บทที่ 2
วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 เครื่องมือ

เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ psycrotherm รุ่น G 760 บริษัท New brunswick scientific

หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) รุ่น HA-30 บริษัท Hirayama

อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ (shaking waterbath) รุ่น G 76 บริษัท New brunswick scientific

เครื่องวัด pH รุ่น PHM 95 บริษัท Radiometer

เครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) รุ่น 2070 LKB Redifrac บริษัท Pharmacia

อุปกรณ์อิเลคโทรโฟริซิส รุ่น Mini-protean II บริษัท Bio-rad

เครื่องปั่นพลังงาน (power supply) รุ่น POWER PAC 300 บริษัท Bio-rad

เครื่องทำลายเซลล์ด้วยเสียงความถี่สูง (sonicator) รุ่น W 375 บริษัท Heat systems-ultrasonics

เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง รุ่น J2-21 บริษัท Backman

เครื่องวัดสภาพนำ (conductivity meter) รุ่น CDM บริษัท Radiometer

เครื่องวัดการดูดแสง รุ่น DU series 650 spectrophotometer บริษัท Beckman

เครื่องวัดการดูดแสง spectronic 2000 บริษัท Bausch & Lomb

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic sterrir) รุ่น 436783 บริษัท Janke & Kunkel GMBH

ตู้ laminar flow รุ่น ISSCO บริษัท Dwyer

กล้องถ่ายรูป PENTAX super A soft case 32650 พร้อมฟิลม์ขาวดำ Kodak Tri-X pan 400 และฟิล์มสี Fuji 200

2.1.2 เคมีภัณฑ์

กระดาษกรองเบอร์ 1 บริษัท Whatman

ถุงไดอะไลซิส ขนาด 1 นิ้ว M.W. cut off 12,000 ดาลตัน บริษัท Sigma

ดีอีเออีเซลลูโลส บริษัท Sigma

เซฟาเด็กซ์จี-200 บริษัท Pharmacia

ไฮดรอกซีอะพาไทต์ ไบโอ-เจล เอชทีพี บริษัท Bio-rad

คอลัมน์บลูเซฟาโรส (ไคบาครอนบลู 3จี-เอ) บริษัท Pharmacia

ส่วนสารเคมีอื่นนอกจากนี้ซื้อจากบริษัท Sigma บริษัท BDH บริษัท Fluka เป็นต้น โดยสารเคมีทั้งหมดที่กล่าวนี้เป็นเกรดวิเคราะห์

2.2 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

2.2.1 อาหารคัดเลือก (screening medium) ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย แอล-อะลานีน 10 กรัม ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม และ yeast extract 0.1 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.2.2 peptone medium เป็นอาหารอุดม ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย peptone 10 กรัม ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม และ yeast extract 0.1 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 สารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Lowry และคณะ, 1951)

2.3.1.1 สารละลาย A (คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซนต์ โปแตสเซียม ตาร์เตรต 1 เปอร์เซนต์ pH 7.0)

ละลายโปแตสเซียมตาร์เตรต 1 กรัม และ คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ปรับ pH ให้เป็น 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2.3.1.2 สารละลาย B (โซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซนต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล)

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

2.3.1.3 สารละลาย C (ฟีนอลรีเอเจนต์)

ผสมโซเดียมทังสเตต 50 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ 25 มิลลิลิตร และ กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ (reflux) ด้วยความร้อนต่ำๆ นาน 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเทียมซัลเฟต 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และสารละลายโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอ ประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาป้องกันแสง และนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อจะใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร

2.3.2 สารละลายสำหรับพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส (Davis, 1964)

2.3.2.1 สารละลาย A (TEMED (*N,N,N′,N′*- tetramethylethylene diamine) 0.23 เปอร์เซนต์ Tris-HCl pH 8.9 1.5 โมลาร์)

ละลาย Tris (Tris hydroxymethyl aminomethane) 36.6 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล 48 มิลลิลิตร เติม TEMED 0.23 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 8.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.2.2 สารละลาย B (TEMED 0.46 เปอร์เซนต์ Tris-HCl pH 6.7 0.5 โมลาร์)

ละลาย Tris 5.98 กรัมในกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล 48 มิลลิลิตร เติม TEMED 0.46 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 6.7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.2.3 สารละลาย C (อะคริลาไมด์ 30.8 เปอร์เซนต์)

ชั่งอะคริลาไมด์ 30 กรัม และ BIS (*N,N'*-methylenebis acrylamide) 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.2.4 สารละลาย D (อะคริลาไมด์ 12.5 เปอร์เซนต์)

ชั่งอะคริลาไมด์ 10 กรัมและ BIS 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.2.5 สารละลาย E (ไรโบฟลาวิน 0.004 เปอร์เซนต์)

ชั่งไรโบฟลาวิน 4 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.2.6 สารละลาย F (Tris 0.05 โมลาร์ ไกลซีน 0.384 โมลาร์)(ความเข้มข้น 10 เท่า)

ชั่ง Tris 10 กรัมและไกลซีน 28.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซาเซียส เมื่อจะใช้นำมาเจือจาง 10 เท่า

2.3.2.7 สารละลาย G (ซูโครส 40 เปอร์เซนต์)

ละลายซูโครส 40 กรัมในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.2.8 สารละลายสีตามรอย (โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) 0.05 เปอร์เซนต์ ซูโครส 40 เปอร์เซนต์)

ชั่งโบรโมฟีนอลบลู 5 มิลลิกรัมละลายในซูโครส 40 เปอร์เซนต์ 10 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.3.2.9 สารละลายย้อมสีโปรตีน (คูแมสซิบริลเลียนท์บลูจี-250 (coomassie brilliant blue G-250) 0.04 เปอร์เซนต์ กรดเปอร์คลอริก 3.5 เปอร์เซนต์)

ผสมคูแมสซิบริลเลียนท์บลู จี-250 0.28 กรัม กรดเปอร์คลอริก 24.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 675.5 มิลลิลิตร คนให้ละลายแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.3.2.10 สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน (กรดอะซิติก 7 เปอร์เซนต์)

ผสมกรดอะซิติก 35 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

2.3.2.11 สารละลายย้อมสีแอคติวิตี

สารละลาย 10 มิลลิลิตรประกอบด้วย Tris-HCl pH 8.5 4.25 มิลลิโมล แอล-อะลานีน 40 ไมโครโมล NAD^+ 50 ไมโครโมล phanazine methosulfate 250 ไมโครกรัม และ nitroblue tetrazolium 2.5 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากัน เตรียมทันทีเมื่อใช้

2.3.3 สารละลายสำหรับเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส (Laemmli, 1979)

2.3.3.1 สารละลาย A1 (อะคริลาไมด์ 30.8 เปอร์เซนต์)

ละลายอะคริลาไมด์ 15 กรัม และ BIS 0.4 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.3.2 สารละลาย A2 (อะคริลาไมด์ 31.5 เปอร์เซนต์)

ชั่งอะคริลาไมด์ 15 กรัม และ BIS 0.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.3.3 สารละลาย B1 (Tris-HCl pH 8.8 1.5 โมลาร์)

ละลาย Tris 18.15 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.3.4 สารละลาย B2 (Tris-HCl pH 6.8 0.5 โมลาร์)

ละลาย Tris 3 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.3.5 สารละลาย C (SDS (sodium dodecyl sulfate) 10 เปอร์เซนต์)

ชั่ง SDS 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.3.6 สารละลาย D (Tris 0.25 โมลาร์ ไกลซีน 1.92 โมลาร์ SDS 1 เปอร์เซนต์) (ความเข้มข้น 10 เท่า)

ชั่ง Tris 30 กรัม ไกลซีน 144 กรัม และ SDS 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า

2.3.3.7 สารละลาย E (แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 1.5 เปอร์เซนต์)

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 30 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3.3.8 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง

ผสมสารละลาย B2 0.5 มิลลิลิตร สารละลาย C 0.8 มิลลิลิตร 2- เมอร์แคปโตเอธานอล 0.2 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 0.4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน

2..3.3.9 สารละลายสีตามรอย (โบรโมฟีนอลบลู 0.05 เปอร์เซนต์)

ชั่งโบรโมฟีนอลบลู 5 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

2.3.3.10 สารละลายสีย้อมโปรตีน (คูแมสซิบริลเลียนท์บลูอาร์-250 0.25 เปอร์เซนต์ เมทานอล 45 เปอร์เซนต์ กรดอะซิติก 9 เปอร์เซนต์)

ชั่งคูแมสซิบริลเลียนท์บลูอาร์-250 (coomassie brilliant blue R-250) 1.1 กรัม ละลายในเมทานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 40 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนให้ละลายแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.3.3.11 สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน 1 (เมทานอล 5 เปอร์เซนต์ กรดอะซิติก 7 เปอร์เซนต์)

ผสมเมทานอล 25 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 35 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 440 มิลลิลิตร

2.3.3.12 สารละลายล้างสีย้อมโปรตีน 2 (กรดอะซิติก 7 เปอร์เซนต์)

ผสมกรดอะซิติก 35 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 465 มิลลิลิตร

2.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถใช้แอล-อะลานีนเป็นสารต้นตอของคาร์บอนและไนโตรเจน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆในกรุงเทพมหานครประมาณ 50 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 0.5 กรัม กระจายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำสารละลายดินที่ได้ 1 ลูป (loop) ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารคัดเลือกปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง แยกแบคทีเรียที่เจริญได้ในแต่ละหลอดให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยขีด (streak) บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารอุดมชนิดแข็ง แยกเก็บแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่ได้บน slant อาหารอุดมที่อุณหภูมิห้อง

2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์

2.5.1 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้ปริมาณน้อย

2.5.1.1 การเตรียมแบคทีเรียตั้งต้น (starter inoculation)

เขี่ยแบคทีเรียจาก slant ที่แยกได้จากข้อ 2.4 1 ลูป แยกใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารอุดมชนิดเหลวปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง

2.5.1.2 การเลี้ยงแบคทีเรียสำหรับการทดลอง

ถ่ายแบคทีเรียตั้งต้น 5 เปอร์เซนต์ (1.25 มิลลิลิตร) จากข้อ 2.5.1.1 ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารอุดมชนิดเหลว 25 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วของการเขย่า 150 รอบต่อนาที ประมาณ 24 ชั่วโมง แยกเซลล์โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่อง Beckman รุ่น J2-21 ที่ความเร็ว 5,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 1 ครั้ง แล้วล้างด้วย extraction buffer (โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 0.1 โมลาร์ PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) 0.1 มิลลิโมลาร์ DTT (dithiothreitol) 0.01 เปอร์เซนต์ EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 1 มิลลิโมลาร์) อีก 1 ครั้ง

2.5.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ (cell free extract) ปริมาณน้อย

กระจายเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.5.1.2 ใน extraction buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำลายเซลล์โดยใช้เสียงความถี่สูง (sonicator) ที่ output control = 7 , % duty cycle = 50 % , pluse นานประมาณ 10 นาทีแล้วหยุด 5 นาทีทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วนำไปแยกเศษเซลล์ออกด้วยความเร็ว 5,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนลอยหรือสารละลายเอนไซม์ (cell free extract) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อจะนำไปใช้ในการตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

2.5.3.การตรวจวัดแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยา oxidative deamination

ทำปฏิกิริยาในสารละลาย 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยแอล-อะลานีน 20 ไมโครโมล NAD^+ หรือ $NADP^+$ 1 ไมโครโมล ไกลซีน-โปแตสเซียมคลอไรด์-โปแตสเซียม-ไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ pH 10.5 200 ไมโครโมล และสารละลายเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม NAD^+ หรือ $NADP^+$ ตรวจวัดปริมาณ NADH หรือ

NADPH ที่เพิ่มขึ้นโดยติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรภายในเวลา 1 นาที

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสร้าง NADH หรือ NADPH 1 ไมโครโมลใน 1 นาที ณ ภาวะที่กำหนด

2.5.4 การตรวจวัดแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยา reductive amination

ทำปฏิกิริยาในสารละลาย 1 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วย ไพรูเวท 10 ไมโครโมล แอมโมเนียมคลอไรด์ 500 ไมโครโมล NADH 0.2 ไมโครโมล โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 8.0 100 ไมโครโมล และสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เริ่มปฏิกิริยาโดยการ เติม NADH ตรวจวัดปริมาณ NADH ที่ลดลง โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 นาที

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย NADH 1 ไมโครโมลใน 1 นาที ณ ภาวะที่กำหนด

2.5.5 การวัดปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Lowry และคณะ, 1951)

วัดปริมาณโปรตีนโดยใส่สารตัวอย่างที่มีโปรตีนเข้มข้นระหว่าง 50-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย A (คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 เปอร์เซนต์ โปแตสเซียมตาร์เตรต 1 เปอร์เซนต์ pH 7.0) 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย B (โซเดียมคาร์บอเนต 2 เปอร์เซนต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วเติมสารละลาย C (ฟีนอลรีเอเจนต์) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดการดูดแสง คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน(จากซีรัมวัว)

2.5.6 การตรวจสอบแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์โดยย้อมสีแอคติวิตี (activity stain)

2.5.6.1 การเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิสชนิดแผ่น (Disc-polyacrylamide gel electrophoresis) (Davis, 1964)

เตรียม resolving gel (อะคริลาไมด์ 7. 7 เปอร์เซนต์) โดยผสมสารละลาย A (TEMED 0.23 เปอร์เซนต์ Tris-HCl 1.5 โมลาร์ pH 8.9) 1 มิลลิลิตร สารละลาย C (อะคริลาไมด์ 30.8 เปอร์เซนต์) 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ดูดเอาอากาศออกแล้วเติม แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 11.2 มิลลิกรัม นำมาหยอดลงช่องระหว่างแผ่นกระจกที่จัดเตรียมไว้ (ใช้ชุดทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส รุ่น Mini -Protean II) จนกระทั่งสารละลายมีความสูงประมาณ 5.5 เซนติเมตร หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ อย่างรวดเร็ว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจนจึงเทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจลและซับน้ำออกให้หมด เตรียม stracking gel โดยผสมสารละลาย B (TEMED 0.46 เปอร์เซนต์ Tris-HCl 0.5 โมลาร์ pH 6.7) 0.25 มิลลิลิตร สารละลาย D (อะคริลาไมด์ 12.5 เปอร์เซนต์) 0.5 มิลลิลิตร สารละลาย G (ซูโครส 40 เปอร์เซนต์) 1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน แล้วเติมสารละลาย E (ไรโบฟลาวิน 0.004 เปอร์เซนต์) 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ หยอดลงแผ่นเจลที่มีเจลชั้นล่างอยู่แล้วให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วเสียบหวี (comb) เพื่อทำให้เกิดช่อง สำหรับหยอดสารตัวอย่าง แล้วตั้งไว้ให้เจลเกิดพอลิเมอร์ไรซ์อย่างสมบูรณ์ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ประมาณ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.5.6.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์

นำสารละลายเอนไซม์ประมาณ 5 ไมโครกรัมมาผสมกับสารละลายสีตามรอยในอัตราส่วน 5 : 1 โดยปริมาตร

2.5.6.3 การทำอิเลคโทรโฟริซิส

บรรจุแผ่นเจลลงในแชมเบอร์ จากนั้นเทสารละลาย F (Tris 0.05 โมลาร์ ไกลซีน 0.384 โมลาร์) ที่เจือจาง 10 เท่าลงในแชมเบอร์โดยใส่ให้ท่วมปลายด้านบนและด้านล่างของแผ่นเจล ไล่ฟองอากาศออกจากด้านบนและด้านล่างของแผ่นเจลออกให้หมด แล้วหยอดสารละลายโปรตีน (ข้อ 2.5.6.2) ลงในช่องบนผิวหน้าเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 200 โวลต์ โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบนจนกระทั่งสีตามรอยเคลื่อนไปจนถึงระยะอีก 1 เซนติเมตรจะถึงปลายด้านล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

สำหรับการทำอิเลคโทรโฟริซิสเพื่อย้อมสีแอคติวิตีทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.6.4 วิธีย้อมสีโปรตีนในแผ่นพอลิอะคริลาไมด์เจล

ถ่ายเจลจากข้อ 2.5.6.3 ออกจากกระจกแล้วนำไปแช่ในสารละลายย้อมสีโปรตีน (คูแมสซิบริลเลียนท์บลูจี-250 0.04 เปอร์เซนต์ กรดเปอร์คลอริก 3.5 เปอร์เซนต์) เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ต่อจากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสีย้อมโปรตีน (กรดอะซิติก 7 เปอร์เซนต์) จนกระทั่งเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่ชัดเจน เก็บเจลที่ได้ไว้ในกรดอะซิติก 7 เปอร์เซนต์

2.5.6.5 วิธีย้อมสีแอคติวิตีในแผ่นพอลิอะคริลาไมด์เจล

หลังจากทำการแยกเอนไซม์ในสารละลายตัวอย่างโดยใช้เทคนิคเจลอิเลคโทรโฟริซิส ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์เสียสภาพแล้วถ่ายเจลออกจากกระจก จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายย้อมสีแอคติวิตี (2.3.2.11) โดยมีแอล-อะลานีนเป็นสับสเตรท NAD^+ โคเอนไซม์ nitroblue tetrazolium เป็นสารช่วยทำให้ phenazine methosulfate เปลี่ยนเป็น formazan ซึ่งเป็นสารมีสีและทำ negative control โดยไม่ใส่แอล-อะลานีนควบคู่ไปด้วย ย้อมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จะปรากฏแถบสีม่วงอย่างชัดเจน จากนั้นจึงนำเจลไปหยุดปฏิกิริยาและล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น เก็บเจลที่ได้ไว้ในน้ำกลั่น

2.6 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

เก็บแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไว้บน slant อาหารอุดมในหลอดทดลองขนาดยาวที่อุณหภูมิห้องได้นานประมาณ 3 เดือน เมื่อต้องการใช้ในการทดลองจะนำไปเลี้ยงในอาหารอุดมเหลวต่อไป หรือเก็บแบคทีเรียไว้บนอาหารอุดมในจานเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย พันพาราฟิล์มให้แน่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานประมาณ 6 เดือน

2.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในแบคทีเรียที่เลี้ยงในระดับขวดเขย่า

2.7.1 การศึกษา pH ที่เหมาะสม

2.7.1.1 การเตรียมแบคทีเรียตั้งต้น

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียโดยเริ่มจากเตรียมแบคทีเรียตั้งต้น โดยเขี่ยแบคทีเรียจาก slant 1 ลูป ใส่ลงในหลอดขนาด 20 มิลลิลิตร ที่มีอาหารอุดม 2.5 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นขั้นถัดไปโดยถ่ายแบคทีเรียในหลอดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารอุดม 50 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมงเช่นกัน

2.7.1.2 การเลี้ยงแบคทีเรียสำหรับการทดลอง

ถ่ายแบคทีเรียตั้งต้น 5 มิลลิลิตร (5 เปอร์เซนต์) ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารอุดมปริมาตร 100 มิลลิลิตร pH ต่างๆ กันได้แก่ 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0 และ 8.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเซลล์ตามวิธีข้อ 2.5.1.2 จากนั้นนำมาเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 2.5.2 แล้วตรวจวัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 2.5.3 และ 2.5.5 ตามลำดับ

2.7.2 <u>การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.7.1 แต่เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารอุดม pH 4.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 15, 20, 25 , 28, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียสแทนการเลี้ยงที่ pH ต่างๆ

2.7.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสม

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.7.1 แต่หาเวลาที่เหมาะสมโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารอุดม pH 4.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลานานต่างๆ กัน โดยเก็บแบคทีเรียเพื่อตรวจระดับของเอนไซม์ทุกๆ 4 ชั่วโมงจนกระทั่งครบ 36 ชั่วโมงแทนการเลี้ยงที่ pH ต่างๆ

2.8 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียปริมาณมาก

2.8.1 การเตรียมแบคทีเรียตั้งต้น

เขี่ยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 1 ลูปใส่ลงไปอาหารอุดม 20 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นขั้นถัดไปโดยถ่ายแบคทีเรียตั้งต้น 20 มิลลิลิตรนี้ใส่อาหารอุดม 400 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมงเช่นกัน

2.8.2 การเลี้ยงแบคทีเรียสำหรับการทดลอง

ถ่ายแบคทีเรียตั้งต้น 20 มิลลิลิตร (5 เปอร์เซนต์) ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุอาหารอุดม pH 4.5 400 มิลลิลิตร จำนวน 15 ใบ เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราเร็วของการเขย่า 150 รอบต่อนาที นานประมาณ 24 ชั่วโมง แยกเซลล์โดยการเซนตริฟิวจ์ด้วยเครื่อง Beckman รุ่น J2-21 ด้วยความเร็ว 8,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ 1 ครั้ง แล้วล้างด้วย extraction buffer อีก 1 ครั้ง

2.9 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ (cell free extract) ปริมาณมาก

กระจายเซลล์ที่ได้จากข้อ 2.8.2 ประมาณ 30 กรัม ใน extraction buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องทำลายเซลล์โดยใช้เสียงความถี่สูง (sonicator) นำไปแยกเศษเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง Beckman รุ่น J2-21 ด้วยความเร็ว 8,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำส่วนลอยหรือสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

2.10 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

นำสารละลายเอนไซม์ปริมาณมากที่เตรียมได้จากวิธีข้อ 2.9 มาผ่านขั้นตอนต่างๆ ซึ่งสรุปไว้ในรูปที่ 8 โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทุกขั้นตอน

elution buffer ที่ใช้ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ คือ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วย 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 0.01 เปอร์เซนต์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์

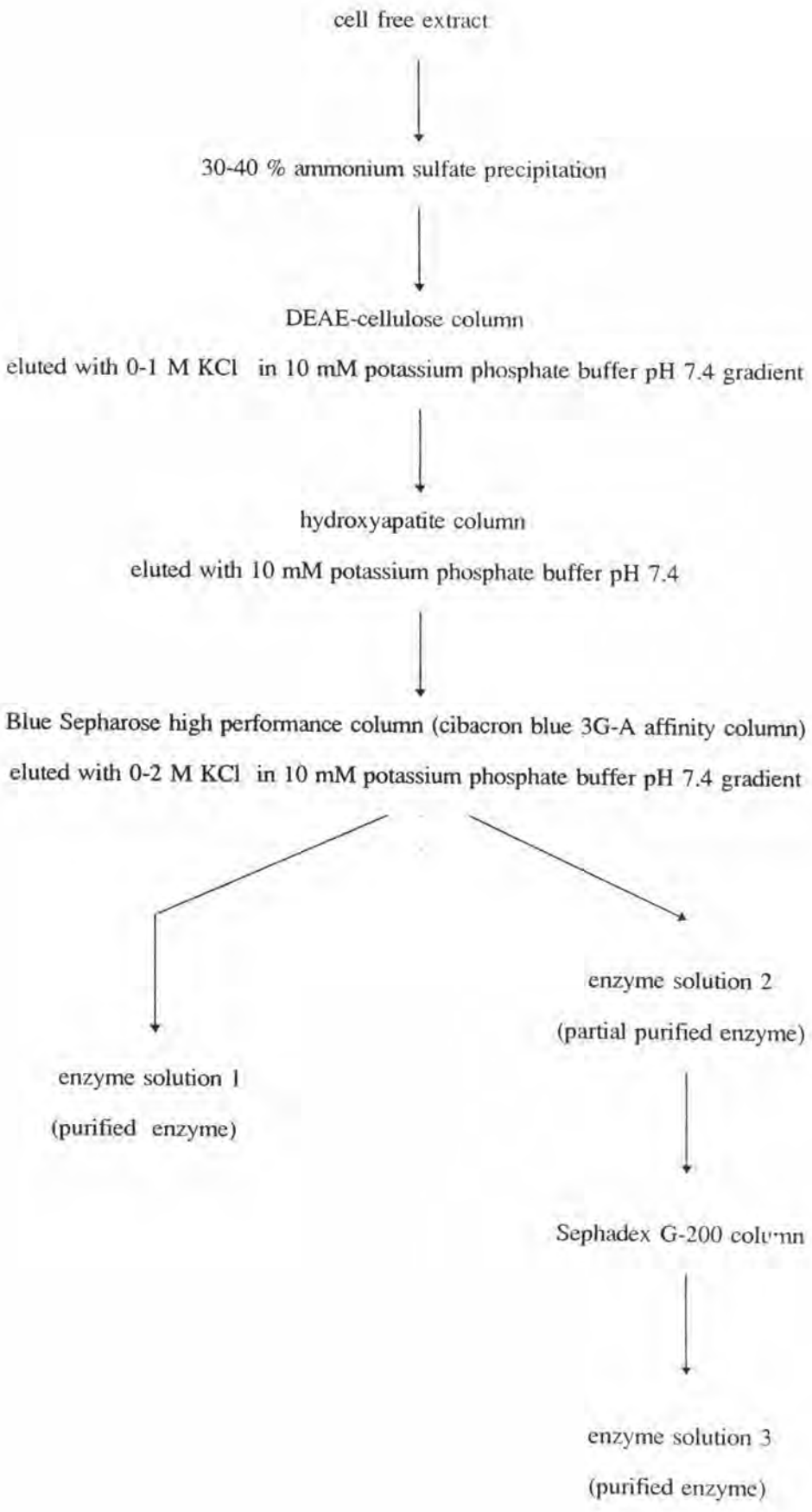
2.10.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ทำการทดลองโดยเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้นอย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยการเพิ่มให้มีความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวแฟรคชันละ 10 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นคนต่อไปอีก 15 นาที นำไปปั่นแยกตะกอนและส่วนลอยด้วยความเร็ว 8,000×g นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 80 เปอร์เซนต์ ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ของแต่ละแฟรคชันด้วย elution buffer แล้วนำไปไดอะไลซ์เอาเกลือแอมโมเนียมออก วัดปริมาตร ตรวจวัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนตามวิธีในข้อ 2.5.3 และ 2.5.5 ตามลำดับเพื่อหาแฟรคชันจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้แอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) และผลผลิต (yield) ของเอนไซม์สูงสุด

2.10.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้คอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส (DEAE-cellulose)

2.10.2.1 การเตรียมคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส

ล้างดีอีเออีเซลลูโลสด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.5 นอร์มอล จากนั้นล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจน pH สูงกว่า 3.0 แล้วจึงล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 นอร์มอล 1 ครั้ง ตามด้วยล้างน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจนได้ pH ต่ำกว่า 11.0 แล้วเปลี่ยนเป็นล้างด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 0.1 โมลาร์ 2- เมอร์แคปโตเอธานอล 0.01 เปอร์เซนต์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ 3-4 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วย elution buffer จนน้ำล้างมี pH ใกล้เคียงกับบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง หลังจากนั้นนำมาบรรจุลงไปคอลัมน์ขนาด 2.5 × 25 เซนติเมตร ผ่าน elution buffer ลงในคอลัมน์ที่บรรจุดีอีเออีเซลลูโลสปริมาตรอย่างน้อย 3-5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์



รูปที่ 8 ขั้นตอนการทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ให้บริสุทธิ์

2.10.2.2 การใช้คอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสโดยวิธีการชะด้วย linear salt gradient elution

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซ์แล้วจากข้อ 2.10.1 เติมลงในคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส แล้วชะด้วย elution buffer ประมาณ 400 มิลลิลิตรจนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์ (วัดค่า OD_{280} เท่ากับ 0) จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient ที่เป็นส่วนผสมของ elution buffer 250 มิลลิลิตร และโปแตสเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน 250 มิลลิลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์โดยการวัดความนำไฟฟ้าของโปแตสเซียมคลอไรด์ในสารละลาย นำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์มารวมกันจากนั้นทำให้ปริมาตรลดลงโดยใช้ aquacide ดึงน้ำออก แล้วนำไปไดอะไลซ์ วัดปริมาตร ตรวจวัดค่าแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนเพื่อที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์

2.10.3 การทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์

2.10.3.1 การเตรียมคอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์

แช่ไฮดรอกซีอะพาไทต์ 1 ส่วนกับ elution buffer 6 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) คนเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จนไฮดรอกซีอะพาไทต์ตกมารวมกันที่ก้นบีกเกอร์ เทผงละเอียดที่แขวนลอยอยู่ในบัฟเฟอร์ทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วกระจายไฮดรอกซีอะพาไทต์ในบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร จากนั้นนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2 × 10 เซนติเมตร ผ่านบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ที่บรรจุไฮดรอกซีอะพาไทต์ปริมาตรอย่างน้อย 3-5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์

2.10.3.2 การใช้คอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยวิธีการชะด้วย linear salt gradient elution

ผ่านสารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.10.2.2 ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วย elution buffer จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient ที่เป็นส่วนผสมของ elution buffer 50 มิลลิลิตร และ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 0.1 โมลาร์ ที่ประกอบด้วย 2-เมอร์แคปโตเอธานอล 0.01 เปอร์เซนต์และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ 50 มิลลิลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร

ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน แล้วนำมาวัดปริมาณโปรตีนด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์โดยการวัดความนำไฟฟ้าในสารละลาย จากนั้นนำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีมารวมกัน วัดปริมาตรรวม วัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีน

2.10.4 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้คอลัมน์บลูเซฟาโรส (ไดบาครอนบลู 3จี-เอ แอฟฟินิตี)

2.10.4.1 การเตรียมคอลัมน์บลูเซฟาโรส

คอลัมน์นี้มีสมบัติในการแยกเอนไซม์ที่ต้องการโคเอนไซม์ที่มีอะดีนีนเป็นองค์ประกอบ เช่น NAD^+ หรือ $NADP^+$ ออกจากโปรตีนอื่น โดยเอนไซม์กลุ่มนี้จะจับกับสีย้อมไดบาครอนบลู 3จี-เอ อย่างจำเพาะ เนื่องจากไดบาครอนบลู 3จี-เอมีโครงสร้างคล้ายกับโคเอนไซม์ของเอนไซม์นั้นๆ ขณะที่โปรตีนอื่น เช่น อัลบูมิน จับกับสีย้อมด้วยพันธะที่อ่อนกว่า เช่น electrostatic force และ/หรือ hydrophobic interaction โปรตีนที่จับกับลิแกนด์อย่างจำเพาะสามารถชะออกได้ด้วยโคเอนไซม์ความเข้มข้นต่ำ หรือการเพิ่มความเข้มข้นของไอออน (ionic strength)

คอลัมน์สำเร็จรูปที่ใช้มีขนาด 5 มิลลิลิตร ทำให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์โดยผ่านสารละลาย elution buffer ลงในคอลัมน์ปริมาตรอย่างน้อย 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

2.10.4.2 การใช้คอลัมน์บลูเซฟาโรสโดยวิธีการชะด้วย linear salt gradient elution

ผ่านสารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.10.3.2 ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วย elution buffer เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง elution buffer 10 มิลลิลิตร และโปแตสเซียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน 10 มิลลิลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน จากนั้นนำสารละลายมาวัดปริมาณโปรตีนโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของเกลือโปแตสเซียมคลอไรด์โดยการวัดค่าความนำไฟฟ้าของโปแตสเซียมคลอไรด์ในสารละลาย

แล้วนำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์มารวมกันทำให้ปริมาตรลดลงโดยใช้ aquacide ดึงน้ำออก แล้วไดอะไลซ์ วัดปริมาตร ตรวจวัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีน ตามลำดับ

2.10.5 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

2.10.5.1 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

แช่เซฟาเด็กซ์จี-200 10 กรัมในน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในน้ำเดือดนาน 10 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ ระหว่างที่ต้มคอยคนเบาๆ เพื่อไล่ฟองอากาศ จากนั้นมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและให้เจลนอนก้น ค่อยๆเทส่วนน้ำใสส่วนบนทิ้ง แล้วล้างเจลด้วยโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ใน elution buffer 3 ครั้ง แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.0 × 80 เซนติเมตรให้ได้เจลสูง 75 เซนติเมตร ผ่านสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ใน elution buffer ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเด็กซ์จี-200 อีกประมาณ 3-4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แรงดันการไหลของสารละลาย 16 เซนติเมตรของน้ำ (head pressure) เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์โดยการผ่านสารละลายบลูเดกซ์แทรน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตร และโปแตสเซียมไดโครเมต 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์

2.10.5.2 การใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

ผ่านสารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.10.4.2 ลงในคอลัมน์ (ปริมาตรไม่เกิน 2 เปอร์เซนต์ของปริมาตรคอลัมน์) แล้วชะด้วยโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ใน elution buffer เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายมาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกัน ทำให้ปริมาตรลดลงโดยใช้ aquacide ดึงน้ำออกแล้วนำไปไดอะไลซ์ วัดปริมาตร ตรวจวัดแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนตามลำดับ

2.11 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์

2.11.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งได้แก่ อะโปเฟอร์ริทิน (apoferritin) น้ำหนักโมเลกุล 443,000 ดาลตันความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตร บีตา-อะไมเลส (β-amylase) น้ำหนักโมเลกุล 200,000 ดาลตันความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตร อัลบูมิน (จากซีรัมของวัว) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตันความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตร อัลบูมิน (จากไข่ขาว) น้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตันความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตร และไมโอโกลบินน้ำหนักโมเลกุล 17,200 ดาลตันความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ใน elution buffer เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน วัดปริมาตรของสารละลายเมื่อโปรตีนแต่ละตัวออกจากคอลัมน์ และวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาค่า K_{av} ดังนี้

$$K_{av} = \frac{Ve\text{-}Vo}{Vt\text{-}Vo}$$

เมื่อ Ve คือ elution volume (ปริมาตรของสารละลายเมื่อโปรตีนหรือเอนไซม์ผ่านออกมา)

Vo คือ void volume (ปริมาตรของสารละลายเมื่อบลูเดกซ์แทรนผ่านออกมา)

Vt คือ bed volume (ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่)

หลังจากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุล (จากข้อ 2.10.4.2) ลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยสารละลาย 0.2 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ใน elution buffer เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำไปวัดปริมาณโปรตีนโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดปริมาตรของสารละลายเมื่อเอนไซม์ผ่านออกจากคอลัมน์เพื่อหา Ve จากนั้นคำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนดังกล่าวข้างต้น

2.11.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลกโทรโฟริซิสชนิดแผ่น (SDS-disc-polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1979)

2.11.2.1 การเตรียมเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (อะคริลาไมด์ 13 เปอร์เซนต์)

ผสมสารละลาย A1 (อะคริลาไมด์ 30.8 เปอร์เซนต์) 3.75 มิลลิลิตร สารละลาย B1 (Tris-HCl pH 8.8 1.5 โมลาร์) 2.25 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 2.61 มิลลิลิตรและสารละลาย E (แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 1.5 เปอร์เซนต์) 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำการดูดอากาศออกจากสารละลาย จากนั้นเติมสารละลาย C (SDS 10 เปอร์เซนต์) 0.09 มิลลิลิตร และ TEMED 4.5 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากัน หยอดลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้จนกระทั่งระดับสารละลายมีความสูงประมาณ 5.5 เซนติเมตร ค่อยๆหยอดบิวทานอลที่อิ่มตัวด้วยน้ำลงบนผิวหน้าเจลเบาๆและรวดเร็ว จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมงจะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและบิวทานอลอย่างชัดเจนซึ่งแสดงว่าเจลเกิดพอลิเมอร์ไรซ์อย่างสมบูรณ์แล้ว จากนั้นซับบิวทานอลออกให้หมดแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้งแล้วเตรียม stracking gel โดยผสมสารละลาย A2 (อะคริลาไมด์ 31.5 เปอร์เซนต์) 0.3 มิลลิลิตร สารละลาย B2 (Tris-HCl pH 6.8 0.5 โมลาร์) 0.75 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1.845 มิลลิลิตร และสารละลาย E (แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 1.5 เปอร์เซนต์) 0.075 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการดูดเอาฟองอากาศออกจากสารละลายแล้วเติมสารละลาย C (SDS 10 เปอร์เซนต์) 0.03 มิลลิลิตรและ TEMED 3.0 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากัน หยอดทับเจลชั้นล่างให้มีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วเสียบหวี (comb) เพื่อทำให้เกิดช่องว่างสำหรับหยอดสารตัวอย่าง ปล่อยให้เจลเกิดพอลิเมอร์ไรซ์อย่างสมบูรณ์ประมาณ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.11.2.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตไคเนส (จากกล้ามเนื้อกระต่าย) น้ำหนักโมเลกุล 85,000 ดาลตัน อัลบูมิน (จากซีรัมของวัว) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน กลูตาเมตดีไฮโดรจิเนส (จากตับของวัว) น้ำหนักโมเลกุล 55,600 ดาลตัน อัลบูมิน (จากไข่ขาว) น้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน ไคโมทริปซิโนเจน น้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน ไมโอโกลบิน น้ำหนักโมเลกุล 17,200 ดาลตัน และ ไซโตโครมซี น้ำหนักโมเลกุล 11,700 ดาลตัน เตรียมโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ให้มีความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.11.2.3 การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง 1 ส่วนและสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ 1 ส่วนโดยปริมาตร (ความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วง 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)แล้วนำไปบ่มที่ 100 องศาเซลเซียสนาน 2-5 นาที ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นผสมสีตามรอย (โบรโมฟีนอลบลู 0.05 เปอร์เซนต์) 1 ส่วนต่อสารตัวอย่าง 5 ส่วนโดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน

2.11.2.4 การทำอิเลคโทรโฟริซิส

บรรจุแผ่นเจลลงในแชมเบอร์ แล้วเทสารละลาย D (Tris 0.25 โมลาร์ ไกลซีน 1.92 โมลาร์ SDS 1 เปอร์เซนต์) ที่เจือจาง 10 เท่า ให้ท่วมปลายด้านบนและด้านล่างของแผ่นเจล ไล่ฟองอากาศออกจากด้านบนและล่างของแผ่นเจลออกให้หมด หยอดสารละลายโปรตีน (จากข้อ 2.11.2.3) ลงช่องบนผิวหน้าเจลแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 150 โวลต์โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน จนกระทั่งสีตามรอยเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะอีก 1 เซนติเมตรจะถึงปลายด้านล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

2.11.2.5 วิธีย้อมสีโปรตีนในเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

ถ่ายเจลจากข้อ 2.11.2.4 ออกจากแผ่นกระจกแล้วนำมาย้อมด้วยสารละลายสีย้อมโปรตีน (คูแมสซิบริลเลียนท์บลูอาร์-250 0.25 เปอร์เซนต์ เมทานอล 45 เปอร์เซนต์ กรดอะซิติก 9 เปอร์เซนต์) นานประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายล้างสีย้อมโปรตีน 1 (เมทานอล 5 เปอร์เซนต์ กรดอะซิติก 7 เปอร์เซนต์) และสารละลายล้างสีย้อมโปรตีน 2 (กรดอะซิติก 7 เปอร์เซนต์) ตามลำดับ จนกระทั่งเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอย่างชัดเจน

2.11.2.6 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

ทำได้โดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วนำมาคำนวณหาระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility) ดังนี้

$$\text{ระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility)} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

คำนวณหาระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility) ของเอนไซม์ แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนในข้อ 2.11.2.2

I17939185

2.11.3 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทและโคเอนไซม์ของเอนไซม์

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.5.3 (ปฏิกิริยา oxidative deamination) โดยวัดแอคติวิตีเมื่อใช้สับสเตรทต่างๆ กัน คือ ดีแอล-แอสปาร์เตต แอล-แอสปาร์เตต แอล-ฟีนิลอะลานีน แอล-ลูซีน แอล-เมทไทโอนีน แอล-ทรีโอนีน แอล-ไอโซลูซีน แอล-ทริปโตเฟน แอล-วาลีน ไกลซีน แอล-กลูตาเมต ดี-อะลานีน บีตา-อะลานีน แอล-ซิสเตอีน แอล-แอสพาราจีน ดีแอล-ไลซีน ดีแอล-มาเลต แอล-ซีรีน และ แอล-แอลฟา-อะมิโน-เอ็น-บิวไทเรตเทียบกับแอล-อะลานีน แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เทียบกับแอคติวิตีเมื่อใช้แอล-อะลานีนเป็นสับสเตรท ส่วนปฏิกิริยา reductive amination (ทำตามวิธีข้อ 2.5.4) วัดแอคติวิตีโดยใช้แอลฟา-คีโตบิวไทเรตเป็นสับสเตรทเทียบกับไพรูเวท แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เทียบกับแอคติวิตีเมื่อใช้ไพรูเวทเป็นสับสเตรท

ส่วนการศึกษาความจำเพาะของโคเอนไซม์ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.5.3 โดยใช้ $NADP^+$ เป็นโคเอนไซม์เทียบกับ NAD^+ แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เทียบกับแอคติวิตีเมื่อใช้ NAD^+ เป็นโคเอนไซม์

2.11.4 การศึกษาผลของสารเคมีที่มีต่อเอนไซม์

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.5.3 โดยใส่สารเคมีชนิดต่างๆ จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิโมลาร์ สารเคมีที่ใช้ได้แก่ พารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอต 5,5′-ไดไทโอ-บิส(2-ไนโตรเบนโซเอต) ไอโอโดอะเซตาไมด์ DTT EDTA แมกนีเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ แมงกานีสคลอไรด์ โคบอลต์คลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ คอปเปอร์ซัลเฟต ซิงค์ซัลเฟต แอล-กลูตาเมต ดี-ซิสเตอีน และซาโคซิน แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เทียบกับแอคติวิตีที่ภาวะมาตรฐาน

2.11.5 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

บ่มสารละลายเอนไซม์ใน elution buffer ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดแอคติวิตีตามวิธีข้อ 2.5.3 แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของอุณหภูมิที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาบ่มที่อุณหภูมิสูงสุดที่ไม่ทำให้แอคติวิตีของ

เอนไซม์ลดลงโดยบ่มที่เวลาต่างๆ กัน คือ ตั้งแต่ 0 ถึง 52 ชั่วโมง โดยนำสารละลายเอนไซม์มาตรวจวัดแอคติวิตีทุก 4 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของเวลาที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด

2.11.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.5.3 (ปฏิกิริยา oxidative deamination) โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของอุณหภูมิที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในปฏิกิริยา reductive amination (ทำตามวิธีข้อ 2.5.4) ที่อุณหภูมิ ต่างๆ คือ 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของอุณหภูมิที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด

2.11.7 การศึกษาผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.5.3 (ปฏิกิริยา oxidative deamination) โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในภาวะที่ใช้ไกลซีน-โปแตสเซียมคลอไรด์-โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ pH ต่างๆ คือ 9, 10, 10.5 และ 11 ตามลำดับ แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของ pH ที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด และทำการทดลองในปฏิกิริยา reductive amination (ข้อ 2.5.4) โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในภาวะที่ใช้โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6, 7, 8 และ 8.5 และ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7, 8, 8.5 และ 9 ตามลำดับ แล้วคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซนต์) เมื่อเทียบกับแอคติวิตีของ pH ที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดเช่นกัน

2.12 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

2.12.1 การหาค่า K_m

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.5.3 (ปฏิกิริยา oxidative deamination) โดยวัดแอคติวิตีเมื่อใช้แอล-อะลานีนความเข้มข้นต่างๆ คือ 2.5 , 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์

ที่ความเข้มข้นของ NAD^+ คงที่ต่างๆ ได้แก่ 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ แล้วนำไปสร้างกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของแอล-อะลานีนกับความเร็วเริ่มต้น เพื่อสร้างกราฟ secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้น NAD^+ ต่างๆ จะสามารถคำนวณค่า K_m ของ NAD^+ ได้ และจากกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของแอล-อะลานีนกับความเร็วเริ่มต้นจะสามารถสร้างกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของ NAD^+ กับความเร็วเริ่มต้นเพื่อสร้างกราฟ secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นแอล-อะลานีนต่างๆ จะสามารถคำนวณค่า K_m ของแอล-อะลานีนได้

จากนั้นทำการทดลองตามข้อ 2.5.4 (ปฏิกิริยา reductive amination) ในภาวะต่างๆ

1. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ คือ 10, 20, 40 และ 100 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของไพรูเวทคงที่ต่างๆ ได้แก่ 0.5 , 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นของ NADH สูงและคงที่เท่ากับ 0.25 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปสร้างกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรูเวทคงที่ต่างๆ และกราฟ secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นไพรูเวทต่างๆ จากกราฟที่ได้คำนวณค่า K_m ของแอมโมเนียม คลอไรด์และไพรูเวทตามลำดับ

2. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้ NADH ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของไพรูเวทคงที่ต่างๆ ได้แก่ 0.5, 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์สูงและคงที่เท่ากับ 0.25 โมลาร์ แล้วนำไปสร้างกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของ NADH กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรูเวทคงที่ต่างๆ

3. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้ NADH ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์คงที่ต่างๆ ได้แก่ 50, 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นของไพรูเวทสูงและคงที่เท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปสร้างกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของ NADH กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์คงที่ต่างๆ และกราฟ

secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างๆ จากกราฟที่ได้คำนวณค่า K_m ของ NADH และแอมโมเนียมคลอไรด์ตามลำดับ

2.12.2 การศึกษาผลการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์โดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา (product inhibition)

ทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 2.5.3 โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในภาวะต่างๆ

1. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้ NADH เป็นตัวยับยั้งต่อ NAD^+ ที่ความเข้มข้นของ NADH ต่างๆ คือ 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ NAD^+ คงที่ต่างๆ ได้แก่ 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ โดยมีความเข้มข้นของแอล-อะลานีนสูงและคงที่เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

2. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้ NADH เป็นตัวยับยั้งต่อแอล-อะลานีนที่ความเข้มข้นของ NADH ต่างๆ คือ 0, 0.05, 0.1 และ 0.2 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของแอล-อะลานีนคงที่ต่างๆ กัน ได้แก่ 2.5, 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ โดยมีความเข้มข้นของ NAD^+ สูงและคงที่เท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์

3. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้ไพรูเวทเป็นตัวยับยั้งต่อ NAD^+ ที่ความเข้มข้นของไพรูเวทต่างๆ คือ 0, 0.5, 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของ NAD^+ คงที่ต่างๆ ได้แก่ 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ โดยมีความเข้มข้นของแอล-อะลานีนสูงและคงที่เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

4. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้ไพรูเวทเป็นตัวยับยั้งต่อแอล-อะลานีนที่ความเข้มข้นของไพรูเวทต่างๆ คือ 0, 0.5, 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของแอล-อะลานีนคงที่ต่างๆ ได้แก่ 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ โดยมีความเข้มข้นของ NAD^+ สูงและคงที่เท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์

5. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นตัวยับยั้งต่อ NAD^+ ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างๆ คือ 0, 10, 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้น

ของ NAD^+ คงที่ต่างๆ ได้แก่ 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ โดยมีความเข้มข้นของแอล-อะลานีนสูงและคงที่เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

6. วัดแอคติวิตีเมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นตัวยับยั้งต่อแอล-อะลานีนที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างๆ คือ 0, 10, 20 และ 40 มิลลิโมลาร์ และความเข้มข้นของแอล-อะลานีนคงที่ต่างๆ ได้แก่ 5, 10 และ 20 มิลลิโมลาร์ โดยมีความเข้มข้นของ NAD^+ สูงและคงที่เท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์

จากนั้นนำค่าแอคติวิตีที่ความเร็วเริ่มต้นมาสร้างกราฟ double - reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรทและความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของตัวยับยั้งต่างๆ

2.13 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N

โดย Central instrument facillity มหาวิทยาลัยมหิดล