บทที่ 2

วิธีการทดลอง

เครื่องมือ

-เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) แบบ Spectronic 20D บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A. และ แบบ UV-240 บริษัท Shimadzu, Japan

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Radiometer Copenhagen , Denmark

-เครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่อุณหภูมิต่ำ (Refrigerated centrifuge) บริษัท Beckman Instrument Inc, U.S.A

-เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) บริษัท Charles Hearson Co.,Ltd.,England

-เครื่องอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Hirayama Manufacturing Corperation, Japan

-เครื่องปั๊มเพอริสตอลติก (Peristaltic pump) บริษัท LKB- Productor AB, Sweden

-เครื่องเก็บแยกส่วน (Fraction collector) บริษัท LKB- Productor AB, Sweden

-เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath) บริษัท Heto lab equipment, Denmark

-เครื่องกรองชนิดละเอียด (Ultrafiltration) แบบ Stirred Cell 8400 บริษัท Amicon MA, U.S.A.

-อุปกรณ์อิเลคโทรโฟรีซิส ประกอบด้วย Vertical Electrophoresis Unit แบบ LKB 2001-001 , Cooling System แบบ 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator และ Constant Power Supply แบบ 1000/500 บริษัท BioRad NY, U.S.A.

เคมีภัณฑ์

-สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A.

Bovine serum albumin fraction V

CNBr- activated Sepharose 4B product number (C-9142)

Coomassie brilliant blue G-250

Coomassie brilliant blue R-250

β-Cyclodextrin

DEAE-cellulose resin

Glycine

2-mercaptoethanol

Soluble starch (potato)

Sodium thiocyanate

-สารเคมีจากบริษัท BDH Laboratory Chemical Division, England

Dioxane

Ethanolamine

Phenolphthalein

Trichloroethylene

Urea

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

-สารเคมีจากบริษัท BBL, Becton Dickinson Company, U.S.A.

Noble agar

สารเคมีทั่วไปชนิดอื่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารเกรดวิเคราะห์ทั้งหมด จากบริษัท Sigma Chemical Company, U.S.A., บริษัท Difco Laboratories, U.S.A., บริษัท BDH Laboratory Chemical Division, England , บริษัท Merck, Germany และบริษัท Fluka A.G. Buchs S.G., Switzerland สำหรับแป้งข้าวเจ้า (ตราช้างสามเศียร) และแป้งข้าวโพด (ตรา Maizena) เป็นแป้งสำหรับใช้ในการประกอบอาหารซื้อจากร้านค้าทั่วไป

วัสดุชีวภาพ

1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Bacillus sp. A11 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในบริเวณแอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987)

2 แอนติซีรั่ม

เป็นส่วนซีรั่มจากเลือดของกระต่าย ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนคือเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (จิราพร โรจน์ทินกร, 2537) ซึ่งเก็บแช่แข็งไว้ที่ -80 ^{o}ซ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Beef extract	5	กรัม

Peptone	10	กรัม
NaCl	2	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Soluble starch (Fluka)	10	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที ถ้าต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเติม Bacto agar 1.5 เปอร์เซนต์ (w/v)

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1971; อุไรวรรณ รัชชร, 2536)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Starch (แป้งข้าวเจ้า)	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
Na_2CO_3	7.5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 10.1 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย

1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1 สารละลายแป้งมาตรฐาน

ละลายแป้ง (soluble starch, potato) 0.2 หรือ 2.0 กรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มจนสารละลายเดือด ทิ้งให้เย็นก่อนใช้

1.2 สารละลายไอโอดีน

ละลายไอโอดีน 0.2 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา เมื่อต้องการใช้ให้เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10

2 สารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 มิลลิกรัม เอธานอล 95 เปอร์เซนต์ 50 มิลลิลิตร และกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ (w/v) 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง แล้วเก็บในขวดสีชา

3 สารละลายสำหรับการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.1 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมีโนมีเธน 1.21 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 1.47 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.2 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มี แคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์

ละลายโซเดียมอะซิเตท 4.1 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 0.74 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วยกรดแอซีติก เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4 สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ (Non denaturing - polyacrylamide gel electrophoresis)

4.1 สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (Electrophoresis buffer)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมีโนมีเธน 3 กรัม และไกลซีน 14.4 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.2 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 (4x Separating buffer, pH 8.8)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมีโนมีเธน 18.2 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.3 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.8 (4x Stacking buffer, pH 6.8)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมีโนมีเธน 6 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.4 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide stock solution)

ชั่งอะคริลาไมด์ 30 กรัม และ บิส-อะคริลาไมด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

4.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้เตรียมใหม่ๆ ทุกครั้งที่ใช้

4.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (5x Sample buffer)

ผสมทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ pH 6.8 3.1 มิลลิลิตร, โบรโมฟีนอลบลู 1 เปอร์เซนต์ 0.5 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

4.7 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

ละลาย Coomassie brilliant blue R-250 1 กรัม ในเมธานอล 450 มิลลิลิตร เติมกรดอะซีติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.8 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

ผสมเมธานอล 100 มิลลิลิตร และกรดอะซีติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

5 สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

5.1 สารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (Electrophoresis buffer)

เตรียมเหมือนข้อ 4.1 แต่ให้เติม SDS 0.1 เปอร์เซนต์ (w/v)

5.2 สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 8.8 (4x Separating buffer)

เตรียมเหมือนข้อ 4.2 แต่ให้เติม SDS 0.4 เปอร์เซนต์ (w/v)

5.3 สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 6.8 (4x Stacking buffer)

เตรียมเหมือนข้อ 4.3 แต่ให้เติม SDS 0.4 เปอร์เซนต์ (w/v)

5.4 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide stock solution)

เตรียมเหมือนข้อ 4.4

5.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

เตรียมเหมือนข้อ 4.5

5.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (5x Sample buffer)

ผสมทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ pH 6.8 0.6 มิลลิลิตร, โบรโมฟีนอลบลู 1 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร, กลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร, SDS 10 เปอร์เซนต์ 2 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

5.7 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining solution)

เตรียมเหมือนข้อ 4.7

5.8 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

เตรียมเหมือนข้อ 4.8

6 สารละลายสำหรับการตรึงแอนติบอดี

6.1 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 4.2 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 14.6 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

6.2 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 4.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมอะซิเตท 4.1 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 14.6 กรัม ในน้ำ

กลั่น ปรับ pH ให้เป็น 4 ด้วยกรดแอซีติก เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

6.3 สารละลายเอธานอลามีน 1 โมลาร์ pH 8.0

ผสมเอธานอลามีน 6 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

6.4 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 0.15 โมลาร์ pH 7.4

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 8 กรัม , โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม , ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.15 กรัม , และ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปรับให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7 สารละลายสำหรับแอฟฟินิตีคอลัมน์

7.1 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมอะซิเตท 2.1 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 14.6 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วยกรดแอซีติก เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

7.2 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน 1 เปอร์เซนต์

ละลายโซเดียมอะซิเตท 0.4 กรัม และเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วยกรดแอซีติก ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.3 สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5

ผสมสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 32 เปอร์เซนต์) 0.6 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 10.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

7.4 สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์

ละลายโซเดียมไซโอไซยาเนต 28.4 กรัม ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

7.5 สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มียูเรีย 4 โมลาร์

ละลายยูเรีย 24 กรัม ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

7.6 สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีไดออกเซน 10 เปอร์เซนต์

ผสมไดออกเซน 10 มิลลิลิตร ในสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเอนไซม์ CGTase

1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Inoculum preparation)

เขี่ยเชื้อจาก agar slant 1 loop ใส่ลงในขวดรูปชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I อยู่ 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ รอจนสามารถวัดความขุ่นของเซลล์ที่ 420 นาโนเมตร ได้ค่าประมาณ 0.3-0.5 หน่วย

2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase

ใส่ Inoculum ความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi 's medium (ที่ปรับปรุงแล้ว ; อุไรวรรณ, 2536) 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำใสคือ สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

1 Dextrinizing activity (Iodine method)

ดัดแปลงจากวิธีของ Fuwa (1954)

เติมสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลายแป้ง (soluble starch, potato) 0.2 เปอร์เซนต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน แล้วเติม Iodine reagent 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

หลอดควบคุม (control) ให้ใส่เอนไซม์ภายหลังการเติมกรดไฮโดรคลอริก

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินของสารประกอบแป้ง-ไอโอดีนลดลง 10 เปอร์เซนต์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

2 Cyclodextrin-trichloroethylene assay

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1986)

นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ (1:2,1:4,1:8,...1:2^n) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายแป้ง (soluble starch, potato) ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 ^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเติมสารละลายไตรคลอโรเอธิลีน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12 ชั่วโมง บันทึกผลการเกิดตะกอน Cyclodextrin-trichloroethylene complex เป็นค่า dilution limit (1:2^n)

กำหนดให้ dilution limit (1:2^n) คือ 1:2, 1:4, 1:8,.. 1:2^n เป็นค่าที่สารละลายเอนไซม์เจือจางมากที่สุดที่ยังสังเกตเห็นตะกอนขาวที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นแป้งและสารไตรคลอโรเอธิลีนได้

การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำตามวิธี micromethod ของ Bradford (1976)

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน (protein reagent) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 5-60 นาที ภายหลังการเติมสารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin fraction V (ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร)

การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน

ทำตามวิธีของอุไรวรรณ รัชชร (2536) ซึ่งดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีการของ Kato และ Horikoshi (1984)

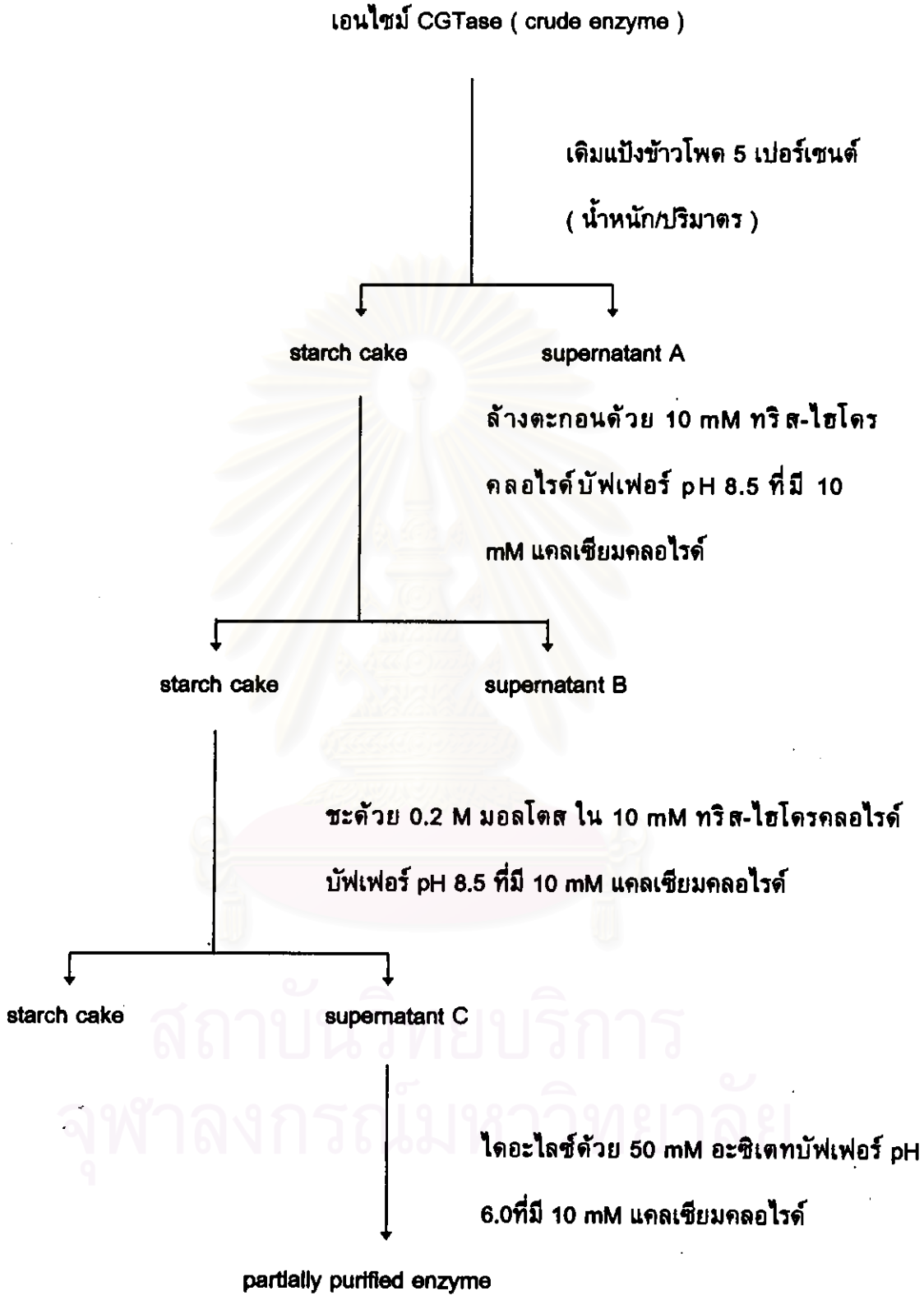
นำสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยเติมแป้งข้าวโพด (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 120 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นก่อนใช้) 5 เปอร์เซนต์ (w/v) คนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกตะกอนแป้งด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำตะกอนแป้งมาล้างด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง แล้วชะเอนไซม์ออกจากแป้งด้วยการกวนในสารละลายมอลโตส 0.2 โมลาร์ ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที (ใช้สารละลายมอลโตส ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในแต่ละครั้งที่ล้างถ้าเริ่มจาก crude enzyme 1 ลิตร) ปั่นแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปไดอะไลซ์ใน อะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง (รูปที่ 6)

การแยกแอนติบอดีจากแอนติซีรั่ม

1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Harlow และ Lane (1988)

เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวลงในแอนติซีรั่มอย่างช้า ๆ คนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก จนกระทั่งสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 45



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6. แผนภาพการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน

เปอร์เซนต์ คนต่อไปอีกเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ล้างตะกอนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวความเข้มข้น 45 เปอร์เซนต์ นำไปปั่นแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 0.15 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 0.3-0.4 เท่าของปริมาตรของแอนติซีรั่มดั้งต้น นำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลซ์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 0.15 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง

2 การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose (DEAE-cellulose chromatography)

ทำตามวิธีของ Harlow และ Lane (1988)

แช่ DEAE-cellulose 60 กรัมในกรดไฮโดรคลอริก 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนน้ำใสออก ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ คนให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนน้ำใสออก ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆครั้ง แล้วล้างด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 มิลลิโมลาร์ pH 6.5 จนได้ค่า pH ของส่วนน้ำใสเป็น 6.5

ผสมสารละลายแอนติบอดีที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30 มิลลิลิตร กับ DEAE-cellulose ที่ล้างไว้แล้ว 60 กรัม (น้ำหนักเปียก) เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร กวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ หลังจากนั้นนำไปกรองเก็บส่วนสารละลายไว้และไดอะไลซ์ในคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง

การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ (Non denaturing-polyacrylamide gel electrophoresis)

ทำตามวิธีของ Davis (1964)

1.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล 10 เปอร์เซนต์

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ข้อ 4.4) 6.8 มิลลิลิตร ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 (ข้อ 4.2) 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 8.2 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติม TEMED 10 ไมโครลิตร และ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ (ข้อ 4.5) 100 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล (gel mold) ซึ่งเป็นแผ่นกระจกสี่เหลี่ยมขนาด 8.3x10.1 เซนติเมตร วางขนานห่างกัน 1.5 มิลลิเมตร จนกระทั่งสารละลายมีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร (ห่างจากขอบบน 2.3 เซนติเมตร) ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าของเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน จึงเทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล

เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ข้อ 4.4) 1.35 มิลลิลิตร ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.8 (ข้อ 4.3) 2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 4.6 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติม TEMED 10 ไมโครลิตร และ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ (ข้อ 4.5) 60 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วเท stacking gel ลงในแบบเจลให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิเมตร ใส่หวี (comb) ไล่ฟองอากาศออก ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นเจลแข็งแล้วค่อย ๆ ดึง comb ออก แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การเตรียมสารละลายโปรตีน

นำสารละลายโปรตีน มาเติมบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ข้อ 4.6) ในอัตราส่วน 5:1 เขย่าให้เข้ากัน แล้วหยอดส่วนผสมนี้ลงบนหลุมเจลที่เตรียมไว้ ให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 1-100 ไมโครกรัม/หลุม

1.3 การทำอิเลคโทรโฟรีซิส

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ (ข้อ 4.1) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นบนและชั้นล่างให้ท่วมปลายทั้งสองข้าง ของแผ่นเจล หยอดสารละลายโปรตีน (ข้อ 1.2) ลงบนหลุมเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 20 มิลลิแอมแปร์ต่อแผ่นเจล ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งแถบสี (tracking dye) เคลื่อนที่ไปอยู่ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 5 มิลลิเมตร จึงปิดกระแสไฟฟ้า

1.4 การติดตามแถบโปรตีน

1.4.1 Coomassie blue staining

นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมโปรตีน (ข้อ 4.7) เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออก ด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (ข้อ 4.8) หลายครั้ง จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอย่างชัดเจน

1.5 การติดตามเอนไซม์แอคติวิตีในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล

1.5.1 Dextrinizing activity staining

ทำตามวิธีของจิราพร โรจน์ทินกร (2537) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Fuwa (1954)

นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่ในสารละลายแป้ง 2 เปอร์เซนต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที

หลังจากนั้นนำไปล้างแป้งส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายไอโอดีน (0.2 เปอร์เซนต์ (w/v) I_2 ใน 2.0 เปอร์เซนต์ (w/v) KI) แถบโปรตีนที่มีเอนไซม์ CGTase จะปรากฏเป็นแถบใสในแผ่นเจลที่มีพื้นเป็นสีน้ำเงิน

1.5.2 Dye staining for cyclodextrin

ทำตามวิธีของทิพย์สุภา มาลัย, (2535) ซึ่งดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Park (1989)

นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่ในสารละลายแป้ง 2 เปอร์เซนต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 โม ลาร์ pH 6.0 ที่มี phenolphthalein 0.03 เปอร์เซนต์ และ methyl orange 0.01 เปอร์เซนต์ ซึ่งได้ปรับ pH ให้เป็น 10.3 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แถบโปรตีนที่มีเอนไซม์ CGTase จะปรากฏเป็นแถบสีเหลืองในแผ่นเจลที่เป็นสีแดง-ส้ม

2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

ทำตามวิธีของ Laemmli (1970)

2.1 การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์เจล 10 เปอร์เซนต์

เตรียมเหมือนข้อ 1.1 แต่ใช้สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส

2.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ที่ต้องการวิเคราะห์

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือสารละลายผสมของ โอวัลบูมิน (Ovalbumin), อัลบูมิน

(Bovine serum albumin), ฟอสฟอริลเรส บี (Phosphorylase B) เบตา-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) และไมโอซิน (Myosin) น้ำหนักโมเลกุล 45,000, 66,200, 97,400, 116,250 และ 200,000 ดาลตัน ตามลำดับ

ละลายโปรตีนมาตรฐานในบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ข้อ 5.6) ในอัตราส่วน 1:20 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ โดยนำไปผสมกับบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ข้อ 5.6) ในอัตราส่วน 5:1 นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °ซ เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใส่ ในช่องบนเจลที่เตรียมไว้ โดยให้มีปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างอยู่ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมต่อช่องเจล

2.3 การทำอิเลคโทรโฟรีซิส

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ใน (ข้อ 2.2) มาทำอิเลคโทรโฟรีซิส โดยทำเช่นเดียวกับการทำอิเลคโทรโฟรีซิสใน (ข้อ 1.3) แต่ใช้ทริส-เอสตีเอสอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (ข้อ 5.1) แทนทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 10 °ซ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง

2.4 การติดตามแถบโปรตีน

นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก นำมาย้อมสีโปรตีนตามวิธี (ข้อ 1.4.1)

การหาความจำเพาะของแอนติบอดี

วิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน (Immunodiffusion) ทำตามวิธีของ Ouchterlony (1980)

ละลายวุ้น (noble agar) 1 กรัม ในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายวุ้น 3.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในจาน (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตรงกลาง 1 หลุมและรอบ ๆ 6 หลุม แต่ละหลุมอยู่ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร เติมแอนติซีรั่มที่เจือจางใน

I 17432522

อัตราส่วนต่าง ๆ (1:2, 1:4, 1:8,...1:2^n) หลุมละ 10 ไมโครลิตร ในหลุมรอบ ๆ หลุมกลาง เติมเอนไซม์ CGTase 10 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) วางในกล่องที่ชื้น ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างโปรตีนส่วนเกินออกโดยเทโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์ ให้ท่วมผิววุ้นทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ย้อมสีเส้นตะกอน(precipitin line) ด้วยน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ข้อ 1.4.1) จนเห็นเส้นตะกอนคมชัด

การตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำ

ทำตามวิธีของบริษัท Pharmacia (1979)

ล้างตัวค้ำ CNBr-activated Sepharose 4B ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที (ตัวค้ำแห้ง 1 กรัมเมื่อล้างแล้วจะได้เจลปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร) ผสมสารละลายแอนติบอดีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว จากข้อ 2 หน้า 29 กับเจลที่เตรียมไว้ ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่า ๆ เบา ๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ จากนั้นกรองสารละลายแอนติบอดีออกโดยการใช้กระดาษกรอง Whatman no. 1 แล้วแช่เจลในสารละลายเอธานอลามีน 1 โมลาร์ เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดสารละลายทิ้งแล้วล้างเจลด้วยสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์และสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 4.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำเจลไปบรรจุในคอลัมน์ พลาสติกขนาด 0.6 x 1.2 และขนาด 0.8 x 4.5 เซนติเมตร ผ่านฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ 0.15 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 3-4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ ก่อนที่จะนำแอนติบอดีคอลัมน์ไปทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนให้ผ่านสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 20 เท่าของปริมาตรคอลัมน์

การทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน

นำสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (หน้า 29) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 1.7 มิลลิกรัม) และ ปริมาตร 7.4 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 5 มิลลิกรัม) ใส่ลงในแอนติบอดีคอลัมน์ ขนาด 0.6 x 1.2 และ 0.8 x 4.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในสภาพสมดุลย์แล้ว ด้วยอัตราการไหล 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยใช้เพอริสทอลติกปั๊มควบคุมอัตราไหล ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีก โดยติดตามด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร หลังจากนั้นชะเอนไซม์ CGTase ออกจากคอลัมน์ซึ่งได้ทดลองใช้สารละลายหลายชนิดได้แก่ สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มียูเรีย 4 โมลาร์ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มียูเรีย 4 โมลาร์ สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีไดออกเซน 10 เปอร์เซนต์ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีไดออกเซน 10 เปอร์เซนต์ สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน 1 เปอร์เซนต์ เพื่อหาสารชะที่ดีที่สุด ด้วยปริมาตร 20 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 0.1-0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (Fraction collector) นำไปไดอะไลซ์ใน อะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง นำสารละลายทุกหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น

280 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีน วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และทำการแยกโปรตีน โดยวิธีการทำเจลอิเลคโทรโฟรีซิส เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย