หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) ของบริษัท New Brunswick Co., U.S.A.

1.2 เครื่องปั่นปรับความเย็น (refrigerated centrifuge)รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, U.S.A

1.3 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 70 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

1.4 เครื่องเก็บลำดับส่วน (fraction collector)รุ่น Frac-100 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden

1.5 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงชนิดลำแสงคู่ (double beam spectrophotometer) รุ่น 210-5763 ของบริษัท Hitachi, Japan

1.6 เครื่องทำอิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis) ของบริษัท Hoefler Scientific Instrument,San Francisco, U.S.A.

1.7 เครื่องทำอิเลคโตรโฟริซิสแบบแผ่น (slab gel) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden

2. เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 ดีอีเออี - เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden

2.2 เซฟาเด็กซ์ จี-150 (Sephadex G-150) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden

2.3 อะคริลาไมด์ (acrylamide) ของบริษัท Sigma, St.Louis, U.S.A.

2.4 บิส (N,N-methylene bis acrylamide) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

2.5 ทริส (tris (hydroxymethyl) aminomethane) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

2.6 TEMED (N, N, N, N - Tetramethylethylenediamine) ของบริษัท Sigma, U.S.A.

2.7 สีโคแมสซี บลู จี-250 (Comassie brilliant blue G-250) ของบริษัท Fluka Ag. Buchs, Switzerland

2.8 ฟินอลรีเอเจนท์ (Folin - Ciocalteu's phenol reagent) ของ E. Merck, Darmstadt, Germany

2.9 คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate 5-hydrate) ของ E. Merck, Germany

2.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ของ E. Merck,Germany

2.11 โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรท (sodium potassium tartrate) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland

2.12 อัลบูมิน (Fraction V, 96-99% albumin, bovine) ของ Sigma, U.S.A.

2.13 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของ BDH Laboratory Chemical

2.14 ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (oat spelt xylan) ของ Sigma, U.S.A.

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเลี้ยงเชื้อ Streptomyces sp.42-9 ในขวดแก้วทรงกรวย (Erlenmayer flask)

เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำ (spore suspension) โดยใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ในหลอดเก็บเชื้อ (stock culture) อายุประมาณ 7-10 วัน ใช้ลูป (loop) ค่อยๆ เขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาอยู่ในน้ำ นับสปอร์เริ่มต้นให้ได้ประมาณ 10^6-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วถ่าย 2 มิลลิลิตร ของสปอร์แขวนลอยในน้ำ ลงใน 100 มิลลิลิตร ของอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อในการผลิตไซแลเนสสูตรปรับปรุงใหม่ตามภาคผนวกหมายเลข 1 (2) บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบ rotary shaker ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน เพื่อผลิตเอนไซม์ไซแลเนส

2. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

หลังจากเลี้ยง Streptomyces sp. 42-9 ตามวิธีการในข้อ 1 แล้วแยกเซล และกากอาหารที่เหลือ ออกจากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนน้ำใสทั้งหมดมาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดอย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วน โดยแต่ละลำดับส่วนจะมีความเข้มข้นตามที่ระบุไว้ในผลการทดลอง จากนั้นกวนต่อไปอีกประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนและส่วนน้ำใสออกจากกัน ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ของแต่ละลำดับส่วนด้วย 0.1 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ตะกอนละลายได้หมด ไดอาไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ดังกล่าว หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออก วัดปริมาตร หาปริมาณโปรตีนและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนส

3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเอ็ด-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

ชั่งดีอีเอ็ด-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ประมาณ 1 กรัม แช่ในสารละลาย 0.1โมลาร์ ทริส-บัฟเฟอร์ pH 7.5 500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองเต็มที่ เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียด ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้งจากนั้นนำเจลบรรจุลงในคอลัมน์หลอดฉีดยาขนาดปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผ่านสารละลาย 0.1 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์ข้ามคืนจนเจลอยู่ในสภาพสมดุลย์ มีอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อย ๆ ใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 20-50 เปอร์เซนต์แล้ว ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกให้หมดด้วย 0.1 โมลาร์ ทริส-บัฟเฟอร์ pH 7.5 ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ 0 จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับโดยเจลออกด้วย 0-0.5 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ ใน 0.1 โมลาร์ ทริส-บัฟเฟอร์ pH 7.5 เก็บลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลเนสในแต่ละหลอดจากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน แล้วนำไปไดอาไลส์ใน 0.1โมลาร์ ทริส-บัฟเฟอร์ วัดปริมาตรพร้อมทั้ง แอคติวิตี และหาปริมาณโปรตีน

4. การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-150 ประมาณ 5 กรัม ในสารละลาย 0.1โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่มี 0.1โมลาร์โปตัสเซียมคลอไรด์ปริมาณมากเกินพอ นำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น แล้วบรรจุลงคอลัมน์แก้วขนาด 1.7x70 เซ็นติเมตร ให้ได้เจลสูงประมาณ 60 เซ็นติเมตร ผ่านสารละลาย 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหลประมาณ 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอุลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) มาผ่านลงคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 เก็บสารละลายโปรตีนลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของไซแลเนส จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตร พร้อมทั้งแอคติวิตี และปริมาณโปรตีน

5. การตรวจสอบแอคติวิตีของไซแลเนสจาก Streptomyces sp. 42-9

โดยการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลส ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายไซแลน ซึ่งวิธีการนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakajima และคณะ(15) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.3 มิลลิลิตรของสารละลายไซแลนความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ ซึ่งละลายใน 0.1โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 บ่มกับ 2.4 มิลลิลิตร ของ 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 และ 0.3 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยบ่มสับสเตรทกับบัฟเฟอร์ก่อน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 1 นาที และทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 30 นาที ครั้งละ 1 มิลลิลิตร หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Somoygi-Nelson (29,30)

1 หน่วยของไซแลเนส คือปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยไซแลน แล้วได้น้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมอัลคาไลน์-คอปเปอร์รีเอเจนท์ (วิธีเตรียม ตามภาคผนวกหมายเลข 2.1) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำเย็นจัด แล้วเติมเนลสันรีเอเจนท์ (ภาคผนวกหมายเลข 2.2) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ 5 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้น้ำตาลไซโลส ที่ความเข้มข้น 20-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (31) นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายผสม C (ภาคผนวก หมายเลข 3.3) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที เติมสารละลาย D (ภาคผนวก หมายเลข 3.4) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

8. การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่ง(Disc polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีของ Williams และ Reisfeld (32)

บรรจุสารละลายผสม 7 เปอร์เซนต์ เซพาเรติงเจล (seperating gel) ตามภาคผนวกหมายเลข 4.8 ลงในหลอดแก้วขนาด 0.5x8.0 เซ็นติเมตร ให้มีความสูง 7 เซ็นติเมตร ปิดทับหน้าเจลด้วยน้ำสูง 0.5 เซ็นติเมตรเพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ หลังจากเจลแข็งตัวแล้ว ซับน้ำที่ผิวเจลให้แห้ง เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (stacking gel) ตามภาคผนวกหมายเลข 4.9 ให้มีความสูงประมาณ 0.5 เซ็นติเมตรปิดทับหน้าเจลด้วยน้ำ ตั้งทิ้งไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์จนกระทั่งเจลแข็งตัว ซับน้ำที่ผิวหน้าเจลให้แห้ง แล้วนำไปบรรจุในชุดทำอิเลกโตรโฟริซิส พร้อมทั้งเทบัฟเฟอร์ให้ท่วมแท่งเจล หยอดสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ ที่มีปริมาณโปรตีน 50-100 ไมโครกรัมใน 40 ไมโครลิตร กลีเซอรอล และ 10 ไมโครลิตรของ 0.005 เปอร์เซนต์บรอมฟินอลบลู ลงในแท่งเจล และทำอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้สารละลายทริส-ไกลซิน pH 9.5 (ภาคผนวกหมายเลข 4.7) เป็นบัฟเฟอร์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 6.0 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจล จนกระทั่งสีของบรอมฟินอลบลู เคลื่อนลงมาถึงปลายสุดของเจล นำเจลออกจากแท่งแก้ว แล้วแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (staining solution) วิธีเตรียมดังภาคผนวกหมายเลข 4.10 จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกโดยใช้น้ำยาล้างสี(destaining solution) ตามภาคผนวกหมายเลข 4.11 หลายๆ ครั้งจนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจนตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์บนแท่งเจล

โดยใช้แท่งเจลที่ไม่ได้ผ่านการย้อมสีมาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.3 เซ็นติเมตร หลายๆ ชิ้น โดยเปรียบเทียบกับแท่งเจลที่ผ่านการย้อมสี แล้วชะโปรตีนออกจากเจลโดยนำมาแช่ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำส่วนน้ำใสมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

9. <u>การทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u> ตามวิธีของ Laemmli (33)

โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 16X18 เซ็นติเมตร 2 แผ่นเข้าด้วยกัน สอดแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 1 มิลลิเมตร ที่ขอบด้านข้างทั้ง 2 ข้าง เทสารละลายผสมของรีโซลวิ่งเจล (resolving gel) ที่มีเจลความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกหมายเลข 5.7) ลงไปในแผ่นแก้วให้ได้ความสูง 9 เซ็นติเมตร หยดน้ำลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูง 2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาทีจนกระทั่งเจลแข็งตัว เทน้ำออกแล้ววางแผ่นพลาสติก สำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (stacking gel solution) ซึ่งมีองค์ประกอบดังแสดงในภาคผนวกหมายเลข 5.8 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวกหมายเลข 5.1) 2-3 ครั้ง แล้วเติมอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐาน 3 ชนิด คือ ไซโตโครม ซี (cytochrom C) ,โอวัลบุมิน (ovalbumin) และโบวินซีรัมอัลบุมิน (bovine serum albumin)ตัวอย่างละ 20 ไมโครกรัม ละลายใน 50 ไมโครลิตรของบัฟเฟอร์ ซึ่งส่วนประกอบแสดงในภาคผนวกหมายเลข 5.4 และต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นหยอดลงในช่องตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำการอิเลคโตรโฟริซิสที่ 60 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีของบรอมฟินอลบลู เคลื่อนลงมาถึงปลายสุดของแผ่นเจล ต่อจากนั้นนำแผ่นเจลนี้มาแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวกหมายเลข 5.9) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชะล้างสีด้วยสารละลายชะล้างสี (ภาคผนวกหมายเลข 5.10) จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน

10. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

10.1 โดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150

ผ่านเอนไซม์ไซแลเนสและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ลงบนคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-150 แล้วคำนวณหาค่า K_{av} (partition coefficient) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

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

เมื่อ V_e คือ ปริมาตรของบัฟเฟอร์ในการชะเอนไซม์หรือโปรตีนมาตรฐาน

V_o คือ ปริมาตรของช่องว่างระหว่างเม็ดเจล

V_t คือ ปริมาตรภายในคอลัมน์

จากนั้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน กับค่า K_{av}

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่

ไซโตโครม ซี	น้ำหนักโมเลกุล	12,000 ดาลตัน
โอวัลบูมิน	"	43,000 "
ซีรัมอัลบูมิน	"	68,000 "
คะตะเลส	"	240,000 "

10.2 โดยการทำ SDS โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส

โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสของสารละลายเอนไซม์ และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีการในข้อ 9 คำนวณหาค่า R_f จากสูตร

R_f = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่สีเคลื่อนที่

จากนั้น เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative Mobility) กับค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่

ไซโตโครม ซี	น้ำหนักโมเลกุล	12,000	ดาลตัน
โอวัลบูมิน	"	43,000	"
ซีรัมอัลบูมิน	"	68,000	"