บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การกรีดและเก็บรักษายางมะละกอ

ใช้มีดสแตนเลสกรีดผลมะละกอพันธุ์แขกดำที่แก่เต็มที่อายุประมาณ 2.5-3 เดือน โดยกรีดตั้งแต่ด้านขั้วผลลงมาตามยาวจนถึงส่วนปลายผล ลึกไม่เกิน 2 มิลลิเมตร จำนวน 3 แผล เว้นระยะห่างและความยาวให้เท่ากัน ใช้ถ้วยพลาสติครองรับน้ำยาง โดยใช้ลวดผูกติดกับถ้วยและอีกปลายหนึ่งผูกติดกับขั้วผล เมื่อน้ำยางหยุดไหลแล้ว ชูดยางส่วนที่จับเป็นก้อนที่ผลรวบรวมลงในถ้วยพลาสติคด้วย เว้นระยะการกรีดไป 4 วัน แล้วจึงกรีดแผลใหม่อีก 3 แผล กรีดทั้งหมด 4 ครั้ง หลังการกรีดให้ใช้สำลีชุบสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมซัลเฟต ช่วงเวลาที่กรีดควรอยู่ในระหว่าง 6.00-10.00 น. (ประเทือง จุลเอียด,2533 ; Madrigal และคณะ,1980) นำน้ำยางที่กรีดได้มาเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียสทันที แยกเอาน้ำยางมะละกอมาส่วนหนึ่ง เติมเอทธิลีนไดเอมีนเตตราอะซิติค เอซิด (EDTA)และโซเดียมไบซัลไฟต์ ลงไป 0.2 เปอร์เซนต์และ 1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักตามลำดับ จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6-8 ชั่วโมง น้ำยางมะละกอแห้งที่ได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างไปศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ต่อและเก็บตัวอย่างบางส่วนมาวิเคราะห์แอคติวิตี และ ปริมาณโปรตีนในเวลาต่างๆเพื่อศึกษาความเสถียรในการเก็บรักษายางมะละกอ

3.2 การเตรียมสารละลายยางมะละกอ

นำน้ำยางมะละกอที่แช่แข็งไว้มาละลายทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 1 ส่วนต่อน้ำยางมะละกอ 3 ส่วน คนให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกเก็บเฉพาะส่วนน้ำใส

(crude enzyme)เอาไว้เพื่อจะนำไปศึกษาการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ต่อไป

3.3 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของไบยูเรต

3.3.1 การเตรียมสารละลาย

สารละลายไบยูเรต

ชั่ง คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) จำนวน 1.5 กรัม และ โซเดียม-โปตัสเซียม ตาร์เตรต จำนวน 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 300 มล. ผสมลงไป ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร(เติมโปตัสเซียมไอโอไดด์ 1 กรัม ลงไปด้วย จะทำให้สามารถเก็บสารละลายนี้ไว้ได้นานในภาชนะพลาสติค)

3.3.2 การวัดปริมาณโปรตีน

นำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มล. เติมสารละลายไบยูเรต 2.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร อ่านค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin(BSA) ที่มีความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

3.4.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนโดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท (ดัดแปลงจาก FAO/WHO Expert Committee on Food Additives,1981)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟต

ชั่ง $Na_2HPO_4.2H_2O$ 8.9 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. แล้วปรับจนให้มีปริมาตร 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายซิตริค

ชั่งกรดซิตริค 10.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มล.

สารละลายเคซีน

ชั่งเคซีน(Casein hammarsten) จำนวน 1 กรัม ละลายใน 50 มล.ของสารละลาย 0.5 โซเดียมฟอสเฟต นำไปให้ความร้อนและคนจนเคซีนละลาย ทิ้งให้เย็น ปรับ pHเป็น 6.0 ด้วยสารละลายซิตริค เติมน้ำจนมีปริมาตร 100 มล.

สารละลาย Phosphate-Cysteine-EDTA

ชั่ง $Na_2HPO_4.2H_2O$ 2.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มล. เติม EDTA 0.93 กรัม และ Cystaine.HCl 0.785 กรัม คนให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 6.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปรับปริมาตรเป็น 250 มล.

สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติค

ชั่ง กรดไตรคลอโรอะซีติค 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.

การวัดแอคติวิตี

นำสารละลายเคซีน 5 มล. บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางด้วยสารละลาย Phosphate-Cysteine-EDTA pH 6.0 2 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติค 30% นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้เติมสารละลายเอนไซม์

1 หน่วยเอนไซม์(CDU) คือ ปริมาณเพปไทด์หรือกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเคซีน ในเวลา 1 นาที ที่ 40 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ทำการทดลอง โดยเปรียบเทียบเป็นไมโครโมลของไทโรซีน

3.4.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนโดยใช้ BAEE เป็นสับสเตรท (ดัดแปลงจาก Smith และ Parker,1958)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย 0.05 โมลาร์ BAEE

ชั่ง N-α-Benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) 0.857 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มล.

สารละลาย 3 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์

ชั่ง โซเดียมคลอไรด์ 15.52 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มล. แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

สารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (standardized)

ชั่ง 4 กรัมของโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำกลั่นให้ละลาย ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

ผสมสารละลาย BAEE 0.5 โมลาร์ จำนวน 8 มล.และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 3 โมลาร์ จำนวน 1 มล. นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วลงไป 1 มล. วัด pH เริ่มต้น จากนั้นใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไตเตรตจน pH คงที่ เป็นเวลา 20 นาที บันทึกปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ในการไตเตรต

1 หน่วยเอนไซม์คือ ปริมาณBAEE ที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ที่ 50 องศาเซลเซียส

3.4.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนโดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท (ดัดแปลงจาก Arnon , 1965)

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย BAPNA

ชั่ง Benzoyl-L-arginine p-nitroanilide(BAPNA) 43.5 มิลลิกรัม ละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มล. และ ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มล. ด้วย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 (สารละลายนี้ควรเก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส)

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

บ่ม สารละลาย BAPNA จำนวน 5 มล. ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วลงไป 1 มล. ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย 30% กรดอะซีติกลงไป 1 มล. วัดปริมาณของ p-nitroaniline ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้เติมสารละลายเอนไซม์

1 หน่วยเอนไซม์คือปริมาณของ p-nitroaniline ที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ที่ 50 องศาเซลเซียส โดยคำนวณจากค่า molar extinctionของ p-nitro aniline ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (ϵ) = 8,800 (วิธีคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์แสดงในภาคผนวกที่ 3)

3.5 ขั้นตอนในการทำเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ จะเริ่มจาก crude enzyme ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2

3.5.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมคลอไรด์ (ดัดแปลงจาก Baine และคณะ, 1979)

เติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดแล้วลงไปใน crude enzyme ที่แช่ในอ่างน้ำแข็งอย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆ จนสารละลายมีความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 45 เปอร์เซนต์ คนต่อไปอีก 30 นาที นำไปปั่นเก็บตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 แล้วเติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปอีกครั้งจนสารละลายมีความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 30 เปอร์เซนต์ คนต่อไปอีก 30 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นเก็บตะกอนด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและละลายตะกอนที่ได้ ตกตะกอนอีกครั้งด้วยผลึกเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่บดละเอียด จนมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10

เปอร์เซนต์ คนต่ออีก 30 นาที นำไปปั่นเก็บตะกอนด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

3.5.2 การขจัดเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซีส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.5.1 มาบรรจุลงในถุงไดอะไลซีสที่ผ่านการต้มและขจัดโลหะหนักออกไปแล้ว นำไปไดอะไลซ์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำ 2 ครั้งเป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ หลังจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยกรองผ่าน Amicon YM-10 membrane ด้วยเครื่องอุลตร้าฟิลเตรชัน ภายใต้ความดันของก๊าซไนโตรเจน 2 กก./ตารางนิ้ว กรองจนสารละลายเหลือปริมาตรประมาณ 2 มล.

3.5.3 การทำเอนไซม์บาเปนให้บริสุทธิ์ด้วยเซฟาเดกซ์ จี-50 เจลฟิลเตรชัน (Sephadex G-50 Gel Filtration)

การเตรียมคอลัมน์

แช่เซฟาเดกซ์ จี-50 ปริมาณ 30 กรัม ใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อไล่อากาศและให้เม็ดเจลพองตัว หลังจากนั้นจึงตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.8 เซนติเมตร สูง 90 เซนติเมตร บรรจุเซฟาเดกซ์ จี-50 ให้ได้ความสูงของเจล 87 เซนติเมตร ผ่านสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ลงไปในคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 10 มล./ชม. เป็นเวลา 18 ชม. เพื่อให้เม็ดเจลในคอลัมน์เรียงตัวอยู่ในสภาพที่สมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมได้ ด้วยสารละลายบลูเดกซ์แตรนและสารละลายโปแตส-เซียมไดโครเมต

การใช้คอลัมน์

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.5.2 มาเติมลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี

-50 ชะออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) หลอดละ 3 มล. นำหลอดที่เก็บได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรเพื่อทราบค่าโปรตีนโดยประมาณและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามข้อ 3.4.1 ทำการเก็บรวบรวมสารละลายในหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ด้วยกัน และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องอุลตร้าฟิลเตรชัน ทดสอบความบริสุทธิ์ของสารละลายเอนไซม์โดยแยกด้วยวิธี โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส แบบ คาโทดิค (cathodic system)

3.6 <u>การทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยวิธี คาโทดิค โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟเรซีส</u> (Reisfeld และคณะ , 1962)

3.6.1 <u>การเตรียมสารละลาย</u>

<u>สารละลายอะคริลาไมด์ 60%</u>

ชั่งอะคริลาไมด์ 60 กรัมและเมทิลลีน บิส อะคริลาไมด์ 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>สารละลายอะคริลาไมด์ 10%</u>

ชั่งอะคริลาไมด์ 10 กรัมและเมทิลลีน บิส อะคริลาไมด์ 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

<u>สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.3</u>

ผสม โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 48 มล. กรดอะซีติก 17.2 มล.และ TEMED 4 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. ปรับ pH ให้เป็น 4.3

<u>สารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.7</u>

ผสม โปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 48 มล. กรดอะซีติก 2.87 มล.และ TEMED 0.46 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. ปรับ pH ให้เป็น 6.7

สารละลายอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ pH 4.5

ชั่ง เบต้า-อะลานีน 31.2 กรัม นำมาผสมกับกรดอะซีติก 8 มล. ละลายในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH ให้เป็น 4.5 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มล.

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.28 กรัม ละลายน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 100 มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

สารละลายสีตามรอย (tracking dye)

ชั่ง เบสิคฟุชชิน (Basic fuchsin) 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มล.

สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer)

เติม กลีเซอรอล 10 มล. ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.7 ปริมาตร 25 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

น้ำยาย้อมสีโปรตีน (staining solution)

ผสม Coomassie brilliant blue R 2500.25 เปอร์เซนต์:เมธานอล :กรดอะซีติก ในอัตราส่วน 4:5:1 โดยปริมาตร

น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution)

ผสมกรดอะซีติก 75 มล.กับเมธานอล 50 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.6.2 การเตรียมแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.3 จำนวน 2 มล.กับสารละลายอะคริลาไมด์ 60% จำนวน 4 มล. และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 มล. เขย่าเบาๆให้เข้ากัน นำมาบรรจุลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ ให้ได้ความสูงของเจล 4-5 ซม. ค่อยๆหยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำกลั่นอย่างชัดเจน แสดงว่าเจลแข็งตัวดีแล้ว จึงเทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล จากนั้นจึงผสมสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.7 1 มล. กับสารละลายอะคริลาไมด์ 10% จำนวน 2 มล. และ สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำมาหยอดลงบนผิวหน้าของเจลที่แข็งตัว จนเกือบเต็มแล้วจึงเสียบ comb และ ทิ้งไว้เพื่อให้เจลแข็งตัว

3.6.3 การทำอิเลคโตรโฟเรซีส

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ ใส่สารละลายอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ pH 4.5 ลงไป ปรับอุณหภูมิของอ่างบัฟเฟอร์ให้ได้ 4 องศาเซลเซียส ดึง comb ออก นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ในข้อ 3.5.3 มาหยอดลงในช่องที่เกิดจาก comb(ปริมาตรที่ใช้ประมาณ 1-30 ไมโครลิตรต่อช่อง) ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 40 มิลลิแอมแปร์ โดยให้ขั้วบวกอยู่ด้านบน (cathodic system) ตั้งทิ้งไว้ สังเกตจนแถบสีเคลื่อนลงไปจนเกือบถึงปลายของแผ่นเจล หยุดการให้กระแสไฟฟ้า

3.6.4 การย้อมสีแถบโปรตีน

นำแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเลคโตรโฟเรซีสแล้ว มาแช่ลงในน้ำยาย้อมสีโปรตีน ทิ้งไว้อย่างน้อย 2-3 ชม. จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏบนแผ่นเจลใส เก็บแผ่นเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

3.7 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยเซฟาเดกซ์ จี-75 เจลฟิลเตรชัน (Sephadex G-75 Gel Filtration)

การเตรียมคอลัมน์

วิธีเตรียมคอลัมน์เหมือนข้อ 3.5.3 แต่ใช้เซฟาเดกซ์ จี-75 แทนเซฟาเดกซ์ จี-50

การใช้คอลัมน์

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ Bovine serum albumin น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน, Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน , Carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุล 29,000 ดาลตันและ Cytochrome C น้ำหนักโมเลกุล 14,300 ดาลตัน ใช้ปริมาณโปรตีนมาตรฐานชนิดละ 5 มก./มล. เติมลงในคอลัมน์ ชะสารออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน(fraction collector) หลอดละ 1.5 มล. นำหลอดที่เก็บสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนมาตรฐานผ่านออกจากคอลัมน์ นำไป

คำนวณค่า K_{av} จากสูตร

$$K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o$$

V_e คือ elution volume หรือปริมาตรของโปรตีนที่ผ่านออกจากคอลัมน์

V_o คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเดกซ์แตรนผ่านออกมา

V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ (total bed volume) วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโปตัสเซียมไดโครเมตผ่านออกจากคอลัมน์

หลังจากนั้น ผ่านสารละลายเอนไซม์บาเปน ที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในคอลัมน์ หา elution volume ของเอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตี คำนวณหาค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3.8 <u>การศึกษาผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์</u>

3.8.1 <u>ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์</u>

ทำการวัดแอคติวิตี ตามวิธีในข้อ 3.4.1 โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ คือ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5, 6, 7 และ 0.1 โมลาร์ ทริส-ไกลซีน pH 8, 9, 10 ซึ่งสับสเตรท(เคซีน)จะเตรียมโดยละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆนั้น

3.8.2 <u>ศึกษาผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์</u>

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆคือ 0.1 โมลาร์ ซิเตรต บัฟเฟอร์ pH 2, 3, 4 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5, 6, 7 และ0.1 โมลาร์ ทริส-ไกลซีน pH 8, 9, 10 และ 11 ทำการเจือจางสารละลายเอนไซม์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ดังกล่าว แล้วบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนที่จะวัดแอคติวิตีที่เหลือ ตามวิธีในข้อ 3.4.1

3.9 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีและความเสถียรของเอนไซม์

3.9.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

ทำการวัดแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.1 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิในการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็น 20 , 30, 40, 50, 60, 70, 80 , 90 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.9.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะนำไปวัดแอคติวิตีที่เหลือ ตามวิธีในข้อ 3.4.1

3.10 การศึกษาอุณหภูมิในการเก็บรักษาเอนไซม์

นำเอนไซม์บาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเก็บรวบรวมแล้วแบ่งใส่หลอดย่อยๆ นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างหลอดของเอนไซม์มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.4.1 ทุกๆ 30 วัน

3.11 การศึกษาผลของโลหะหนักและสารยับยั้งที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์บาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว

เจือจางสารละลายเอนไซม์บาเปนด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 และให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารชนิดหนึ่งชนิดใดดังต่อไปนี้ คือ $HgCl_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $MnSO_4$, $PbCl_2$, $CoCl_2$, $CaCl_2$ และ PMSF ชนิดละ 5 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งหลอดคอนโทรล ที่ไม่เติมสารดังกล่าวข้างต้น นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที ที่ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำไปวัดแอคติวิตี ตามวิธีในข้อ 3.4.1

3.12 การศึกษาผลของสารเคมีต่างๆในการเร่งแอคติวิตีของเอนไซม์ปาเปนที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว

เจือจางสารละลายเอนไซม์ปาเปนด้วย 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 และให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารชนิดหนึ่งชนิดใดดังต่อไปนี้ คือ EDTA, Sodium cyanide, Sodium bisulfite, Potassium metabisulfite, Cysteine ชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์ ส่วน Mercaptoethanol และ Ammonium sulfide จะเติมลงไปในหลอด เป็นปริมาตร 10 ไมโครลิตร รวมทั้งหลอดคอนโทรล ที่ไม่เติมสารดังกล่าวข้างต้น นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที ที่ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำไปวัดแอคติวิตี ตามวิธีในข้อ 3.4.1

3.13 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

เป็นการศึกษาเกี่ยวกับอัตราเร็วของปฏิกิริยา(reaction rate) และ ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา รวมทั้งกลไกการทำงานของเอนไซม์ โดยในการทดลองนี้จะเป็นการศึกษาที่กำหนดปริมาณเอนไซม์คงที่แล้วแปรความเข้มข้นของสับสเตรท จากนั้นทำการวัดความเร็วของปฏิกิริยา เขียนกราฟ(Lineweaver-Burk Reciprocal plot) แล้วคำนวณค่า V_{max} (ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา) และ K_m (Michaelis-Menten constant) ของสับสเตรทแต่ละชนิด

3.13.1 เคซีน

ทำการวัดแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.1 โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์ใน peak B ที่ใช้ คือ 0.94 ไมโครโมลาร์(20.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 1.14 ไมโครโมลาร์(40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)ตามลำดับ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้คือ 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 และ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.13.2 Bovine Serum Albumin(BSA)

ทำการวัดแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.1เช่นกัน แต่ใช้ BSA เป็นสับสเตรท

ความเข้มข้นต่างๆคือ 1, 3, 5, 8 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์ใน peak B ที่ใช้ คือ 0.94 ไมโครโมลาร์(20.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 1.14 ไมโครโมลาร์(40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)ตามลำดับ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ คือ 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 6.5 และ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.13.3 BAEE

ทำการวัดแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.2 โดยใช้ BAEE เป็นสับสเตรท ความเข้มข้นต่างๆคือ 30, 40, 50 และ 60 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์ใน peak B ที่ใช้ คือ 0.33 ไมโครโมลาร์ (7.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 0.40 ไมโครโมลาร์(28.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.13.4 BAPNA

ทำการวัดแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 3.4.3 โดยใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์ใน peak B ที่ใช้ คือ 0.54 ไมโครโมลาร์(12.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 0.67 ไมโครโมลาร์(23.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย