บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (2 มก./มล.)

ละลาย bovine serum albumin 200 มก. ในน้ำกลั่น 100 มล. เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ –20 °ซ

3.1.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์ เอทิลแอลกอฮอล์ 50 มล. เติม 85 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอสฟอริก 100 มล. เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.3 สารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมธิลอะมิโนมีเทน) 6.06 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย 0.1 โมลาร์ กรดไฮดรอคลอริก

3.1.4 สารละลายเคซีน 1.0 เปอร์เซ็นต์

ละลายเคซีน (casein hammarsten) 1.0 กรัม ใน บัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์. pH 7.5 เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.5 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (30 เปอร์เซ็นต์)

ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 300 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

3.1.6 สารละลายสำหรับพอลิอะคลิลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส

Solution A

สารละลายอะคลิลาไมด์ (30 เปอร์เซ็นต์อะคลิลาไมด์, 0.8 เปอร์เซ็นต์ บิส-อะคลิลาไมด์) นำอะคลิลาไมด์ 30 กรัม และ บิส-อะคลิลาไมด์ 0.8 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

Solution B

สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 8.8 ละลายทริส 18.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มล. เติม 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก ปรับ pH เป็น 8.8 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

Solution C

สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.50 โมลาร์ pH 6.8 (4x Stacking Buffer) ละลายทริส 6.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มล. เติม 1 โมลาร์ กรดไฮโดร-คลอริก ปรับ pH เป็น 6.8 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.1.7 สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต(10 เปอร์เซ็นต์)

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมทุกครั้งที่ใช้

3.1.8 สารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีน ความเข้มข้น 0.27 โมลาร์ pH 8.8

ละลายทริส 3.0 กรัม ไกลซีน 14.4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH สารละลายด้วย 2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เป็น 8.8

3.1.9 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (5 X sample buffer)

เติมกลีเซอรอล 5 มล. ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 1 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาตร 3.1 มล. และ เติม 1 เปอร์เซ็นต์ Bromophenol blue 0.5 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มล.

3.1.10 สารละลายสีตามรอย (tracking dye)

ละลาย bromophenol blue 0.1 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มล.

3.1.11 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (staining solution)

ผสม 0.25 เปอร์เซนต์ coomassie brilliiant blue R 250: เมทิลแอลกอฮอล:กรดอะซีติก ในอัตราส่วน 4:5:1 โดยปริมาตร

3.1.12 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (destaining solution)

ผสมกรดอะซิติก 75 มล. กับเมทิลแอลกอฮอล์ 50 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.13 สารละลายทริส-เอสดีเอสความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ pH 8.8

ชั่งทริส 11.82 กรัม SDS 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ปรับ pH ด้วย 2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ให้เป็น 8.8 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

3.1.14 สารละลายทริส- เอสดีเอส บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.33 โมลาร์ pH 6.8

ชั่งทริส 3.94 กรัม SDS 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ปรับ pH ให้เป็น 6.8 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

3.1.15 สารละลายทริส-ไกลซีนอีเลคโทรดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.03 โมลาร์ pH 8.3

ชั่งทริส 15.15 กรัม SDS 5 กรัม และไกลซีน 72 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 4.5 ลิตร ปรับ pH เป็น 8.3 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 5 ลิตร

3.1.16 สารละลายบัฟเฟอร์ – เอสดีเอส สำหรับสารตัวอย่าง

เติมกลีเซอรอล 5 มล. ลงในสารละลายทริส บัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาตร 0.6 มล. เติม 0.5 มล. 1 เปอร์เซ็นต์ bromophenol blue เติม 2 มล. เอสดีเอส 10 เปอร์เซ็นต์ เติม 2-mercaptoethanol 0.5 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มล.

3.1.17 สารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin reagent)

สารละลาย 1 : ละลายนินไฮดริน 0.1 กรัม ใน anhydrous ethanol 50 เติม glacial acetic acid 10 มล. และ 2,4,6-collidine 2 มล.

สารละลาย 2 : ละลาย $Cu(NO_3)_2 .3H_2O$ 0.5 กรัมใน anhydrous ethanol 50 มล.

ผสม 50 ส่วนของสารละลาย 1 กับ 3 ส่วนของสารละลาย 2 ก่อนนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

3.2.1 การแยกเอนไซม์จากใบป่านศรนารายณ์

นำใบป่านศรนารายณ์ มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปั่นให้ละเอียดด้วย blender โดยมี polyvinyl polypyrolidone (PVPP) ความเข้มข้น 2 % (w/w) แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนน้ำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนน้ำใส (สารละลายสกัด) นำไปวัดปริมาตร เพื่อนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.2.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate precipitation)

นำสารละลายสกัดมาปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย สารละลายทริส 2 โมลาร์ pH 11.0 แล้วค่อย ๆ เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารละลายสกัดอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนเบา ๆ จนสารละลายมีความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 25 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นคนต่อไปอีก 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนใสมาเติมผงเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอีกครั้งจนสารละลายมีความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นคนต่อไป 30 นาทีและตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ นำไปปั่นด้วยความเร็ว10,000 รอบต่อนาที ตะกอนโปรตีนที่แยกได้ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ใช้ปริมาตรให้น้อยพอที่ละลายตะกอนได้หมดแล้วนำไปไดอะไลซ์ (dialyzed) โดยนำสารละลายโปรตีนบรรจุลงในถุงไดอะไลซีสที่ผ่านการต้มมาเรียบร้อยแล้วไปไดอะไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำซ้ำแบบเดียวกันอีก 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นำส่วนที่เป็นสารละลายโปรตีนนี้มาวัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของโปรติเอส

การทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยวิธีไลโอฟิไลเซชัน (lyophilization)

นำสารละลายโปรตีนใส่ในหลอดทนความเย็น แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °ซ ข้ามคืน นำหลอดบรรจุสารละลายแช่แข็งนี้ไปใส่ขวด freeze-drying flask เพื่อนำไปต่อกับตัวเครื่อง freeze-dryer ซึ่งมีอุณหภูมิ -50 °ซ จนได้ของแข็งแห้งที่เป็นผง จากนั้นเปิดปั๊มดูดอากาศ จนอุณหภูมิภายนอกของ freeze-drying flask อุ่นขึ้นจนเท่า อุณหภูมิห้อง นำผงเอนไซม์ที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ เมื่อต้องการใช้นำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ให้มีความเข้มข้น 10 มก./มล.

3.2.3 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100

การเตรียมคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-100 ที่ใช้แยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 4,000 - 150,000 ดาลตัน ปริมาณ 20 กรัมในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 600 มล.

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. หรือนำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 3 ชม. เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.0 x 55 ซม. ให้ได้เจลสูง 50 ซม. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ด้วยปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 15 มล./ชม. เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ เติมสารละลายผสมระหว่างบลูเด็กซแทรน 4 มก./มล.และ โปแตสเซียมไดโครเมต 1 มก./มล. อย่างละ 1.0 มล. ลงในคอลัมน์เพื่อใช้หาปริมาตรที่สารละลายบลูเด็กซแทรนผ่านออกมา (void volume, Vo) และปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ (total bed volume, V_t) ที่สารละลายโปแตสเซียมไดโครเมตผ่านออกมาจากคอลัมน์

การแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ จี-100

เติมสารละลายจากข้อ 3.2.2 ความเข้มข้น 10 มก./มล. ปริมาตร 2 มล. ชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 เก็บสารละลายแยกส่วน (fraction) หลอดละ 5.0 มล. โดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายหลอดเว้นหลอดมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและวัดแอคติวิตีของโปรติเอส แล้วนำหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์มารวมกัน วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.2.4 <u>การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส</u>

<u>(DEAE- cellulose)</u>

การเตรียมคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส

นำ ดีอีเออี-เซลลูโลส เรซิน 15 กรัม แช่ในสารละลาย กรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 500 มล. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสพร้อมทั้งเรซินเล็ก ๆ ที่แขวนลอยอยู่ทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 500 มล. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ล้าง ด้วยน้ำกลั่นจนมี pH ประมาณ 7 แล้วนำมาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 1.7 x 30 ซม.ให้ได้เรซินสูง 25 ซม. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ลงในคอลัมน์จนเรซินอยู่ในสภาพสมดุลย์ วัด pH ของสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์จนกระทั่งได้ pH เป็น 7.5

การแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส

ใส่สารละลายเอนไซม์ จากข้อ 3.2.3 ปริมาตร 3 มล. ลงในคอลัมน์ ชะโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วยบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ หลอดละ 5 มล. ติดต่อกันจนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ เปลี่ยนเป็นชะโปรตีนที่เกาะอยู่กับคอลัมน์ด้วย linear salt gradient ความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0 – 1.0 โมลาร์เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5.0 มล.นำสารละลายหลอดเว้นหลอดมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของโปรติเอส แล้วนำหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์มารวมกัน วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ วัดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ไอออนในสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง Radiometer Copenhagen CDM 83 conductivity meter โดยสารตัวอย่างจะถูกดูดเข้าไปใน flow cell จะวัดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ไอออนเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 120 และ 180 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ

3.3 ตรวจสอบสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้ว

3.3.1 <u>การวัดแอคติวิตีของโปรติเอส (modified from Kunitz, 1947)</u>

ใช้ 1 % สารละลายเคซีน (casein hammarsten)ใน บัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 2.5 มล.เป็นสับสเตรทนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ลงไปปริมาตร 1 มล. เพื่อเริ่มปฏิกิริยาเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้โปรติเอสย่อยสลายเคซีน หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณเปปไทด์ หรือกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ด้วยเอนไซม์ ที่ 60 °ซ ในเวลา 1 นาที ในภาวะที่ทำการทดลอง โดยเปรียบเทียบเป็นไมโครโมลของไทโรซีน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 <u>การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด</u> (Bradford, 1976)

ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล. ผสมกับสารละลายในข้อ 3.1.2 จำนวน 1 มล. เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3.3.3 <u>การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์</u>

ใช้สารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.2.3 (10 มก./มล.) วัดแอคติวิตีของโปรติเอส ตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยนำสารละลายดังกล่าวไปบ่มกับสับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 5.0-7.0 (บัฟเฟอร์ซิเตรต 0.2โมลาร์), 7.0-9.0 (บัฟเฟอร์ทริส 0.2โมลาร์) และ 9.0 - 10.5 (บัฟเฟอร์คาร์บอเนต 0.2 โมลาร์)

3.3.4 <u>การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์</u> (pH stability)

ใช้สารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.2.3 (1.0 มก./มล.) วัดแอคติวิตีของโปรติเอสตามวิธีในข้อ 3.3.1 กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่าง ๆ คือ สารละลายบัฟเฟอร์ซิเตรต 0.2 โมลาร์ pH 4.7, สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ pH 6.5, และสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.2 โมลาร์ pH 8.3 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 15, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที นำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือ จากนั้นนำมาคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์(เปอร์เซ็นต์) เทียบกับ แอคติวิตีที่ให้ค่าแอคติวิตีสูงสุด

3.3.5 <u>การศึกษาอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์</u>

ใช้สารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.2.3 (10 มก./มล.) วัดแอคติวิตีของสารละลายโปรติเอสตามวิธีในข้อ 3.3.1 ที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ ตั้งแต่ 30 - 80 °ซ จากนั้นนำมาคำนวณค่าแอคติวิตี

3.3.6 <u>การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์</u> (thermal stability)

ใช้สารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.2.3 (10 มก./มล.) วัดแอคติวิตีของโปรติเอสตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วงระหว่าง 20-80 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือ จากนั้นนำมาคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์(เปอร์เซ็นต์) เทียบกับ

แอคติวิตีของอุณหภูมิที่ให้ค่าสูงสุด

3.3.7 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่แยกได้จากป่านศรนารายณ์

ใช้สารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.2.3 (10 มก./มล.) วัดแอคติวิตีของโปรติเอส ตามวิธีในข้อ 3.3.1 โดยศึกษาผลของการใช้โปรตีนสับสเตรทเคซีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และหาค่า *Km* และ *Vmax* ของสับสเตรท โดยการพลอตกราฟแบบ Lineweaver Burk

3.3.8 การศึกษาผลของอิออนของโลหะและตัวยับยั้งโปรติเอส

3.3.8.1 การศึกษาผลของอิออนของโลหะ

บ่มสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.2.3 (10 มก./มล.) ปริมาตร 0.1 มล. กับสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 0.9 มล. ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ของสารชนิดใดชนิดหนึ่ง ต่อไปนี้ $MgCl_2$ $6H_2O$, $CaCl_2$ $2H_2O$, $MnCl_2$ $4H_2O$, $ZnCl_2$, $HgCl_2$, $CdCl_2$, $CuCl_2$ หรือ $CoCl_2$ $6H_2O$ เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °ซ นำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อที่ 3.3.1. จากนั้นนำมาคำนวณค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์(เปอร์เซ็นต์) เทียบกับแอคติวิตีที่ภาวะที่ไม่ได้ใส่สารชนิดใด ๆ

3.3.8.2 การศึกษาผลของตัวยับยั้งโปรติเอส

บ่มสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.2.3 (10 มก./มล.) ปริมาตร 0.1 มล. กับสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 0.9 มล. ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ ของสารต่อไปนี้ PMSF, 1,10 phenanthroline, *p*-chloromercuribenzoic acid, EDTA, iodoacetamide และ 2- mercaptoethanol เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °ซ นำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อที่ 3.3.1.

3.3.9 วิธีแยกโปรตีนด้วยพอลิอะคลิลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟริซีสแบบไม่เสียสภาพ

(Non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)

ตามวิธีของ Davis, 1964

3.3.9.1 การเตรียมพอลิอะคลิลาไมด์เจลชนิดแผ่น 12.5 เปอร์เซ็นต์

เตรียม Resolving gel โดยผสมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 ปริมาตร 2.5 มล. สารละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ อะคลิลาไมด์ 4.0 มล. และน้ำกลั่น 3.4 มล. เขย่าสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 50 ไมโครลิตร พร้อมกับ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าคนเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำมาบรรจุในแผ่นแก้วคู่ขนานขนาด 1.50 มม. x 16 x 18 ซม.(ระหว่างแผ่นแก้วจะมี spacer ขั้นอยู่) จนสารละลายมีความสูง 12 ซม. ค่อย ๆ หยดน้ำกลั่นลงบนเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็นว่ารอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล เตรียม Stacking-gel (5 เปอร์เซ็นต์ gel) โดยเติม 0.67 มล. ของสารละลาย Solution A ลงใน Solution C 1.0 มล. แล้วเติมน้ำกลั่น 2.3 มล. เขย่าสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 30 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าคนเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเทลงหน้าเจลที่มี comb อยู่ เทสารละลายให้ถึงระดับที่ห่างจากขอบบนของแผ่นแก้วประมาณ 4 มม. ค่อย ๆ หยดน้ำด้วยน้ำลงบนผิวเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัว ค่อย ๆ ดึง comb ออก ล้างผิวเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เตรียมนำไปใช้งานต่อไป

3.3.9.2 การทำอีเลคโตรโฟริซีส

วางแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง เติมสารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.8 ลงในอ่างบัฟเฟอร์ทั้งบนและล่าง จนท่วมแผ่นเจลทั้งสองข้าง ปรับอุณหภูมิของอ่างบัฟเฟอร์ให้ได้ 4 °ซ นำสารละลายเอนไซม์ที่ผสมกับ Sample Buffer แล้วไปหยดลงบนหลุมเจล (wells) (ปริมาณโปรตีนต่อหลุมประมาณ 10-100 ไมโครกรัม และปริมาตรที่หยดประมาณ 10-100 ไมโครลิตร) แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 20 มิลลิแอมแปร์ต่อแผ่นเจลโดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนลงไปจนถึงระยะอีก 1 ซม. จากปลายล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.3.9.3 วิธีย้อมสีโปรตีนในแผ่นพอลิอะคลิลาไมด์เจล

แกะแผ่นเจลจากแผ่นกระจกแล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีนทิ้งค้างคืน จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีย้อมโปรตีนจนกระทั่งแผ่นเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนอยู่ชัดเจน เก็บแผ่นเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

3.3.9.4 การติดตามเอนไซม์แอคติวิตีด้วยการย่อยเคซีนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในแผ่นพอลิอะคลิลาไมด์เจล (Beynon, 1996)

ทำการทดลองตามวิธีการทดลองที่ 3.3.9.1 โดยใช้ resolving gel ที่มีเคซีนความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการทดลองตามการทดลองที่ 3.3.9.2 แล้วนำเจลที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำการย้อมสีโปรตีนตามวิธีการทดลองที่ 3.3.9.3 แล้วสังเกตลักษณะแถบใสที่เกิดขึ้น

3.3.10 การแยกหน่วยย่อยของโปรตีนโดยเอสดีเอส-พอลิอะคลิลาไมด์เจล อีเลคโตรโฟเรซีส (SDS-Polyacrylamide Gel Elctrophoresis)

3.3.10.1 การเตรียมเอสดีเอส-พอลิอะคลิลาไมด์ เจลชนิดแผ่น (12.5 เปอร์เซ็นต์)

เตรียมในทำนองเดียวกันกับการเตรียมพอลิอะคลิลาไมด์เจลชนิดแผ่น ข้างต้นแต่เปลี่ยนส่วนผสมของเนื้อเจลดังนี้ เตรียม resolving gel โดยผสมสารละลายทริส เอลดีเอส pH 8.8 ปริมาตร 4.05 มล.กับสารละลาย 30 เปอร์เซ็นต์อะคลิลาไมด์ 2.5 มล น้ำกลั่น 3.4 มล. 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 50 ไมโครลิตรและ TEMED 5 ไมโครลิตร และเตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายทริส-เอสดีเอส pH 6.8 ปริมาตร 1.0 มล.กับสารละลายอะคลิลาไมด์ 0.7 มล. น้ำกลั่น 2.3 มล. TEMED 5 มล. และ 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 30 ไมโครลิตร

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน ovabumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน chymotrypsinogen A น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน และ myoglobin น้ำหนักโมเลกุล 12,500 ดาลตัน เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ให้มีความเข้มข้นอย่างละ 1 มก.ต่อมล.

3.3.10.2 <u>เตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์</u>

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างกับสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:1 (ความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วง 0.5-1.0 มก.ต่อมล.) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.3.10.3 <u>การทำอีเลคโตรโฟริซีส</u>

ทำในทำนองเดียวกันกับพอลิอะคลิลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟริซีส แต่เปลี่ยนสารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3 เป็นสารละลายทริส-ไกลซีนเอสดีเอส อีเลคโทรดบัฟเฟอร์ pH 8.3 เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าที่ผ่านเจลเป็น 30 มิลลิแอมแปร์ต่อแผ่นเจล และปริมาณโปรตีนที่ใช้ 1-20 ไมโครกรัมต่อหลุม

3.3.10.4 <u>วิธีย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจล</u>

ทำการทดลองตามวิธีการทดลองที่ 3.3.9.3

3.3.11 <u>การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน</u>

แซ่เซฟาเด็กซ์ จี-100 ปริมาณ 25 กรัมใน บัฟเฟอร์ทริส 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม หรือนำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ ขนาด 1.7 x 90 ซม. ให้ได้เจลสูง 82 ซม. ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ทริส pH 7.5 ด้วยปริมาตร 3เท่าของคอลัมน์ด้วยอัตราไหล 20 มล.ต่อชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ทดลองประสิทธิ์ภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเด็กซ์แทรน 4 มก.ต่อมล. และโปแตสเซียมไดโครเมท 1 มก.ต่อ มล อย่างละ 1 มล. โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน ovabumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน chymotrypsinogen น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน และ Myoglobin น้ำหนักโมเลกุล 12,500 ดาลตัน เก็บสารละลายซึ่งแยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 1.5 มล. ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนผ่านออกมาจากคอลัมน์ นำไปคำนวณค่า K_{av} ดังนี้

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

V_e คือ elution volume ของโปรตีนที่ผ่านออกจากคอลัมน์

V_o คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเด็ซ์แทรนผ่านออกมา

V_t คือ Total bed volume ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่ วัดได้จาก ปริมาตรที่สารละลายโปแตสเซียมไดโครเมทผ่านออกจากคอลัมน์

ผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ แล้วหา elution volume ของเอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตี คำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น

3.3.12 <u>การหาความจำเพาะของโปรติเอสต่อเปปไทด์สังเคราะห์</u>

<u>การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อเปปไทด์สังเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)</u>

3.3.12.1 <u>เตรียมสารตัวอย่าง</u>

ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ที่เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ในบัฟเฟอร์ทริส 0.05 โมลาร์ pH 7.5 และเติม Dimethylsulfoxide ในเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีสีโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปอินคิวเบตที่ 37 °ซ นาน 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล. (ความเข้มข้น 10 มก./มล.) บ่มต่อที่ 60 °ซ นาน 20 นาที หยุดปฏิกริยาโดยนำไปแช่ในน้ำแข็ง แล้วนำไปเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ให้มีปริมาตรลดลง 5 เท่า จากนั้นใช้หลอดแก้วขนาดเล็ก(capillary tube) ดูดสารละลายที่เข้มข้นเพิ่มขึ้นนี้อย่างละ 20 ไมโครลิตร มาหยดบนแผ่น TLC Kiselgel 60 F_{254} 25 Folien 20 x 20 cm ปล่อยให้สารละลายซึมลงทีละน้อย ๆ ทิ้งให้แห้ง แล้วหยดซ้ำจนได้ปริมาตรที่ต้องการ ระวังอย่าให้แต่ละจุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางเกิน 5 มม. เมื่อจุดสารตัวอย่างแห้งหมดดีแล้ว จึงนำแผ่นแก้วมาวางในลงในแทงค์ที่อิ่มตัวด้วยไอสารละลายที่ใช้ชะแล้ว 2 ชม. โดยใช้อัตราส่วนของตัวทำละลาย n-butanol : acetic acid : น้ำ เป็น 4:1:1 เมื่อสังเกตว่าสารละลายซึมขึ้นไปจนห่างจากขอบบนของแผ่น ประมาณ 2 ซม. จึงนำแผ่น TLC ออกจากแทงค์

3.3.12.2 การตรวจวัดผลการการ ศึกษาเทคนิค TLC

การสเปรย์

นำแผ่น TLC ออกจากแทงค์ ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำมาอบที่ 110 °ซ เป็นเวลา 10 นาที นำไปสเปรย์ในตู้ควันด้วย ninhydrin reagent นำไปอบที่ 110 °ซ อีก 15 นาที วาดจุดที่เกิดขึ้น

การหาค่า R_f

นำแผ่น TLC ไปหาระยะทางที่กรดอะมิโน สารเปปไทด์หรือ solvent front เคลื่อนที่นำระยะทางที่ได้มาคำนวณหาค่า R_f โดยใช้สูตรดังนี้

R_f = ระยะทางที่กรดอะมิโนหรือสายเปปไทด์เคลื่อนที่/ระยะทางที่ solvent front เคลื่อนที่