้บริสุทธิ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนียมซัลเฟตบดละเอียดที่มีความเข้มข้นอิ่มตัวตั้งแต่ 30% จนถึง 80% โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือทีละแฟรคชั่น แฟรคชั่นละ 10% เติมช้า ๆ และขณะเดียวกันก็กวนอย่างช้า ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เมื่อเกลือละลายหมดแล้วกวนต่ออีก 20 นาที แล้วนำแต่ละแฟรคชั่นไปปั่นแยกตะกอนและส่วนใสที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตะกอนมาละลายในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ (10 มิลลิโมลาร์ที่มี บีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1 มิลลิโมลาร์) ด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุดที่จะละลายได้ นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปไดอะไลซ์ ประมาณ 10,000 เท่า ในสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ทิ้งข้ามคืนหากมีตะกอนนำไปปั่นแยกตะกอนออก ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีนาน 1 ชั่วโมง สารละลายที่ได้นำไปหา ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี เปรียบเทียบกับส่วนใส เพื่อหาแฟรคชั่นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้แอคติวิตีจำเพาะและผลผลิตสูงที่สุด

3.11.3 <u>การแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล ครั้งที่ 1</u> (DEAE - Trisacryl)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ไดอะไลซ์มาแยกในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล ขนาด 2.4 x 28 ซม. ที่อิควิลิเบรท (equilibrate) ด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 มีบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 ไมโครโมลาร์ โดยควบคุมอัตราการไหลของบัฟเฟอร์คงที่ 35 มล./ชั่วโมง เมื่อเติมสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์จนหมดแล้วชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ข้างต้น เก็บสารละลายที่แยกจากคอลัมน์ ด้วยเครื่องเก็บแฟรคชั่น โดยเก็บแฟรคชั่นละ 5 มล. ติดตามการแยกโดยการวัดแอคติวิตีของ FNR (ตามวิธีในข้อ 3.8) และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ล้างจนกระทั่งไม่มีโปรตีนออกมา จากนั้นจะชะเอาสารละลายเอนไซม์ FNR ออกมาจากคอลัมน์ด้วยสารละลายเกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้นระหว่าง 30-100 มิลลิโมลาร์

แล้วจึงนำเฉพาะแฟรคชั่นที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.05 หน่วยขึ้นไปมารวมกัน วัดปริมาตร หาแอคติวิตีและวัดปริมาณโปรตีน

3.11.4 <u>การแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส</u> (P 11 Phosphocellulose)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการแยกในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริล นำไปทำให้เข้มข้นด้วย Ultrafiltration และเจือจางให้มีความเข้มข้นของทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ มาแยกในคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลส ขนาด 1.5 x 30 ซม. ที่อิควิลิเบรทด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มีบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ อัตราเร็วการไหลของบัฟเฟอร์ 15 มล./ชั่วโมง เมื่อเติมสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์หมดแล้ว ล้างต่อด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ที่เติมบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแฟรคชั่น โดยเก็บแฟรคชั่นละ 3 มล. ติดตามการแยกโดยการวัดปริมาณโปรตีนจนไม่มีโปรตีนแยกออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงชะเอา FNR ออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายเกรเดียนท์เส้นตรงของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ความเข้มข้นระหว่าง 30-120 มิลลิโมลาร์ 500 มล. ที่เสริมด้วยบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1 มิลลิโมลาร์ วัดแอคติวิตีของ FNR และโปรตีน รวมแฟรคชั่นที่มีแอคติวีตีตั้งแต่ 0.05 หน่วยขึ้นไป

3.11.5 <u>การแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์เซฟฟาเด็กซ์ จี-100</u> (Sephadex G-100)

นำสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลลูโลสไปทำให้เข้มข้นด้วย Uitrafiltration มาแยกในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 1.8

x 90 ซม. ที่อิควิลิเบรทในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มีบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 15 มล./ชั่วโมง เก็บแฟรคชั่นละ 2 มล. ติดตามการแยกด้วยการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ FNR แล้วรวมแฟรคชั่นที่มีแอคติวิตีของ FNR

3.11.6 <u>การแยกเอนไซม์ FNR ในคอลัมน์ดีอีเออี ทริสซาคริส (ครั้งที่ 2)</u>

นำสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์ พี 11 ฟอสโฟเซลูโลสไปทำให้เข้มข้นด้วย Ultrafiltration แล้วนำไปไดอะไลซ์ ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มีบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1.0 มิลลิโมลาร์ ประมาณ 10,000 เท่า แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ดีอีเออีทริสซาคริส ขนาด 0.9 x 15 ซม. ที่อิควิลิเบรทในบัฟเฟอร์เดียวกัน อัตราการไหลของบัฟเฟอร์ 15 มล./ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม เก็บสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแฟรคชั่น เก็บแฟรคชั่นละ 2 มล. ติดตามการแยกโดยการวัดปริมาณโปรตีน (OD_{280}) จนไม่มีโปรตีนแยกออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงชะ FNR ออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายเกรเดียนท์เส้นตรงของทริสบัฟเฟอร์ พี-เอช 7.4 ความเข้มข้นระหว่าง 30-100 มิลลิโมลาร์ ที่มีบีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 มล. หลังจากวัดแอคติวิตีของ FNR และโปรตีนแล้ว รวมแฟรคชั่นที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ ตั้งแต่ 0.05 หน่วยขึ้นไปเข้าด้วยกัน

3.11.7 <u>การแยกเอนไซม์ FNR ด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลแผ่นบาง</u>

(Slab-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

นำเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี ทริสชาคริล (ครั้งที่ 2) นำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย Ultrafiltration แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ เพิ่มขึ้นด้วยการแยกในโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส ชนิดแผ่น โดยให้มีปริมาณแอคติวิตี 0.003-0.004 หน่วย หลังจากแยกด้วยวิธี อิเลคโตรโฟรีซีสจนแถบสีตามรอยเคลื่อนที่ลงมา ห่างจากด้านล่างของเจลประมาณ 1 ซม. ปิดกระแสไฟฟ้าแล้วแกะเจลออกจากกระจก ตัดเจลตามความยาวออกมา 1 ช่อง นำไปย้อมแอคติวิตีเวลา ประมาณ 30 นาทีในกระบะน้ำแข็ง เมื่อเห็นแถบสีของเอนไซม์ FNR บนเจลที่ตัดไปย้อมแล้วนำมาวางต่อบนเจลเดิมที่ตัดออกไป จากนั้นจึงตัดเจลตามขวางโดยดูจากแถบสีเอนไซม์ที่ชัดที่สุดเป็นแถบตั้งต้น ตัดให้แถบสีอยู่ตรงกึ่งกลางมีขนาดความกว้างแถบละ 0.5 ซม. แล้ววัดเหนือแถบแรกขึ้นไปด้านบนอีก 4 แถบและด้านล่าง 3 แถบ นำแถบเจลที่ตัดได้แต่ละแถบมาบดให้ละเอียดในหลอดฉีดยาชนิดแก้ว (syringe) ขนาด 5 มล. เติมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่เสริมด้วย บีตา-เมอร์แคปโตเอทานอล 1 มิลลิโมลาร์) ลงไปในหลอดฉีดยา 1 มล. เจลจะถูกอัดผ่านลงมาในช่องเล็ก ๆ ของหลอดฉีดยา ลงในหลอดรองรับเจล เทเจลนั้นลงในกระบอกฉีดยาเดิมแล้วทำเช่นเดิมอีก 2 ครั้ง นำเจลที่บดแล้วนี้มาบดให้ละเอียดยิ่งขึ้นอีกด้วย hand homogenizer เติมสารละลายบัฟเฟอร์เดิมอีก 1.5 มล. อิควิลิเบรททิ้งไว้ข้ามคืน แล้วนำมาปั่นแยกเจลให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 g 1 ชั่วโมง ดูดส่วนใสนำไปทำให้แห้งด้วยการไล-โอฟิลไลซ์ (lyophylize) ด้วยเครื่อง Freeze dryer จนแห้ง นำมาละลายในบัฟเฟอร์เดิมด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุด ประมาณ 50 ไมโครลิตร ต่อเจล 1 แผ่น นำมาปั่นแยกตะกอนที่ติดมาด้วยความเร็ว 13,000 g 30 นาที นำเอนไซม์ที่แยกได้หลาย ๆ ครั้งมารวมกันแล้วหาแอคติวิตีและโปรตีน นำผลของแอคติวิตีและโปรตีน

ของเจลแต่ละแถบที่ตัดออกมาเขียนกราฟเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ แอคติวิตี และโปรตีนของเอนไซม์ FNR ที่แยกได้ที่ระยะต่าง ๆ ของการเคลื่อนที่

3.12 การศึกษารูปแบบการสังเคราะห์เอนไซม์ FNR และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ในขั้นตอนต่าง ๆของการทำให้บริสุทธิ์นำไปศึกษาชนิดของไอโซไซม์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการแยกโดยเทคนิคอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส (polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli,1970) ที่ความเข้มข้นของ acrylamide 8.5% discontinuous

3.12.1 การเตรียมโพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น

เตรียมเจลสำหรับแยก (separating gel) ผสมสารละลายอะไครลาไมด์(ข้อ 3.2.3) 18.2 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 3.2.4) 300 ไมโครลิตร กวนให้เข้ากันแล้วบรรจุลงในช่องว่างระหว่างกระจกที่เตรียมไว้ (18 x 16 ซม. ความหนา 1 มิลลิเมตร) ให้มีความสูง 12 ซม. ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างแผ่วเบาและรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงว่าการโพลีเมอร์ไรเซชั่นของเจลเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว เทน้ำทิ้งแล้วใช้น้ำกลั่นล้างเจลส่วนที่ยังโพลีเมอร์ใช้ไม่หมดออกไปหลาย ๆ ครั้ง ซับน้ำให้แห้ง แล้วเตรียมสแตคกิงเจล (stacking gel) โดยการผสมสารละลายอะไครลาไมด์ 2.0 มล. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับ สแตคกิงเจล 2.5 มล. และน้ำกลั่น 15.2 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงไปบนเจลแยกที่เตรียมไว้จนเกือบเต็มแล้วจิงใส่หวี (comb) เพื่อทำช่องใส่ตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่จะแยก มีความกว้าง

ช่องละ 1 ซม. ลึก 2 ซม. ทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมง จนเจลแข็งตัวเห็นรอยต่อระหว่างหวีและเจลอย่างชัดเจน จึงเอาหวีออกแล้วล้างช่องใส่ตัวอย่างหลาย ๆ ครั้งด้วยน้ำกลั่นเติมสารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ ลงไปในช่องตัวอย่างดังกล่าวจนเต็ม เพื่อรอการนำไปใช้ทดลองต่อไป

3.12.2 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส เพื่อแยกเอนไซม์ FNR

ประกอบแผ่นกระจกที่มีเจลที่เตรียมไว้เข้ากับเครื่องแล้วเติมอิเลคโทรด-บัฟเฟอร์ เอนไซม์ที่เตรียมไว้ (เอนไซม์ผสมกับ 10% กลีเซอรอลและ 5% บรอมฟีนอลบลู) ลงในช่องเจล โดยควบคุมให้ปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 50-100 ไมโครกรัมต่อช่องเจล และแอคติวิตีอยู่ระหว่าง 0.002-0.003 หน่วย ผ่านกระแสไฟฟ้า 30-40 มิลลิแอมแปร์ ต่อเจลโดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน เมื่อแถบสีตามรอยเคลื่อนที่ไปจนอีก 1 ซม. จะถึงปลายด้านล่างของเจล จึงตัดกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นแกะแผ่นเจลออกจากกระจก แล้วนำมาย้อมสีโปรตีนที่เตรียมไว้ใน (ข้อ 3.2.7) หลังจากแช่ไว้ประมาณ 1.2 ชั่วโมง นำเจลมาล้างในสารละลายล้างสีย้อมโปรตีน (ข้อ 3.2.8) จนกระทั่งสังเกตพบเจลส่วนที่ไม่มีโปรตีนใส

3.12.3 การตรวจสอบแอคติวิตีของ FNR ด้วยวิธีแผ่นอะไครลาไมด์เจล

แกะแผ่นเจลออกจากกระจก แล้วนำมาย้อมสีแอคติวิตีด้วยสารละลายที่เตรียมไว้ (ข้อ 3.2.9) โดยทิ้งเจลไว้ในสารละลายข้ามคืนจึงล้างสีย้อมออกด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งบริเวณเจลที่ไม่มีแอคติวิตีใส นำไปส่องดูแถบสีภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์

3.13 <u>การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเอสดีเอส โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส</u> (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (ดัดแปลงจาก Laemmli, UK, 1970)

3.13.1 <u>การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น</u>

เตรียมเจลสำหรับแยก (separating gel) โดยผสมสารละลาย-ไครละไมด์ 9.5 มล. ในน้ำกลั่น 8.2 มล. สารละลาย LGB (4x) (ข้อ 3.3.2.1) 5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย TEMED 70 ไมโครลิตร และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 3.3.5) ผสมให้เข้ากันแล้วรีบบรรจุลงในช่องของแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ (ขนาด 14 x 16 ซม.) ซึ่งมีความหนาของเจล 0.75 มิลลิเมตร ให้มีความสูง 12 ซม. ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนหน้าเจลอย่างแผ่วเบาและรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำอย่างชัดเจน แสดงว่า การโพลีเมอร์ไรเซชั่นของเจลเกิดอย่างสมบูรณ์แล้ว ใช้น้ำกลั่นล้างเจลส่วนที่ยังโพลีเมอร์ไรซ์ไม่สมบูรณ์ออกไปหลาย ๆ ครั้ง ซับน้ำให้แห้ง แล้วเตรียมสแตคกิง (stacking gel) โดยผสมสารละลายอะไครลาไมด์ (ข้อ 3.3.4) 1.8 มล. ในน้ำกลั่น 7 มล. สารละลาย UGB (4x) (ข้อ 3.3.2.2) 3 มล.ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย TEMED 15 ไมโครลิตร และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 3.3.5) ผสมให้เข้ากันแล้วรีบเทลงในเจลแยกที่เตรียมไว้แล้วจนเกือบเต็มแล้วใส่หวี (comb)ลงไปเพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับใส่ตัวอย่าง ทิ้งไว้ประมาณครึ่งชั่วโมง รอจนเห็นเจลแข็งเป็นรอยแยกระหว่างเจลและหวี จึงเอาหวีออกและล้างช่องใส่ตัวอย่างหลาย ๆ ครั้งด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงใส่สารละลายอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ไปในช่องตัวอย่างเพื่อรอนำไปให้ใช้ทดลองต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.13.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ฟอสโฟรีเลสบี (Phosphorylase B) น้ำหนักโมเลกุล 97,000 ดาลตัน อัลบูมินของซีรัมวัว (Bovine Serum Albumin, BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,200 ดาลตัน โอวัลบูมิน(Ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน คาร์บอนิค แอนไฮเดรส(Carbonic Anhydrase) น้ำหนักโมเลกุล 31,000 ดาลตัน ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Soybean Trypsin Inhibitor) น้ำหนักโมเลกุล 21,000 ดาลตัน ไลโซไซม์ (Lysozyme) น้ำหนักโมเลกุล 14,400 ดาลตัน

3.13.3 การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์

ผสมบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer) (ข้อ 3.3.3)1 ส่วน ในสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ 1 ส่วน ในหลอดทดลองขนาดเล็ก(micro fuge tube) (ความเข้มข้นของโปรตีน 0.5-1 มก./มล.) แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 100° ซ. เป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่เย็นแล้วนำไปปั่นเพื่อแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนใสออกมาใส่หลอดใหม่ นำส่วนผสมนี้ไปหยอดลงบนเจลที่เตรียมไว้ โดยให้มีปริมาณโปรตีน อยู่ในช่วง 10-50 ไมโครกรัม ต่อช่องใส่ตัวอย่าง

3.13.4 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

ประกอบแผ่นกระจกที่มีเจลที่เตรียมไว้ (ข้อ 3.13.1)เข้ากับเครื่องแล้วเติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ข้อ 3.3.1) ลงในถังใส่บัฟเฟอร์ทั้งข้างบนและข้างล่าง หยอดสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่เตรียมไว้ (ข้อ 3.13.3) ลงในช่องเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 30-40 มิลลิแอมแปร์/เจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน เมื่อแถบสีตามรอยเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะทางอีก 1 ซม. จะถึงปลายด้านล่างของเจล

จึงตัดกระแสไฟฟ้า

3.13.5 การย้อมสีโปรตีนในเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจล

แกะเจลออกจากกระจก แล้วนำมาย้อมสีโปรตีน ตามวิธีในข้อ 3.12.4

3.13.6 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

วัดระยะทางที่แถบโปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่และระยะที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่บนแผ่นเจลนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า mobility ของโปรตีนโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{mobility} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

คำนวณหาค่า mobilityของเอนไซม์ FNR แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน