บทที่ 3

วิธีทดลอง

3.1 แบคทีเรีย

3.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.1.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Beef Extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
NaCl	2	กรัม
Yeast Extract	2	กรัม
soluble Starch (บริษัท Fluka)*	10	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0โมลาร์นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเติม Bacto-Agar 15 กรัมต่อลิตร ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ

3.1.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium II

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Corn Steep Liquor	50	กรัม
Soluble Starch (บริษัท BDH)	10	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม

---

* ใช้ในกรณีต้องการติดตามการเจริญของเชื้อโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี เนื่องจาก soluble starch ของบริษัทการค้าอื่นทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นเล็กน้อย

ปรับ pH ให้เป็น pH ที่ต้องการด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ ก่อนนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ในกรณีที่ใช้แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว แป้งสาลี หรือแป้งมันสำปะหลังแทน Soluble Starch ให้นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 2-3 นาที ก่อนนำไป autoclave

3.1.2 <u>การเพาะเลี้ยง</u>

3.1.2.1 <u>การเตรียมเชื้อตั้งต้น</u> (Starter Inoculation)

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียจากหลอด lyophilized 1 ลูป (loop) ลงบน agar plate ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีจาก master plate ลงบน agar plate ใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่เขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีจาก agar plate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง (erlenmayer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเข้าช่วงทวีคูณ (log phase) คือวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 0.3 หน่วย ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

3.1.2.2 <u>การเพาะเลี้ยงเชื้อและติดตามการเจริญของแบคทีเรีย</u>

ดูดเชื้อตั้งต้น 0.5 มิลลิลิตร (ข้อ 3.1.2.1)ใส่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ medium I pH 7.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง (erlenmayer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 110-120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96-120 ชั่วโมง ในระหว่างนั้นทำการเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร ที่เวลาต่าง ๆ มาติดตามการเจริญของเชื้อ โดยวัดความขุ่นด้วยเครื่องวัดการดูดแสง (Spectronic 20 D) ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

3.1.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase

นำเชื้อที่เลี้ยงในข้อ 3.1.2.2 มาแยกหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ทุก 24 ชั่วโมง โดยการปั่นให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะในห้องเย็น ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase เก็บสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีเอนไซม์แอคติวิตีสูงไว้ศึกษาต่อไป

3.1.2.4 การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูง

ทดลองใช้วัตถุดิบทางการเกษตรในประเทศ เช่น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และแป้งสาลี เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนแทน soluble starch หรือเปลี่ยนปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 0 - 5 เปอร์เซนต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II เพื่อติดตามการผลิตเอนไซม์ CGTase ของแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อ Bacillus สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูง โดยใส่เชื้อตั้งต้น 0.5 มิลลิลิตร (ข้อ 3.1.2.1) ลงไปในน้ำเลี้ยงเชื้อ medium II ที่ประกอบด้วยแป้งชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง pH 6-10 ที่อุณหภูมิ 30°, 37° และ 42° ซ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร ทุก 24 ชั่วโมง มาปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เก็บส่วนน้ำใสไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีน

3.1.2.5 เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ CGTase จาก Bacillus สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูงกับบาซิลลัสสายพันธุ์มาตรฐาน ACTT 21783

เพาะเลี้ยงเชื้อ Bacillus สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูงกับบาซิลลัสสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 21783 โดยใส่เชื้อตั้งต้น 0.5 มิลลิลิตร (ข้อ 3.1.2.1) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II ปริมาตร 50 มล. (ข้อ 3.1.2.1) และ medium II ที่เติม Na_2CO_3 1 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 50 มล ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร ทุก 24 ชั่วโมงมาปั่นเก็บส่วนน้ำใสที่มีเอนไซม์แอคติวิตีสูงไว้ศึกษาต่อไป

3.1.3 การเก็บรักษา

3.1.3.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

เก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองไว้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I ชนิดแข็ง ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วยาวประมาณ 30 เซนติเมตร (ข้อ 3.1.1.1) ในลักษณะลาดเอียง โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีจาก agar plate ไป streak บน slant agar บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ จนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มที่ ปิดฝาจุกให้แน่นแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม (Laboratory sealing film) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ นานไม่เกิน 1 เดือน เมื่อต้องการใช้เชื้อในการทดลอง จะนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลาต่อไป

3.1.3.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I ชนิดเหลว (ข้อ 3.1.1.1) จนเชื้อเจริญถึงระยะทวีคูณ (log phase) แล้วเก็บเชื้อในขวดขนาด 5 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 เปอร์เซนต์ เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาขวดให้แน่นแล้วปิดทับฝาด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ มีอายุการเก็บประมาณ 1 ปี

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

3.2.1.1 สารละลายอะซีเตต บัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์

ละลายโปแตสเซียมอะซีเตต (CH_3COOK) 1.96 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ของสารละลายด้วยกรดอะซีติก 0.2 โมลาร์ จนได้ pH 3, 4 หรือ 5 ตามต้องการ แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

3.2.1.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6

ละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 2.27 กรัม และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.58 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.2.1.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 7

ละลายโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.91 กรัม และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 2.32 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.2.1.4 สารละลายทรีส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์

ละลายทรีส(ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane) 2.42 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ ให้เป็น 8 หรือ 9 ตามต้องการ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.1.5 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ PH 10

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.69 กรัม และโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 1.14 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.2.1.6 สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซม์บัฟเฟอร์ pH 11

ละลายไกลซีน 1.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซม์ 1 โมลาร์ จนได้ pH 11 ตามต้องการ

3.2.1.7 สารละลายไอโอดีน (Iodine Reagent)

ละลายไอโอดีน 0.2 กรัม และโปแตสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อต้องการใช้ ให้เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10

3.2.1.8 สารละลายแป้งมาตรฐาน 0.2 และ 2.0 เปอร์เซนต์

ละลายแป้งมันสำปะหลัง (Potato Soluble Starch) 0.2 หรือ 2.0 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที

3.2.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

สารละลายโปรตีน (Protein Reagent) ประกอบด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250 100 มิลลิกรัม เอธานอล 95 เปอร์เซนต์ 50 มิลลิลิตร และกรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ (W/V) 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

3.2.3 สารละลายสำหรับโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง

3.2.3.1 การเตรียม Microcrystalline cellulose

ผสม Microcrystalline Cellulose 10 กรัม กับน้ำกลั่น 43 มิลลิลิตร ในขวดทรงกรวยที่มีฝาปิด (Stoppered conical flask) ขนาด 250 มิลลิลิตรเขย่าแรง ๆ ให้เข้ากัน เป็นเวลา 40 วินาที แล้วนำไปเคลือบบนแผ่นแก้วทันที

3.2.3.2 สารละลาย methanolic iodine 1 เปอร์เซ็นต์

ละลายไอโอดีน 1 กรัม ในเมธานอล 100 มิลลิลิตร

3.2.3.3 สารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน

ละลาย α-, β- และ γ- Cyclodextrin มาตรฐานชนิดละ 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3.2.4 สารละลายสำหรับการทำเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานสเฟอเรสให้บริสุทธิ์บางส่วน

3.2.4.1 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)- อะมิโนมีเธน (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane) 1.82 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.2.4.2 สารละลายทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ - 0.1 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ (Tris HCl - NaCl)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 5.84 กรัม ในสารละลายทริส - ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ปริมาตร 1 ลิตร

3.2.5 สารละลายสำหรับการทำดิสค์โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (Disc - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

3.2.5.1 สารละลายอีเลคโตรดบัฟเฟอร์ (Tris-glycine electrode buffer, pH 8.3)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 3 กรัม และไกลซีน 14.4 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 5 ลิตร

3.2.5.2 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-chloride buffer stock solution, pH 8.9)

ละลายทรีส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมิโนมีเธน 36.6 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ 48 มิลลิลิตร และ TEMED 0.23 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.5.3 สารละลายทรีส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-chloride buffer stock solution, pH 6.7)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเธน 5.98 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ 48 มิลลิลิตร และ TEMED 0.46 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.7 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.5.4 สารละลายอะไครลาไมด์ 7.5 เปอร์เซนต์ (Resolving gel acrylamide stock solution)

ชั่งอะไครลาไมด์ 28 กรัม และ BIS 0.74 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองแล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานไม่เกิน 2 สัปดาห์

3.2.5.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2.5.6 สารละลายสีตามรอย (Tracking Dye)

ละลายโบรโมฟีนอล บลู 25 มิลลิกรัม ในสารละลายทรีส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.7 10 มิลลิลิตร

3.2.5.7 บัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (Sample Buffer)

ผสมทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.7 25 มิลลิลิตรกับกลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.2.5.8 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining Solution)

ละลายคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู (Coomassie Brilliant Blue R 250) 2.5 กรัม ในเมธานอล 100 มิลลิลิตร คนให้ละลาย กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.2.5.9 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining Solution)

ผสมเมธานอล 350 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก 70 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

3.2.6 สารละลายสำหรับการทำเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซีส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

3.2.6.1 สารละลายอีเลคโตรดบัฟเฟอร์ (Tris - SDS electrode buffer, pH 8.3)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมิโนมีเธน 15.15 กรัม ไกลซีน 72 กรัม และ SDS 5 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 5 ลิตร

3.2.6.2 สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 6.8 (Tris-SDS stock solution, pH 6.8)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมิโนมีเธน 39.4 กรัม และ SDS 2 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.2.6.3 สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 8.8 (Tris-SDS stock solution, pH 8.8)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล) - อะมิโนมีเธน 118.2 กรัม และ SDS

2 กรัมในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.2.6.4 สารละลายอะไครลาไมด์ 7.5 เปอร์เซนต์ (Acrylamide stock solution)

ชั่งอะไครลาไมด์ 30 กรัม และ BIS 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานไม่เกิน 2 สัปดาห์

3.2.6.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2.6.6 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (Sample buffer)

ผสมสารละลายทรีส-เอสดีเอส pH 6.8 25 มิลลิลิตร SDS 2 กรัม กลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 5 มิลลิลิตร และ 1 เปอร์เซนต์ โบรโมฟีนอล บลู 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

3.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

3.3.1 Dextrinizing activity (Iodine Method)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Fuwa (1954) เป็นการวัดการไฮโดรไลส์พันธะ α - 1,4 glucosidic ของแป้ง โดยเอนไซม์จะทำให้โมเลกุลของแป้งมีขนาดเล็กลง และให้สีกับสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป คือเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีม่วงหรือไม่มีสี การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ไม่มีความจำเพาะต่อ CGTase เนื่องจากเอนไซม์อื่น ๆ ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์ α - 1,4 glucosidic bond เช่น amylase ก็สามารถให้ผลเช่นเดียวกัน

เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายแป้งมันสำปะหลัง (Soluble Starch) 0.2 % ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.3

มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex Genie) แล้วเติม iodine reagent (ข้อ 3.2.1.6) ลงไป 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร วัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

หลอดควบคุม (control) ให้ใส่เอนไซม์หลังการเติมกรดไฮโดรคลอริก

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

แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (Specific activity) คือ จำนวนหน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนหนึ่งมิลลิกรัม

3.3.2 <u>Cyclodextrin - trichloroethylene assay</u> (CD-TCE assay)

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1984) เป็นการวัดปริมาณสารไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ CGTase จึงเป็นการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase โดยตรง ใช้วิธีนี้ในการเตรียมสารไซโคลเดกซ์ทรินด้วย

เจือจางสารละลายเอนไซม์ในอัตราส่วนต่าง ๆ (1:2,1:4,1:8,...) โดยการเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 แล้วเติมสารละลายเอนไซ์เจือจาง 1 มิลลิลิตรลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไตรคลอโรเอธิลีน (trichloroethylene) 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดค้างคืนประมาณ 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,..., $1:2^n$ เป็นค่าที่สารละลายเอนไซม์เจือจางมากที่สุดที่ยังสังเกตเห็นตะกอนขุ่นที่เกิดขึ้นได้

3.4 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน

นำตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย TCE ในข้อ 3.3.2 ไปละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อย ต้มใน water bath อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 นาทีจนตะกอนละลายหมด แล้วนำสารละลายไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin - Layer Chromatography , TLC) หรือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.4.1 วิธี Thin - layer Chromatography (TLC)

ทำตามวิธีของ Takeo และคณะ (1970) เป็นวิธีการที่ไม่แพง แต่ใช้ระยะเวลานานประมาณ 4 ชั่วโมงและมีความไวต่อ CD 3-5 µg

3.4.1.1 การเตรียมแผ่น Microcrystalline Cellulose

ผสม microcrystalline cellulose กับน้ำกลั่นตามวิธีข้อ 3.2.3.1 แล้วเทสารผสมลงในเครื่องลาก (spreader) ซึ่งปรับความหนาไว้ 250 ไมโครเมตร ลาก spreader ไปตามแผ่นแก้วที่สะอาดและแห้งขนาด 0.25 x 20 x 20 เซนติเมตร ด้วยความเร็วสม่ำเสมอจนสุดแผ่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องค้างคืน แล้วเก็บไว้ในตู้อบแห้งจนกว่าจะใช้

3.4.1.2 การเตรียมถังแก้วโครมาโตกราฟีให้สมดุลย์ (chamber equilibration)

ผสมตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วย n-butyl alcohol :ethyl alcohol : water อัตราส่วน 4:3:3 (โดยปริมาตร) เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในถังแก้ว (Chromatographic tank) ปิดฝาถัง ทิ้งไว้ให้สมดุลย์ ประมาณ 1 ชั่วโมงเตรียมสารละลายนี้ก่อนทำการทดลองเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

3.4.1.3 การวิเคราะห์ CDs

ใช้หลอดแก้วขนาดเล็ก (capillary tube) ดูดสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินตัวอย่างและสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน (ข้อ 3.2.3.3) อย่างละ 10 ไมโครลิตรมาหยดลงบนแผ่น microcrystalline cellulose (ข้อ 3.8.1.1) ปล่อยให้สารละลาย

ซึมลงทีละน้อย ๆ ทิ้งให้แห้ง แล้วจึงหยดซ้ำจนได้ปริมาตรที่ต้องการ ระวังอย่าให้แต่ละจุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางเกิน 5 มิลลิลิตร เมื่อจุดสารตัวอย่างแห้งหมดแล้ว จึงนำแผ่นแก้วมาวางในถังแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายผสม (ข้อ 3.8.1.2) ปิดฝาถัง ปล่อยให้ตัวทำละลายผสมซึมผ่านตามแผ่นขึ้นมา จนระดับตัวทำละลายห่างจากปลายบนประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร จึงหยุด โดยยกแผ่นกระจกออกจากถัง นำไปวางผึ่งให้แห้ง ทำการทดลองอย่างเดียวกัน 2 ครั้ง (แต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง) ทำเครื่องหมายแสดงระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ เมื่อแผ่นกระจกแห้งแล้ว ตรวจวัดผลด้วยการพ่นสารละลาย methanolic iodine 1 เปอร์เซนต์ จะได้แถบของ α-, β- และ γ- cyclodextrin ซึ่งจะให้แถบสีต่างกัน คือสีม่วง, สีเหลือง และสีน้ำตาล ตามลำดับ นำมาคำนวณหาค่า R_f เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานผสม α-, β- และ γ- cyclodextrin

กำหนดค่า $$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สีของสารตัวอย่างเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น (ซม.)}}$$

3.4.2 วิธี <u>High Performance Liquid Chromatography</u> (HPLC)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Pongsawasdi และ Yagisawa (1987)

นำสารละลายตัวอย่างไซโคลเดกซ์ทรินตามข้อ 3.5มากรองด้วยกระดาษกรอง millipore (0.45 μm) ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์แยกชนิดและหาปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานผสมของ α-, β- และ γ- cyclodextrin ความเข้มข้นชนิดละ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Supelco-NH_2 column ขนาด 4.6 mm ID. x 25 cm ใช้สารละลายผสม acetonitrile : water อัตราส่วน 67 : 33 (โดยปริมาตร) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ RI เป็น detector และฉีดสารตัวอย่างปริมาตรอย่างละ 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของไซโคลเดกซ์ทรินในสารละลายโดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) กับความสูงของพีค (peak hight) ของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α-, β- และ γ-มาตราฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)และฉีดเข้าเครื่องด้วยวิธีและสภาวะเดียวกัน

3.5 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำตามวิธีของ Bradford (1976)

3.5.1 Protein assay (Standard method)

ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 10 - 100 ไมโครกรัม

นำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโปรตีน (Protein Reagent) 5 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสีด้วยเครื่อง Spectronic 20 D ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 2 - 60 นาทีหลังจากเติมสารละลายโปรตีน อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin fraction V (ความเข้มข้น 0 - 100 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร)

3.5.2 Microprotein assay

ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 1 - 10 ไมโครกรัม

นำสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรผสมกบสารละลายโปรตน (Protein Reagent) 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 2000 ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน bovine serum albumin fraction V ความเข้มข้น 0 - 10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร

3.6 การทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์บางส่วน (Partial Purification)

ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ยกเว้นที่ระบุไว้

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายเอนไซม์ปริมาณมาก โดยการเลี้ยงเชื้อบาซิลลัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium I (ข้อ 3.1.1.1) แล้วทำการถ่ายเชื้อตั้งต้น 2 มิลลิลิตรใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ medium II (ข้อ 3.1.1.2) 200 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดทดลองขนาด 1,000 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 110-120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแยกเอนไซม์

โดยการปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่น Beckman J-21 c ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสคือสารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ดังแผนภาพที่ 1

สารละลายเอนไซม์ CGTase ไม่บริสุทธิ์ (crude enzyme)

↓ + แป้งข้าวโพด 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

↓ + แอมโมเนียมซัลเฟต 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ตกตะกอนโปรตีนในส่วนน้ำใสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ที่มีความเข้มข้นอิ่มตัว 40 - 80 %

↓

ผ่านคอลัมน์ DEAE – cellulose

ชะด้วยทริส – ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5

และ linear salt gradient ของโซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์

↓

ผ่านคอลัมน์ Sephadex G - 100

ชะด้วยทริส – ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5

ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 100 มิลลิโมลาร์

↓

เอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วน

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ CGTase จาก Bacillus A 11 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

i17390501

3.6.1 <u>การดูดซับโดยแป้ง</u> (Starch adsorption)

ดัดแปลงเล็กน้อย จากวิธีการของ Kato และ Horikoshi (1983)

อบแป้งข้าวโพด 60 กรัม ในตู้อบอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปใส่ในสารละลายเอนไซม์ (crude preparation) 1,200 มิลลิลิตร คนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดทีละนิดลงในสารละลายจนครบ 240 กรัม คนต่อไปอีกประมาณ 3 ชั่วโมง ก่อนนำไปปั่นแยกตะกอนแป้งด้วยเครื่องปั่น Beckman J21-C ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนแป้งด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ซึ่งมี 10 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต 20 เปอร์เซนต์ 500 มิลลิลิตร 2 ครั้ง หลังจากปั่นแยกตะกอนแป้งแล้ว ชะเอนไซม์ออกจากตะกอนแป้งด้วยการกวนในทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีมอลโตส 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร 1 ครั้ง และปริมาตร200 มิลลิลิตร 1 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นแยกตะกอนแป้งออก นำส่วนน้ำใสส่วนหนึ่งมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีน แล้วนำสารละลายส่วนที่เหลือไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตต่อไป

3.6.2 <u>การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u> (Ammonium sulfate precipitation)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Kato และ Korikoshi (1983)

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด ลงในสารในสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.7.1 อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก โดยค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละ 10 เปอร์เซนต์ จนสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 90 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นคนต่อไปอีก 15 นาที แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนและส่วนน้ำใสด้วยเครื่องปั่น Beckman J- 21C ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ในการทดลองนี้ จะเก็บตะกอนโปรตีนที่ความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่าง ๆ ไปละลายในทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ปริมาตรเล็กน้อย วัดปริมาตร หาปริมาณโปรตีน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ทั้งในส่วนตะกอนและส่วนน้ำใส เพื่อหาสภาวะการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้แอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) และผลผลิต (yield) ของเอนไซม์ CGTase สูงที่สุด

3.6.3 <u>การทำโครมาโตกราฟฟีแบบแลกไอออนด้วยดีอีเออี-เซลลูโลส</u> (DEAE - cellulose chromatoghaphy)

3.6.3.1 <u>การเตรียมคอลัมน์ดีอีเออี - เซลลูโลส</u>

แช่ดีอีเออี-เซลลูโลส 60 กรัมในกรดไฮโดรคลอริก 0.5โมลาร์ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเทเอาส่วนน้ำใสออก ล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง จนได้ pH ประมาณ 4.0 จึงนำไปแช่ในโซเดียมไฮดรอกไซม์ 0.5 โมลาร์ คนให้ทั่ว ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนได้ pH ประมาณ 8.0 ล้างด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 จนได้ pH และค่านำไฟฟ้าใกล้เคียงกับบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง หลังจากนั้นนำดีอีเออี - เซลลูโลสไปบรรจุในคอลัมน์แก้วขนาด 2.5 x 35 เซนติเมตร ให้ได้ความสูงเป็น 31 เซนติเมตร ผ่านทรีส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ลงในคอลัมน์ที่บรรจุดีอีเออี - เซลลูโลส ปริมาตร 3 - 4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์

3.6.3.2 <u>การใช้คอลัมน์ดีอีเออี - เซลลูโลส</u>

ทำตามวิธีของ Nomoto และคณะ (1986)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 3.7.2 ที่ผ่านการไดอะไลซ์ (dialyse) ในทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ปริมาตร 2 ลิตร 2 ครั้ง ครั้งละ 4 ชั่วโมง หลังจากเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกแล้ว นำไปเติมในคอลัมน์ดีอีเออี - เซลลูโลส ซึ่งเจลอยู่ในสภาพสมดุลย์แล้ว

(ขนาด 2.5 x 31 เซนติเมตร) ชะด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 (elution buffer) ด้วยอัตราไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีก (วัดค่า OD_{280} ได้เท่ากับ 0) จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient ที่เป็นส่วนผสมอัตราส่วน 1:1 ของ elution buffer 200 มิลลิลิตรกับ elution buffer ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ 200 มิลลิลิตร โดยคนด้วยเครื่อง magnetic stirrer เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) นำสารละลายทุกหลอดมาวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ หาปริมาณโปรตีน รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ โดยวัดปริมาณโซเดียมไอออน (Na^+) ด้วยเครื่อง Electrolyse Analyzer นำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase สูงมารวมกัน วัดปริมาตรรวม แอคติวิตีรวม และปริมาณโปรตีนรวมของเอนไซม์ เพื่อที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยการผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี - 100

3.6.4 <u>การทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยเซฟาเด็กซ์จี - 100</u> (Sephadex G - 100 chromatography)

3.6.4.1 <u>การเตรียมคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี - 100</u>

แช่เซฟาเด็กซ์จี - 100 12 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดอย่างน้อย 5 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ คนเบา ๆ ระหว่างที่ต้มเพื่อไล่ฟองอากาศ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง ล้างเจลด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 300 มิลลิลิตร แล้วนำเจลบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.8 x 72 เซนติเมตรให้ได้เจลสูงประมาณ 68 เซนติเมตร ผ่านทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเด็กซ์จี-100 ประมาณ 3-4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงเพื่อให้เม็ดเจลอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยการผ่านสารละลายบลูเดกซ์แทรน (Blue Dextran) เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และโปแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_4$) เข้มข้น

1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าคอลัมน์อยู่ในสภาพที่ใช้ได้ จะสังเกตุเห็นแถบ (band) ของบลูเดกซ์แทรนและโปแตสเซียมไดโครเมตแคบ และอยู่ในแนวระนาบ เคลื่อนที่ลงมาอย่างสม่ำเสมอตลอดคอลัมน์

3.6.4.2 <u>การแยกเอนไซม์ในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี - 100</u>

ทำตามวิธีของ Nomoto และคณะ (1986)

นำเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี - เซลลูโลส ในข้อ 3.7.3.2 45 มิลลิลิตรมาลดปริมาตรลงเหลือ 2 มิลลิลิตร โดยใช้ ultrafiltration membrane แบบ PM 10 เติมสารละลายเอนไซม์ที่ได้ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี - 100 (ปริมาตรสารละลายไม่เกิน 2 เปอร์เซนต์ของปริมาตรคอลัมน์) ชะด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์pH 8.5 ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ครั้งละ 2 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตรรวม และแอคติวิตีรวมของเอนไซม์พร้อมทั้งหาปริมาณโปรตีนรวม

3.6.5 <u>การทำดิสค์โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรฟอรีซีส</u> (Disc - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ทำตามวิธีของ Davis (1964)

3.6.5.1 <u>การเตรียมโพลีอะไครลาไมด์ เจล 7.5 เปอร์เซนต์</u>

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะไครลาไมด์ (ข้อ 3.2.5.4) 10 มิลลิลิตร ทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.9 (ข้อ 3.2.5.2) 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ (ข้อ 3.2.5.5) 300 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล (gel mould) ซึ่งเป็นแผ่นแก้วสี่เหลี่ยมขนาด 16 x 18 เซนติเมตรวางขนานห่างกัน 1.5 มิลลิเมตร จนกระทั่งสารละลายมีความสูงประมาณ 12 เซนติเมตร (ห่างจากขอบบน 4 เซนติเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่าง

รวดเร็วและเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน แสดงว่าเจลแข็งตัว จึงเทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล

เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายอะไครลาไมด์ 3.1 มิลลิลิตร ทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.7 (ข้อ 3.2.5.3) 2.5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 14.1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันก่อนเติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ 300 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ใส่หวี (comb) ลงในแบบเจลแล้วเท stacking gel อย่างรวดเร็ว ให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิเมตร ไล่ฟองอากาศออกค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนหลุมเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ให้เกิดโพลีเมอร์-ไรเซชันอย่างสมบูรณ์ ค่อย ๆ ดึง comb แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.6.5.2 <u>การเตรียมสารละลายโปรตีน</u>

นำสารละลายเอนไซม์จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ที่ต้องการวิเคราะห์ มาไดอะไลซ์ (dialyse) ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.7 ที่เจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง ครั้งละ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายโปรตีน 100 ไมโครลิตรมาเติมกลีเซอรอล (glycerol) 10 ไมโครลิตร และโบรโมฟีนอล บลู (bromophenol blue) 4 ไมโครลิตร แล้วหยอดส่วนผสมนี้ลงบนหลุมเจลที่เตรียมไว้ ให้มีปริมาณโปรตีน 50-100 ไมโครกรัม/หลุม

3.6.5.3 <u>การทำอิเลคโตรโฟรีซีส</u>

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3 ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นบนและชั้นล่างให้ท่วมปลายทั้ง 2 ข้างของแผ่นเจล หยอดสารละลายโปรตีน (ข้อ 3.7.5.2) ลงบนหลุมเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 30 มิลลิแอมแปร์ต่อแผ่นเจล ควบคุมกระแสไฟฟ้าให้คงที่ด้วย Constant power supply กำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน ทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนที่ไปอยู่ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดกระแสไฟฟ้า

3.6.5.4 การติดตามแถบโปรตีน

ถ่ายเจลจากข้อ 3.7.5.3 ออกจากแผ่นแก้ว แล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมโปรตีน (ข้อ 3.2.5.8) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (ข้อ 3.2.5.9) หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งก่อนใช้กระดาษแก้วใสหุ้มเจลไล่ฟองอากาศออก ทิ้งไว้ค้างคืนจนเจลแห้ง

3.6.5.5 การติดตามเอนไซม์แอคติวิตีในแผ่นโพลีอะไครลาไมด์ เจล

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Kobayashi และคณะ, 1978

ถ่ายเจลจากข้อ 3.7.5.3 ออกจากแผ่นแก้ว แล้วนำไปแช่ในสารละลายแป้ง 2 เปอร์เซนต์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างแป้งส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายไอโอดีน 0.2 เปอร์เซนต์ แถบโปรตีนที่มีเอนไซม์ CGTase จะปรากฏเป็นแถบใสในแผ่นเจล

3.7 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและจลนศาสตร์บางประการของเอนไซม์ CGTase

นำสารละลายเอนไซม์ CGTase จาก Bacillus A11 ทั้งชนิด crude และที่เตรียมให้บริสุทธิ์บางส่วน มาศึกษาสมบัติทางกายภาพและทางเคมีบางประการ ดังนี้

3.7.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยเซฟาเด็กซ์ จี - 100

หลังจากเตรียมคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี - 100 แล้ว ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ประกอบด้วย Acid Phosphatase, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A และ Cytochrome C ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 95,000 , 45,000 , 25,000 และ 12,400 ดาลตัน ตามลำดับ (ความเข้มข้นอย่างละ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ชะด้วยทริส - ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 15 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ครั้งละ 2 มิลลิลิตรด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และ 410 นาโนเมตร

สำหรับบลูเดกซ์แทรน และโปแตสเซียมไดโครเมตตามลำดับ นำไปคำนวณหาค่า K_{av}

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

เมื่อ V_e = elution volume เป็นปริมาตรที่โปรตีนหรือเอนไซม์ผ่านออกจากคอลัมน์

V_o = void volume ของคอลัมน์ วัดจากปริมาตรที่บลูเดกซ์แทรนผ่านออกจากคอลัมน์

V_t = total bed volume เป็นปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่ วัดจากปริมาตรที่สารละลายโปแตสเซียมไดโครเมตผ่านออกจากคอลัมน์

หลังจากนั้นเตรียมสารละลายเอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วนที่ต้องการทราบน้ำหนักเช่นเดียวกับข้อ 3.7.4.2 นำไปผ่านในคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-100 ชะด้วยบัฟเฟอร์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เหมือนสารละลายโปรตีนมาตรฐาน คำนวณค่า K_{av} แล้วหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนข้างต้น

3.7.2 <u>การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u>

3.7.2.1 <u>การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล 7.5 เปอร์เซนต์</u>

เตรียม separating gel โดยผสมสารละลายอะไครลาไมด์ (ข้อ 3.2.6.4) 7.5 มิลลิลิตร สารละลายทรีส - เอสดีเอส pH 8.8 (ข้อ 3.2.6.3) 15 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 7.5 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ดูดเอาฟองอากาศออก แล้วเติม TEMED 7.5 ไมโครลิตร และสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 3.2.6.5) ที่เตรียมใหม่ ๆ (ข้อ 3.2.6.5) 0.75 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแบบเจล (ความหนาประมาณ 1.5 มิลลิเมตร) จนกระทั่งสารละลายสูงประมาณ 12 เซนติเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็วและเบา ๆ

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล

เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายอะไครลาไมด์ 1 มิลลิลิตร ทริส - เอสดีเอส pH 6.8 (ข้อ 3.2.6.2) 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันก่อนแล้วเติม TEMED 5 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ ๆ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ใส่หวี (comb) ในแบบเจลแล้วเท stacking gel อย่างรวดเร็ว ให้ระดับสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนหลุมเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ให้เจลเกิดโพลีเมอร์ไรเซชั่นอย่างสมบูรณ์ ค่อย ๆ ดึง comb ออกแล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.7.2.2 <u>การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์</u>

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือสารละลายผสมของคาร์บอนิกแอนไฮเดรส (Carbonic anhydrase), โอวัลบูมิน (ovalbumin), อัลบูมิน (Albumin, bovine), ฟอสฟอริลเลส บี (Phosphorylase B), เบตา-กาแลคโตซิเดส (β - Galactosidase) และไมโอซิน (Myosin) น้ำหนักโมเลกุล 29,000 , 45,000 , 66,000 , 97,400 , 116,000 และ 205,000 ดาลตัน ตามลำดับ ละลายโปรตีนมาตรฐานในบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ข้อ 3.2.6.6) ให้มีความเข้มข้นรวม 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์โดยนำไปผสมกับบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (ข้อ 3.2.6.6) ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ถ้าสารละลายตัวอย่างมีค่าไอออนสูง ให้นำไปไดอะไลซ์ ในทริส - เอสดีเอส pH 6.8 ซึ่งเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 200 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ครั้งละ 4 ชั่วโมง ก่อนผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง

เมื่อเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างแล้ว ปิดฝาหลอดแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปหยอดลงบนหลุมเจลที่เตรียมไว้ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายตัวอย่างอยู่ในช่วง 20 - 50 ไมโครกรัมต่อหลุมเจล (ปริมาตร 50 - 100 ไมโครลิตร)

3.7.2.3 การทำอีเลคโตรโฟรีซิส

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง ในข้อ 3.8.2.2 มาทำอีเลคโตรโฟรีซีส โดยทำเช่นเดียวกับการทำอีเลคโตรโฟรีซิสในข้อ 3.7.5.3 แต่ใช้ทรีส - เอสดีเอสอีเลคโตรดบัฟเฟอร์ (ข้อ 3.2.6.1) แทนทรีส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ และใช้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสแทน 4 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

3.7.2.4 การติดตามแถบโปรตีน

ถ่ายเจลจากข้อ 3.7.2.3 ออกจากแผ่นแก้ว นำมาย้อมสีโปรตีนตามวิธีข้อ 3.7.5.4

3.7.2.5 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

วัดระยะทางเคลื่อนที่ของแถบสีน้ำเงินของโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล นำมาคำนวณหาอัตราการเคลื่อนที่ ดังนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

หาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบอัตราการเคลื่อนที่กับน้ำหนักโมเลกุลของสารจากกราฟมาตรฐาน

3.7.3 ศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีข้อ 3.3 แต่เปลี่ยนสภาวะการทดลอง จาก pH 6.0 เป็น pH 3.0-11.0 (ใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ในข้อ 3.2.1.1- 3.2.1.6) และเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 40 องศาเซลเซียสเป็น 20-80 องศาเซลเซียส

3.7.4 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ CGTase ที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ

นำสารละลายเอนไซม์ CGTase ทั้งก่อนทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme) และเอนไซม์ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วนมาบ่มที่ pH 3 - 11 (ใช้ระบบบัฟเฟอร์ในข้อ 3.2.1.1 - 3.2.1.6 ซึ่งเติมและไม่ได้เติม 10 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือบ่มที่อุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ที่เหลือ ตามวิธีข้อ 3.3 เปรียบเทียบกับแอคติวิตีตั้งต้นของเอนไซม์

3.7.5 ศึกษาผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อความเสถียรของเอนไซม์ CGTase

เก็บสารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ และที่ 4°ซ เป็นเวลาติดต่อกัน 40 สัปดาห์ นำมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ทุก ๆ 4 สัปดาห์ ด้วยวิธี Dextrinizing activity (ข้อ 3.3.1) และ CD-forming activity (ข้อ 3.3.2)

3.7.6 ศึกษาการใช้แป้งชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรตของ เอนไซม์ CGTase

ทดลองใช้แป้งชนิดต่าง ๆ คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง และแป้งสาลีเป็นสับสเตรตของเอนไซม์ CGTase แทน Soluble starch (potato)โดยวิธี Dextrinizing activity (ข้อ 3.3.1) และ CD-forming activity (ข้อ 3.3.2)