# บทที่ 3

## ผลการทดลอง

### การแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase จากแอนติซีรั่มของกระต่าย

1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนในสารละลายแอนติซีรั่ม ด้วยการใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่อย ๆ เติมสารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตลงไป จนกระทั่งสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 45 เปอร์เซนต์ ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 0-25 เปอร์เซนต์ จะเริ่มมองเห็นตะกอนโปรตีนเกิดขึ้นเล็กน้อย จนกระทั่งที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 45 เปอร์เซนต์ จะมีตะกอนเพิ่มขึ้นมาก ปั่นเก็บส่วนตะกอนแล้วละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 0.15 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 0.2-0.3 เท่าของปริมาตรแอนติซีรั่มตั้งต้น และไดอะไลซ์ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ pH 6.5 เพื่อเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ไปตรวจหาปริมาณของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน เพื่อหาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี (ตามวิธีทดลองการหาความจำเพาะของแอนติบอดี หน้า 35) ผลการทดลองพบว่า ได้ค่าไตเตอร์เท่ากับ $1:2^6$ (ตารางที่ 4 ) ซึ่งสูงกว่าค่าไตเตอร์ของสารละลาย crude antiserum ที่หาค่าได้เท่ากับ $1:2^2$ เมื่อใช้ 10 ไมโครลิตร ของแอนติซีรั่มที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนใกล้เคียงกันที่ความเจือจางแรกและความเจือจางถัดไปทั้งหมด

ตารางที่ 4 ผลการเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์

| Fraction | Volume (ml) | Protein* (mg/ml) | Antibody titer ** |
|---|---|---|---|
| crude antiserum | 60 | 56 | $1:2^2$ |
| ammonium sulfate purified antibody | 30 | 22 | $1:2^6$ |
| DEAE-cellulose purified antibody | 8 | 16 | $1:2^8$ |

* เป็นปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford

** ใช้ปริมาตรของสารละลายโปรตีนเท่ากันคือ 10 ไมโครลิตร โดยปรับให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากันในทุกลำดับการเจือจาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose

ในการทำสารละลายแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ได้ทดลองทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วยวิธี batch separation โดยนำสารละลายแอนติบอดีในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ pH 6.5 ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 1 ไปกวนกับDEAE-cellulose ที่ล้างเตรียมไว้แล้ว จากนั้นแยกเอาส่วนสารละลายออกจากเรซิน แล้วตรวจหาไตเตอร์ของสารละลายแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ในส่วนสารละลาย ผลการทดลองพบว่า ได้ค่าไตเตอร์เท่ากับ $1:2^{8}$ (ตารางที่ 4 ) แสดงว่าที่ pH 6.5 แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ไม่ยึดติดกับ DEAE-cellulose เรซิน

จากผลการทดลอง พบว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose สามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ไปได้ 96 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่หาได้ในทุกแฟรคชัน ดังแสดงในตารางที่ 4 และทำให้แอนติบอดีมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นมาก (โดยการเปรียบเทียบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีในสารละลายจากแต่ละขั้นตอน โดยปรับให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากัน )

**การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส**

ในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอสของแอนติบอดี สารในระบบจะทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีเสียสภาพธรรมชาติ แยกออกเป็นหน่วยย่อย 2 หน่วยคือโพลีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 ดาลตัน เรียกว่า heavy chain และโพลีเปปไทด์อีกเส้นหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน เรียกว่า light chain ( Harlow และ Lane, 1988)

เมื่อนำสารละลายแอนติบอดีที่เตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และสารละลายแอนติบอดีที่ผ่านการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-

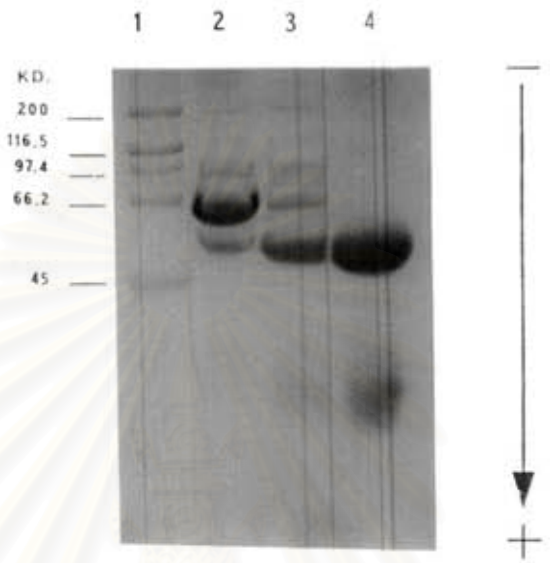
cellulose ไปทำการแยกโปรตีนโดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส แล้วติดตามแถบโปรตีนในแผ่นเจลโดยย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R - 250 ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 7 จากรูปจะเห็นแถบโปรตีนหลายแถบในตัวอย่างต่าง ๆ แต่แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 และ 25,000 ดาลตัน จะมีความชัดเจนและมีปริมาณเพิ่มขึ้น ในส่วนของสารละลายแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (lane 3) และจะปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน 2 แถบดังกล่าว ในตัวอย่างสารละลายแอนติบอดี ที่ผ่านการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose (lane 4) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ lane 2 ที่แสดงแถบโปรตีนในส่วน crude antiserum

**การหาปริมาณและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase**

เมื่อนำแอนติซีรั่ม และสารละลายแอนติบอดีที่เตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พร้อมทั้งสารละลายแอนติบอดีที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วยDEAE-cellulose ไปทำการทดลองอิมมูโนดิฟฟิวชัน เพื่อหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 8 พบว่าสารละลายแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความจำเพาะกับเอนไซม์ CGTase คือจะเห็นเป็นเส้นตะกอน (precipitin line ) เกิดขึ้น โดยมีค่าไตเตอร์เท่ากับ $1:2^2$ , $1:2^6$ , $1:2^8$ ตามลำดับ

**การตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำ**

นำสารละลายแอนติบอดีที่ละลายในคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ที่ได้จากการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วยDEAE-cellulose มาทดลองตรึงเข้ากับตัวค้ำได้แก่ CNBr - activated Sepharose 4 B โดยกำหนดให้ตรึงแอนติบอดี ปริมาณโปรตีน 5 มิลลิกรัมต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตร ( ตามข้อแนะนำ




รูปที่ 7 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

1. standard molecular weight protein : myosin (200 kD) , β-galactosidase (116.5 kD) , phosphorylase b (97.4 kD) , BSA (66.2 kD) และ ovalbumin (45 kD) 2 ไมโครกรัมโปรตีน
2. crude antiserum 10 ไมโครกรัมโปรตีน
3. ammonium sulfate purified antibody 10 ไมโครกรัมโปรตีน
4. DEAE-cellulose purified antibody 15 ไมโครกรัมโปรตีน

<u>รูปที่ 8</u> การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน

| | | | |
|---|---|---|---|
| หลุมกลาง (c) = | partially purified CGTase | 1 | ไมโครกรัมโปรตีน |
| A. หลุม 1-6 = | antiserum เจือจาง $2^{1}$-$2^{6}$ | 10 | ไมโครลิตร* |
| B. หลุม 1-6 = | ammonium sulfate purified antibody เจือจาง $2^{3}$-$2^{8}$ | 10 | ไมโครลิตร* |
| C. หลุม 1-6 = | DEAE-cellulose purified antibody เจือจาง$2^{5}$-$2^{10}$ | 10 | ไมโครลิตร* |

* ได้เจือจางให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากันที่ระดับความเจือจางแรก

ของการใช้ตัวค้ำชนิดนี้ โดยบริษัท Pharmacia (1979) หลังจากทำการตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำแล้ว ( วิธีทำการทดลองการตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำ หน้า 36 ) วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายแอนติบอดีก่อนและหลังจากผ่านการตรึง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 โดยการคำนวณหักลบปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในสารละลายแอนติบอดี หลังจากแยกตัวค้ำออกไปแล้ว และอนุมานว่าโปรตีนที่หายไปทั้งหมดตรึงติดกับตัวค้ำ จึงสรุปว่าสามารถตรึงแอนติบอดีได้ติด 98 เปอร์เซนต์ คิดเป็นปริมาณแอนติบอดี 4.9 มิลลิกรัมต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำแอนติบอดีที่ตรึงติดอยู่กับตัวค้ำไปบรรจุในคอลัมน์ เพื่อใช้ในการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ต่อไป

เพื่อยืนยันผลการตรึงแอนติบอดีกับตัวค้ำนั้น วิธีที่ใช้ตรวจสอบมีดังนี้

1 การตรวจสอบแอคติวิตีของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase

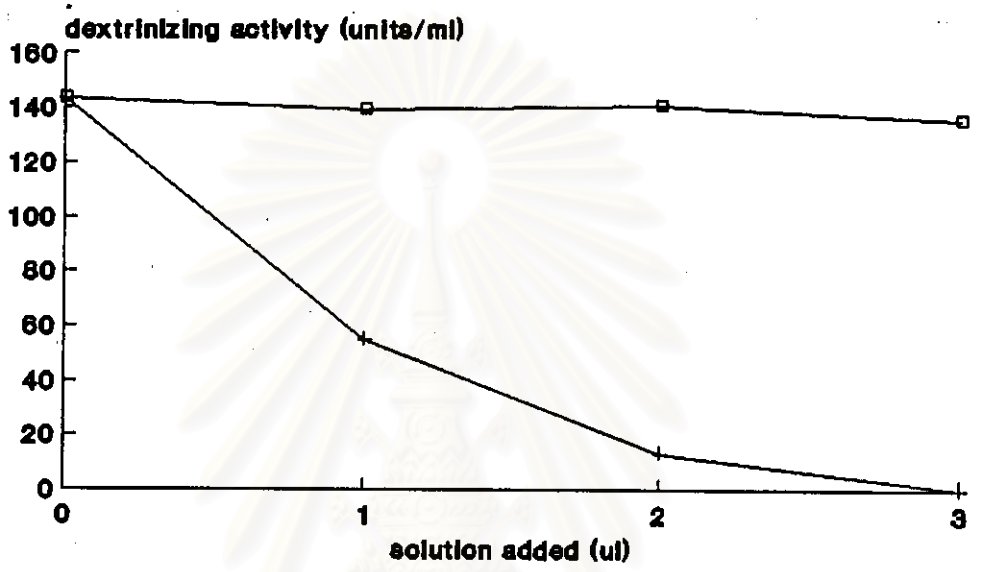
นำสารละลายแอนติบอดีก่อนและหลังผ่านการตรึงกับตัวค้ำ ( ปริมาตร 1-3 ไมโครลิตร ) ไปเติมลงในสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการดูดซับด้วยแป้ง ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีแอคติวิตีอยู่ในช่วง 100-120 Dextrinizing unit ต่อมิลลิลิตร) ปมที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ตามวิธี Dextrinizing activity ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 9 พบว่าสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่เติมสารละลายแอนติบอดีก่อนผ่านการตรึงกับตัวค้ำ มีแอคติวิตีลดลงอย่างมาก โดยลดลงประมาณ 65 เปอร์เซนต์ เมื่อเติมสารละลายแอนติบอดีเพียง 2 ไมโครกรัมโปรตีนและไม่เหลือแอคติวิตีเลยเมื่อเติมสารละลายแอนติบอดี 6 ไมโครกรัมโปรตีน เนื่องจากแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ CGTase เกิดเป็น

ตารางที่ 5 ผลการตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase เข้ากับตัวค้ำ CNBr-activated Sepharose 4B ( โดยใช้แอนติบอดี 5 มิลลิกรัมต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตร)

| | |
|---|---|
| *Initial amount of antibody* | 16.1 mg* [a] |
| Amount of matrix | 1.0 g ( 3.5 ml ) |
| Total volume of coupling sample | 7.7 ml |
| Total amount of unbound antibody | 0.3 mg* [b] |
| Calculated coupled antibody | 15.8 mg |
| Coupling efficiency | 98.0 % |
| Final concentration of antibody in gel | 4.9 mg/ml |

* เป็นปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford ในสารละลายแอนติบอดี (a) ก่อน (b) หลังการตรึง ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 9 การวัดประสิทธิภาพของการตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase กับตัวค้ำโดยการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ในสารละลายก่อนและหลังการตรึงกับตัวค้ำ นำสารละลายแอนติบอดีก่อน ( 2.1 mg protein/ml —+—) และหลัง ( 0.04 mg protein/ml —▪— ) ผ่านการตรึงกับตัวค้ำ ไปเติมลงในสารละลายเอนไซม์ CGTase ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเก็บส่วนน้ำใสไปวัด Dextrinizing activity

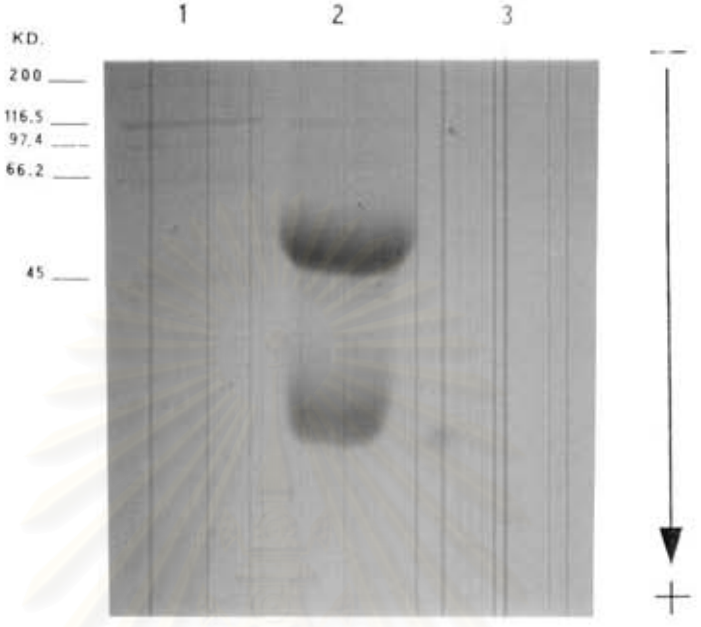
antibody-antigen complex ทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ส่วนสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่เติมสารละลายแอนติบอดีหลังผ่านการตรึงกับตัวค้ำ ยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่าเดิม เนื่องจากสารละลายแอนติบอดีหลังผ่านการตรึงกับตัวค้ำไม่มีแอนติบอดีหลงเหลืออยู่หรืออาจมีในปริมาณที่น้อยมากจึงไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CGTase ได้

2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

นำสารละลายแอนติบอดีก่อนและหลังผ่านการตรึงกับตัวค้ำ ไปทำการแยกโปรตีนโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 10 จากรูปจะเห็นว่า ไม่พบแถบโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อย ( subunit) ของแอนติบอดีในแผ่นเจล จากตัวอย่างสารละลายแอนติบอดีที่ผ่านการตรึงกับตัวค้ำ ( lane 3 ) แสดงว่า แอนติบอดีส่วนใหญ่ถูกตรึงติดกับตัวค้ำ

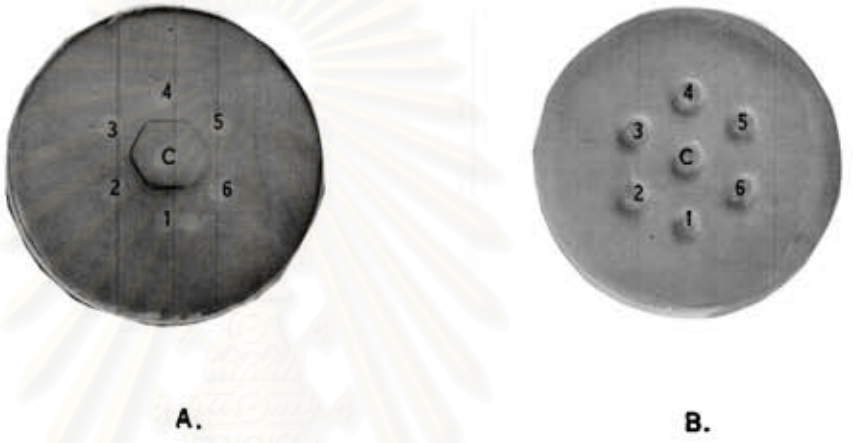
3 การทำอิมมูโนดิฟฟิวชัน

ทำการทดลองอิมมูโนดิฟฟิวชัน โดยเจือจางสารละลายแอนติบอดีก่อนและหลังผ่านการตรึงกับตัวค้ำ ในอัตราส่วนต่าง ๆ (1:2, 1:4, 1:8,...,$1:2^n$) และเติมลงในหลุมรอบ ๆ หลุมละ 10 ไมโครลิตร หลุมกลางเติมเอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วน 10 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีแอคติวิตีอยู่ในช่วง 100-120 Dextrinizing unit ต่อมิลลิลิตร) หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา พบว่าในส่วนสารละลายแอนติบอดีก่อนผ่านการตรึงกับตัวค้ำมีแอนติบอดีอยู่ ( ปริมาณโปรตีน 2.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ) จึงทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ CGTase เห็นเป็นเส้นตะกอนเกิดขึ้น ที่ระดับความเจือจาง $1:2^5$ ส่วนสารละลายแอนติบอดีหลังผ่านการตรึงกับตัวค้ำ ไม่มีแอนติบอดีหลงเหลืออยู่จึงไม่มีเส้นตะกอนเกิดขึ้นในทุกระดับความเจือจาง ดังแสดงในรูปที่ 11




รูปที่ 10 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ก่อนและหลังการตรึงกับตัวค้ำ แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

1. Standard molecular weight protein : myosin (200 kD) , β-galactosidase (116.5 kD) , phosphorylase b (97.4 kD) , BSA (66.2 kD) และ ovalbumin (45 kD) 2 ไมโครกรัม
2. สารละลายแอนติบอดีก่อนผ่านการตรึงกับตัวค้ำ 10 ไมโครลิตร
3. สารละลายแอนติบอดีหลังผ่านการตรึงกับตัวค้ำ 10 ไมโครลิตร




<u>รูปที่ 11</u> การทำอิมมูโนดิฟฟิวชันของสารละลายแอนติบอดีก่อนและหลังการตรึงกับตัวค้ำ

หลุมกลาง ( c ) = partially purified CGTase 1 ไมโครกรัมโปรตีน

A. หลุม 1-6 = สารละลายแอนติบอดีก่อน

ผ่านการตรึงกับตัวค้ำเจือจาง $2^{1}$ - $2^{6}$ 10 ไมโครลิตร

B. หลุม 1-6 = สารละลายแอนติบอดีหลัง

ผ่านการตรึงกับตัวค้ำเจือจาง $2^{0}$ - $2^{5}$ 10 ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์**

1 การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำ crude enzyme ที่เตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus sp.* A 11 ใน Horikoshi 's medium มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธีการดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้งตามวิธีในรูปที่ 6 ผลการทดลองพบว่าไม่มีการสูญเสียเอนไซม์ในขั้นตอนการดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้ง เนื่องจากแป้งสามารถดูดซับเอนไซม์ได้หมด โดยตรวจไม่พบ Dextrinizing activity ในส่วนใสที่เหลือ (A) และในส่วนของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการล้างตะกอนแป้งนั้น (ส่วนใส B ) ก็ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เช่นกัน จากนั้นจึงทำการชะเอนไซม์ออกจากแป้ง ด้วยสารละลาย 0.2 โมลาร์ มอลโตสใน 10 มิลลิโมลาร์ ทริส - ไฮโดรคลอไรบัฟเฟอร์ pH 8.5 ที่มี แคลเซี่ยมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ (โดยปกติใช้สารละลายมอลโตส ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในแต่ละครั้งที่ชะ ถ้าเริ่มจาก crude enzyme ปริมาตร 1 ลิตร) และลดปริมาตรลงโดยใช้ Ultrafiltration membrane แบบ PM 10 พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้นี้มีค่าแอคติวิตีจำเพาะ 2,277 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 107 เท่า และค่า enzyme yield เท่ากับ 87 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 6 ) จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยเรซินแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนที่เตรียมได้

2 การทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน

นำสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน จากข้อ 1 (ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 1.7 มิลลิกรัม) ใส่ลงในแอนติบอดีคอลัมน์ (ขนาด 0.6 x 1.2 เซนติเมตร) ที่เตรียมได้โดยการตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase กับ CNBr-activated Sepharose 4 B ดังรายละเอียดในวิธีทำการทดลองการตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำ หน้า 36 ชะด้วยแอซีเดทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีกเมื่อตรวจสอบโดยการติดตามการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาว

ตารางที่ 6 สรุปผลการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์

| Step | volume (ml) | Dextrinizing activity (total units) | Total protein (mg) | Specific activity(unit/mg) | Recovery (%) | Purification fold | CD-TCE (dilution limit) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| crude enzyme | 1,000 | 13,240 | 620.0 | 21 | 100 | 1 | $1:2^{6}$ |
| starch adsorption | 7.4 | 11,545 | 5.1 | 2,277 | 87 | 107 | $1:2^{10}$ |
| antibody column * | 19 | 5,944 | 1.8 | 3,302 | 45 | 155 | $1:2^{11}$ |

* แอนติบอดีคอลัมน์ขนาด 0.8 x 4.5 เซนติเมตร ( ปริมาตรเจล 5 มิลลิลิตร )

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คลื่น 280 นาโนเมตร จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วยการทดลองใช้สารละลายหลายชนิดและได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการชะเอนไซม์ CGTase ออกจากคอลัมน์ให้ได้สูงสุด โดยการแปรปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่

2.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำโครมาโทกราฟี ในทุกการทดลองขั้นตอนที่นำสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนใส่ลงในแอนติบอดีคอลัมน์ จะทำที่อุณหภูมิ 4 °ซ ส่วนในขั้นตอนการชะเอนไซม์ CGTase ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ จะทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ( 20-25 °ซ) และที่อุณหภูมิ 4 °ซ เปรียบเทียบกัน ผลการทดลองพบว่า การทดลองที่ใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 เป็นสารชะที่อุณหภูมิห้อง สามารถชะเอนไซม์ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ 29 เปอร์เซนต์ ในขณะที่อุณหภูมิ 4 °ซ ไม่สามารถชะเอนไซม์ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ (ดูภาคผนวกที่ 1 , 2 และ 10 ) การทดลองต่อ ๆ มาจึงเลือกที่จะทำการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ที่อุณหภูมิห้อง

2.2 อัตราการไหลของสารละลาย (flow rate) ในการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนเพื่อแยกเอนไซม์ CGTase ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ ขั้นตอนที่นำสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนใส่ลงในแอนติบอดีคอลัมน์ ทุกการทดลองใช้อัตราไหลในช่วง 1.5-2.0 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ส่วนในขั้นตอนการล้างและชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ ได้ทดลองแปรอัตราไหล 3 ระดับที่ 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการทดลองพบว่า การทดลองที่แปรอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถชะเอนไซม์ CGTase ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ดีที่สุดโดยจากการเปรียบเทียบค่า enzyme yield ของการทดลองที่ใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ เป็นสารชะ การทดลองที่ใช้อัตราการชะ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที มีค่า enzyme yield 90 เปอร์เซนต์ ในขณะที่การทดลองที่ใช้อัตราการชะ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาทีมีค่า enzyme yield 51 เปอร์เซนต์ (ดูรูปที่ 12

และภาคผนวกที่ 3 และ 10 )

2.3 ชนิดของสารชะ ได้ทดลองใช้สารประเภทต่าง ๆ ในการชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนดิบอดีคอลัมน์ ก่อนการชะได้ทดลองศึกษาผลของสารเหล่านี้ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase (ตารางที่ 7 ) โดยการเตรียมสารละลายของสารเหล่านี้ ได้แก่ สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 ที่มียูเรีย 8 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 7 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 ที่มีไดออกเซน 20 เปอร์เซนต์ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ที่มียูเรีย 8 โมลาร์ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 7 โมลาร์ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ที่มีไดออกเซน 20 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำสารเหล่านี้ไปผสมกับสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (ปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีแอคติวิตีอยู่ในช่วง 100-120 Dextrinizing unit ต่อมิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ตามวิธี Dextrinizing activity ( ในการทดลองได้ทำหลอดควบคุมโดยใส่สารชะความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับที่ใช้ชะลงใน reaction mixture เพื่อใช้เปรียบเทียบผล ) ผลการทดลองพบว่าโซเดียมไธโอไซยาเนตมีผลต่อเอนไซม์ CGTase โดยทำให้เอนไซม์ CGTase สูญเสียแอคติวิตีไปบางส่วน ส่วน ไดออกเซน ยูเรีย และ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีผลต่อเอนไซม์ CGTase เมื่อทดลองผลของสารชะต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase แล้วจึงทดลองใช้ในการชะคอลัมน์ โดยแบ่งสารที่ใช้ชะออกเป็น 5 ประเภทได้แก่

2.3.1 สารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงเช่น สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ได้ทดลองใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 เป็นสารชะ พบว่าสามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ 29 เปอร์เซนต์ (ดูภาคผนวกที่ 1 และ 10 )

2.3.2 สารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (protein denaturant) เช่น ยูเรีย ได้ทดลองใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มียูเรีย 4 โมลาร์ เป็นสารชะ พบว่าไม่สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ ( ภาคผนวกที่ 4 และ 10 ) แต่เมื่อใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ร่วมกับยูเรีย 4 โมลาร์เป็นสารชะ พบว่าสามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ 35 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ 5 และ 10 )

2.3.3 สารที่ลดความเป็นโพลาร์ (polar reducing agent) เช่น ไดออกเซน ได้ทดลองใช้สาร ละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีไดออกเซน 10 เปอร์เซนต์เป็นสารชะ พบว่าไม่สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ ( ภาคผนวกที่ 6 และ 10 ) แต่เมื่อใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ร่วมกับไดออกเซน 10 เปอร์เซนต์เป็นสารชะ พบว่าสามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ 1 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ 7 และ 10 )

2.3.4 สับสเตรทของเอนไซม์ CGTase เช่น เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ได้ทดลองใช้สารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน 1 เปอร์เซนต์เป็นสารชะ พบว่าไม่สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ (ภาคผนวกที่ 8 และ 10 )

2.3.5 สารที่ทำให้เกิดความไม่เป็นระเบียบ (chaotropic ion ) เช่น โซเดียมไธโอไซยาเนต ได้ทดลองใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มี โซเดียม

ตารางที่ 7 ผลของสารต่าง ๆ ที่ใช้เป็นสารชะในแอนติบอดีคอลัมน์ต่อ Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase

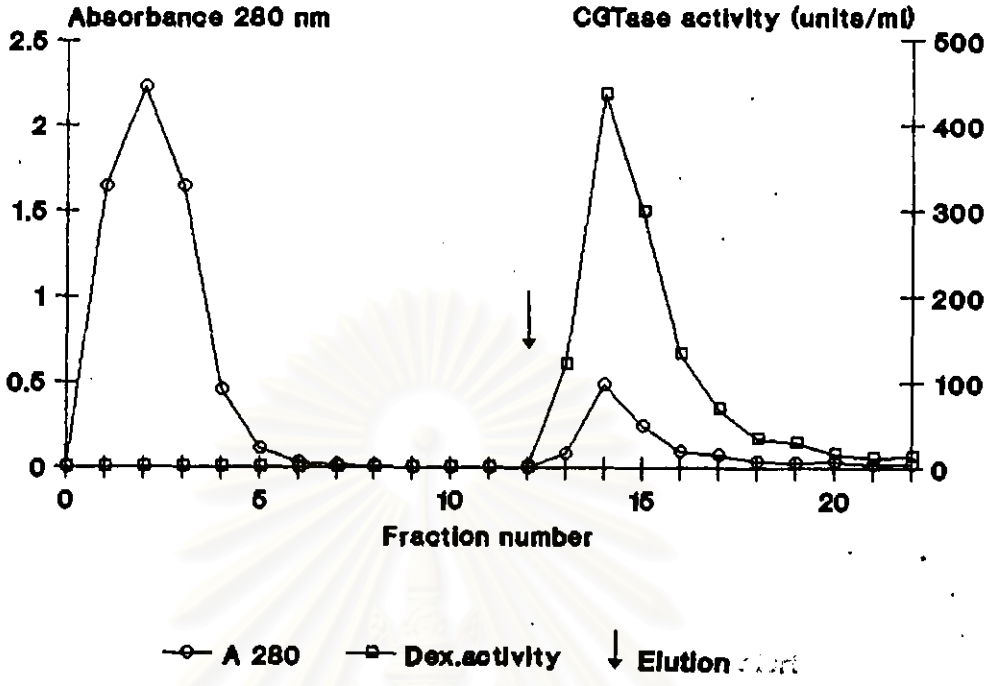
| Chemicals | Relative activity * (%) |
|---|---|
| Ammonium hydroxide , 50 mM , pH 10.5 | 110 |
| Acetate buffer , 50 mM , pH 6.0 + Dioxane 10 % . | 108 |
| Ammonium hydroxide , 50 mM , pH 10.5 + Dioxane 10 % | 102 |
| Acetate buffer , 50 mM , pH 6.0 + Urea 4 M | 106 |
| Ammonium hydroxide , 50 mM , pH 10.5 + Urea 4 M | 104 |
| Acetate buffer, 50 mM ,pH 6.0 + Sodium thiocyanate 3.5 M | 60 |
| Ammonium hydroxide, 50 mM , pH 10.5 + Sodium thiocyanate 3.5 M | 63 |

* ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธี Dextrinizing activity

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ เป็นสารชะ พบว่าสามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากคอลัมน์ได้ 11 เปอร์เซนต์ ( ภาคผนวกที่ 9 และ 10 ) แต่เมื่อใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ร่วมกับโซเดียมไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ เป็นสารชะ พบว่าสามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนดิบอดีคอลัมน์ได้ถึง 51 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ 3 และ 10 )

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนเพื่อแยกเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์คือ ในขั้นตอนการชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนดิบอดีคอลัมน์เลือกทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ใช้อัตราการชะ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที และสารละลายแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ เป็นสารชะที่ดีที่สุด แม้ว่าโซเดียมไซโอไซยาเนตจะยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์บางส่วน แต่ในการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน หลังจากชะคอลัมน์แล้วได้นำ fractions แช่ในน้ำแข็งทันทีแล้วไดอะไลซ์ด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ก่อนนำไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ซึ่งเป็นการลดช่วงเวลาที่เอนไซม์อยู่ในสารละลายโซเดียมไซโอไซยาเนต ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 พบว่าเมื่อผ่านสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ลงในแอนดิบอดีคอลัมน์ สามารถแยกโปรตีนออกเป็น 2 พีค โดยพีคแรกซึ่งเป็นพีคใหญ่จะออกจากคอลัมน์ เมื่อชะด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ส่วนโปรตีนพีคที่ 2 ซึ่งเป็นพีคเล็กจะออกจากคอลัมน์ เมื่อชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ และนำ fractions ทั้งหมดไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน พบว่าในโปรตีนพีคที่ 1 ตรวจไม่พบ Dextrinizing activity แต่ตรวจพบในพีคที่ 2 และยังตรวจพบความสามารถในการสร้างไซโคลเดกซ์ทรินเมื่อตรวจสอบ



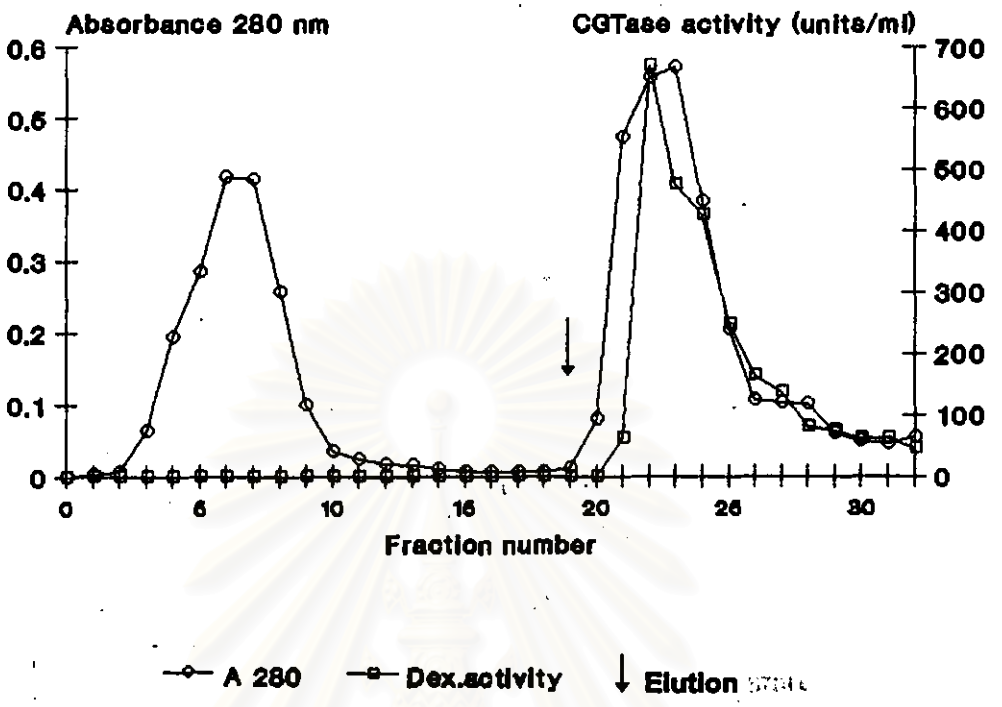

รูปที่ 12 การแยกเอนไซม์ CGTase ด้วยแอนติบอดีคอลัมน์ ( 0.6 x 1.2 เซนติเมตร ) ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์

ผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 1.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในแอนติบอดีคอลัมน์ (ขนาด 0.6 x 1.2 เซนติเมตร) ล้างด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ ( ขั้นตอนการชะทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง ) อัตราการชะ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 2 มิลลิลิตร

ด้วยวิธี Cyclodextrin - trichloroethylene assay เฉพาะในโปรตีนพีคที่ 2 อีกด้วย แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ CGTase เท่ากับ 4,185 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 111 เท่า ค่า enzyme yield เท่ากับ 90 เปอร์เซนต์

**การขยายขนาดแอนติบอดีคอลัมน์**

ทำการทดลองขยายขนาดแอนติบอดีคอลัมน์ประมาณ 5 เท่า เพื่อให้สามารถรองรับเอนไซม์ CGTase ที่จะบรรจุลงในคอลัมน์ได้มากขึ้น โดยเปลี่ยนจากคอลัมน์ขนาด 0.6 x 1.2 เซนติเมตร ( ปริมาตรเจล 1 มิลลิลิตร ) และบรรจุสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 1.7 มิลลิกรัม ) เป็นขนาด 0.8 x 4.5 เซนติเมตร ( ปริมาตรเจล 5 มิลลิลิตร ) และทำการทดลองโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน โดยนำสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปริมาตร 7.4 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 5 มิลลิกรัม ) ใส่ลงในแอนติบอดีคอลัมน์ ใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ที่พบว่าเป็นสารชะที่ดีที่สุด ( รูปที่ 12 ) และใช้สภาวะอื่น ๆ เหมือนการชะในรูปที่ 12 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 13 พบว่าได้รูปแบบการแยกเหมือนในคอลัมน์เล็ก โดยเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น แต่มีค่า enzyme yield ต่ำกว่าคอลัมน์เล็กคือได้แอคติวิตีจำเพาะ 3,302 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 155 เท่า และ enzyme yield 45 เปอร์เซนต์ ( ตารางที่ 6 )



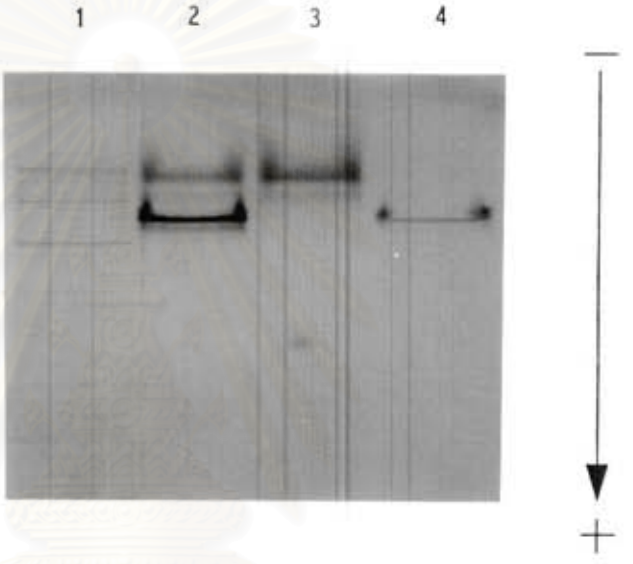

รูปที่ 13 การแยกเอนไซม์ CGTase ด้วยแอนติบอดีคอลัมน์ ( 0.8 x 4.5 เซนติเมตร ) ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์

ผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปริมาตร 7.4 มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในแอนติบอดีคอลัมน์ (ขนาด 0.8 x 4.5 เซนติเมตร) ล้างด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ ( ขั้นตอนการชะทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง) อัตราการชะ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแยกส่วนหลอดละ 2 มิลลิลิตร

**การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CGTase โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส**

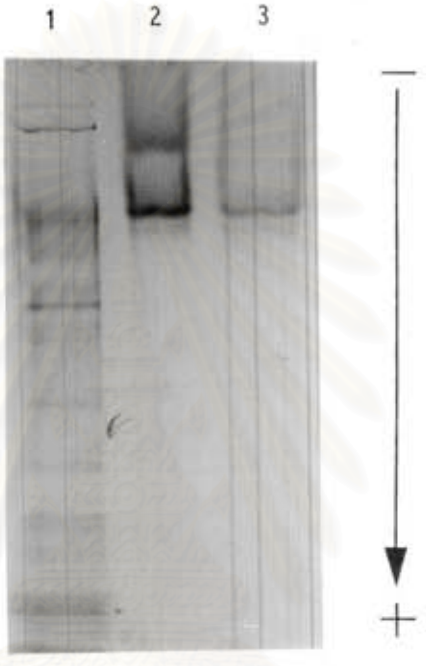
1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ

นำสารละลายในระหว่างขั้นตอนการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ได้แก่ น้ำเลี้ยงเชื้อ (crude enzyme) สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โปรตีนพีคแรกที่ไม่จับแอนติบอดีคอลัมน์ ( fraction no.6 จากคอลัมน์ ( 0.8 x 4.5 เซนติเมตร ) สารชะที่ใช้คือสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ อัตราการชะ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที, รูปที่ 13 ) สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านแอนติบอดีคอลัมน์ (โปรตีนพีค 2 ที่ออกมากับสารชะ) ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ ติดตามแถบโปรตีนในแผ่นเจล โดยย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R - 250 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 14 จะเห็นว่า น้ำเลี้ยงเชื้อ (crude enzyme) จะปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ (lane 1 ) ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ( lane 2 ) เหลือโปรตีน 4 แถบเข้มที่สุดคือแถบที่ 3 และแถบจาง ๆ แถบที่ 4 มีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ( รูปที่ 16 , 17 ) ส่วนโปรตีนพีคที่ 1 ที่ผ่านแอนติบอดีคอลัมน์ออกมากับบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์และไม่มี Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบบน (lane 3) ส่วนโปรตีนพีคที่ 2 ที่ออกมากับสารชะปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ โดยแถบหนึ่ง ( แถบ 3 ) มีความชัดเจนกว่าอีกแถบหนึ่ง ( แถบ 4 ) มาก (lane 4 รูปที่ 14 และ lane 3 รูปที่ 15) จากการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ในแผ่นเจล โดยย้อมแผ่นเจล ด้วยสารละลายไอโอดีน (รูปที่ 16) จะพบแถบใสในแผ่นเจล 2 แถบ ในทุกขั้นตอนของการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ และจากการย้อมแผ่นเจลโดยวิธี Dye staining for cyclodextrin จะพบแถบสีเหลืองในแผ่นเจลที่มีสีพื้นเป็นสีแดง 2 แถบ ซึ่งตรงกับแถบโปรตีน 2 แถบนั้น ดังแสดงในรูปที่ 17




<u>รูปที่ 14</u> รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ของการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ

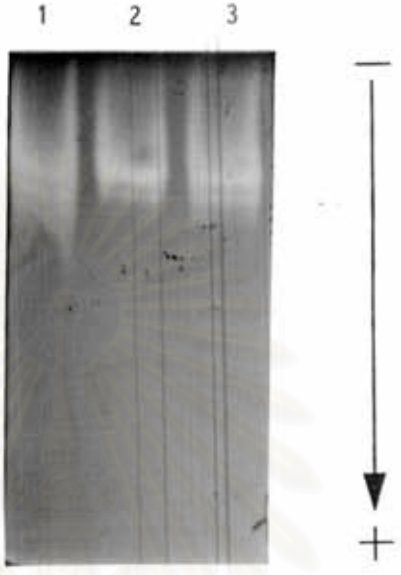
| | | |
|---|---|---|
| 1. Crude enzyme | 15 | ไมโครกรัมโปรตีน |
| 2. Partially purified CGTase | 20 | ไมโครกรัมโปรตีน |
| 3. Fraction no. 6 from antibody column ( รูปที่ 13 ) | 10 | ไมโครกรัมโปรตีน |
| 4. Affinity purified CGTase | 5 | ไมโครกรัมโปรตีน |




<u>รูปที่ 15</u> รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ของการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ *

| | | |
|---|---|---|
| 1. Crude enzyme | 15 | ไมโครกรัมโปรตีน |
| 2. Partially purified CGTase | 20 | ไมโครกรัมโปรตีน |
| 3. Affinity purified CGTase | 5 | ไมโครกรัมโปรตีน |

* โพลีอะคริลาไมด์เจล 7.5 เปอร์เซนต์



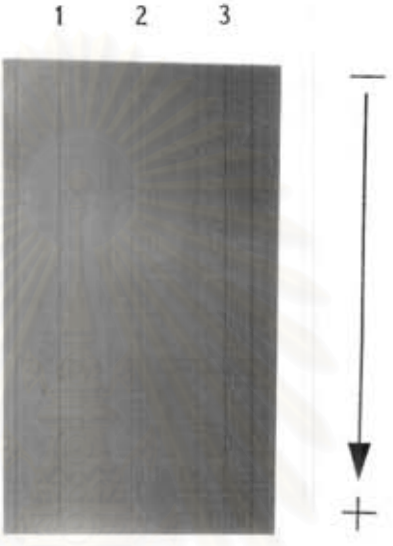

<u>รูปที่ 16</u> รูปแบบการย้อมสี Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่างๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ * อุณหภูมิ 10 °ซ

1. Crude enzyme 0.2 units **
2. Partially purified CGTase 0.2 units **
3. Affinity purified CGTase 0.2 units **

* โพลีอะคริลาไมด์เจล 7.5 เปอร์เซนต์

** Dextrinizing activity

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




<u>รูปที่ 17</u> รูปแบบการย้อม Dye staining for cyclodextrin ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่างๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ * อุณหภูมิ 10 °ซ

1. Crude enzyme 2.0 units**
2. Partially purified CGTase 2.0 units**
3. Affinity purified CGTase 2.0 units**

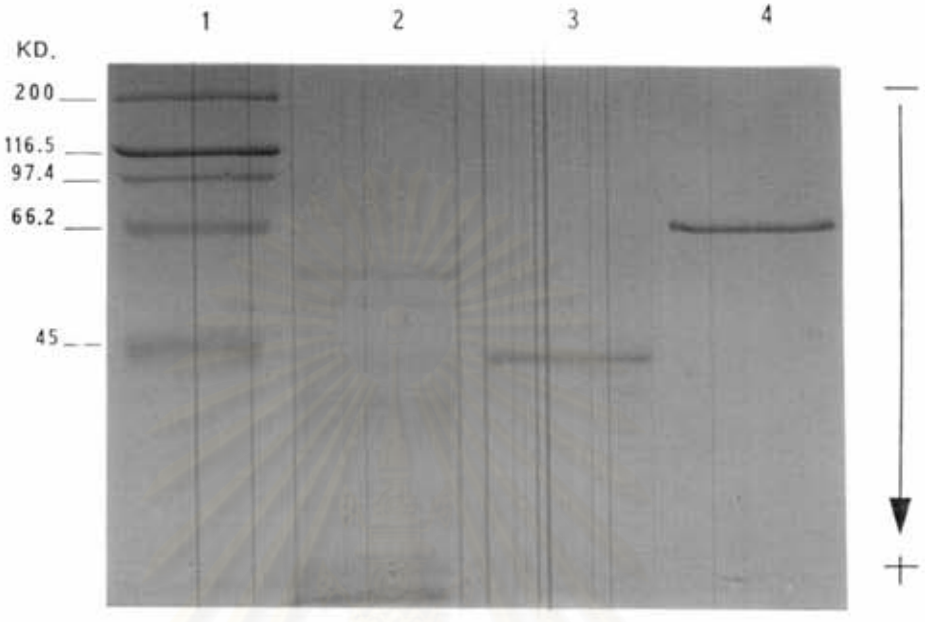
* โพลีอะคริลาไมด์เจล 7.5 เปอร์เซนต์

** Dextrinizing activity

2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

นำสารละลายในระหว่างขั้นตอนการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ได้แก่ สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โปรตีนพีคแรกที่ไม่จับแอนดิบอดีคอลัมน์ (fraction no. 6 จากคอลัมน์ ( 0.8 x 4.5 เซนติเมตร ) สารที่ใช้ชะคือสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ อัตราการชะ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที, รูปที่ 13 ) สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านแอนติบอดีคอลัมน์ (โปรตีนพีคที่ 2 ที่ออกมากับสารชะ) ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีสแบบเอสดีเอส ติดตามแถบโปรตีนในแผ่นเจลโดยย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 18 จะเห็นว่าสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน 6 แถบ (lane 2) ส่วนโปรตีนพีค 2 ที่ออกมากับสารชะ ปรากฏแถบโปรตีนชัดเจนเพียง 1 แถบ (lane 4) จากการเปรียบเทียบแถบโปรตีนใน lane ที่ 4 กับโปรตีนมาตรฐาน (lane 1 ) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนนี้ มีค่าประมาณ 72,000 ดาลตัน ส่วนสารละลายโปรตีนที่ไม่จับกับแอนติบอดีคอลัมน์ (fraction no.6 รูปที่ 13) ปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน 1 แถบ (lane 3) ซึ่งไม่ตรงกับแถบโปรตีนใน lane ที่ 4 และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45,000 ดาลตัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




<u>รูปที่ 18</u> รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

1. Standard molecular weight protein : myosin (200 kD) , β-galactosidase (116.5 kD) , phosphorylase b (97.4 kD) , BSA (66.2 kD) และ ovalbumin (45 kD) 2 ไมโครกรัมโปรตีน
2. Partially purified CGTase 15 ไมโครกรัมโปรตีน
3. Fraction no.6 from antibody column ( รูปที่ 13 ) 10 ไมโครกรัมโปรตีน
4. Affinity purified CGTase 3 ไมโครกรัมโปรตีน