หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. สารเคมี (Chemical)

1.1 Human holoceruloplasmin (C-4770) Sigma

1.2 Chromatography

Sephadex G-25	Pharmacia Fine Chemical
Blue dextran	Pharmacia Fine Chemical
Potassium dichromate	Analytical grade, Merck
Sodium acetate	Analytical grade, Merck
Lead acetate	Analytical grade, B.D.H
Copper acetate	Analytical grade, B.D.H

1.3 Graphite furnace atomic absoption

Standard lead	Atomic absorption grade, Normex Fartaria Carlo Erba
Standard copper	Atomic absorption grade, Normex Fartaria Carlo Erba

1.4 Ceruloplasmin determination

Glacial acetic acid	Analytical grade, Merck
Sodium acetate	Analytical grade, Merck
Sodium azide	Analytical grade, Merck
p-Phenylenediamine.2HCl	Sigma

1.5 Discontinuos Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Disc-PAGE) and Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis (IEF-PAGE)

Acrylamide	Analytical grade, Merck
N,N'-methylene-bis-acrylamide	Electrophoresis grade, Sigma
Ampholyte pH4-6	Phamacia Fine Chemical
Ammonium persulfate	Analytical grade, Merck
N,N,N′,N′-tetraethylmethylene	Electrophoresis grade, Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane	Analytical grade, Merck

Bromophenol blue B.D.H

Coomassie brilliant blue R-250 Sigma

Glacial acetic acid Analytical grade, Merck

Methanol Analytical grade, Merck

Glycerol Analytical grade, Merck

Copper sulfate Analytical grade, Reidel

Absolute ethanol Analytical grade, Merck

1.6 Protein determination

o-Phosphoric acid Analytical grade, Merck

Glacial acetic acid Analytical grade, Merck

Absolute ethanol Analytical grade, Merck

Coomassie brilliant blue G-250 Sigma

1.2 Metal chelators

2,3-Dimercapto-1-propanesulfonic acid Sigma

Ethylenediaminetetra acetic acid disodium salt Merck

Penicillamine (Cuprimine) Merck

Sodium diethyldithiocarbamate Merck

1.8 Other chemicals

Sodium hydroxide Analytical grade, Merck

Nitric acid Analytical grade, Merck

Hydrochloric acid Analytical grade, Merck

Urea Analytical grade, Merck

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 เครื่องมือ (Instruments)

Fraction Collector, model Frac-100, Pharmacia, Sweden.

Incubator, Heto Lab Equipment, Denmark.

Electrophoresis, model MiniProteinII, BioRad Laboratoies, USA.

Power Supply, Model Power Pac-3000, BioRad Laboratoies, USA.

Mini IEF Cell, model 111, BioRad Laboratoies, USA.

UV-Visible Spectrophotometer, model 7800, Jasco, Japan.

Hot Air Oven, Memmert, Denmark.

Imaging Densitometer, model GS-670, Biorad Laboratoies, USA.

Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophometer, model Solaar 989 QZ, Zeeman spectrometer, Furnace model GF 90 plus, Unicam, UK.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

1. **โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน** (gel filtratrion chromatography)

แช่ Sephadex G-25 ลงใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 ต้มนาน 30 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น pack ลงคอลัมน์ขนาด 1 x 20 ซม. ใช้สำหรับแยกโลหะอิสระ (free metal) จากเซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) equilibrate และชะคอลัมน์ด้วย 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 อัตราเร็วในการชะ 20 มล./ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 1 มล.

2. **การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์อะตอมมิกแอบซอบชัน** (atomic absorption spectrophotometer)

2.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายเซอรูโลพลาสมินที่ชะจาก Sephadex G-25 column 500 µl เติม 0.2 % HNO_3 5 µl ปริมาตร 5-10 เท่า บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง นำไปวัดปริมาณโลหะด้วยเครื่อง graphite furnace atomic absorption spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่น 283.3 nm สำหรับตะกั่ว และ 324.5 nm สำหรับทองแดง ขนาดตัวอย่างสำหรับฉีดครั้งละ 10 µl

2.2 การตั้ง spectrophotometer

นำสารละลายที่ย่อยแล้วไปวัดปริมาณโลหะด้วยเครื่อง graphite furnace atomic absorption แบบ Zeeman background correction ขนาดตัวอย่างสำหรับฉีดครั้งละ 10 µl โดยใช้ก๊าซอาร์กอนเป็นตัวพา (carrier gas)

2.2.1 ธาตุทองแดง (copper, Cu)

ความยาวคลื่นที่ใช้ 324.5 nm bandpass ที่ครึ่งหนึ่งความสูง 0.5 nm ไม่ใช้ matrix modification ขั้นตอนในการเผาและการเกิด atomization และปริมาณก๊าซที่ใช้ดังตาราง

ตารางที่ 3 ภาวะของการวัดปริมาณทองแดงของเครื่องอะตอมมิกแอบซอบชัน

ขั้นที่	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (วินาที)	อัตราการไหลของก๊าซ (ลิตร/นาที)
1	100	30.0	0.2
2	850	20.0	0.2
3	2100	3.0	-
4	2200	3.0	-

2.2.2 ธาตุตะกั่ว (lead, Pb)

ความยาวคลื่นที่ใช้ 283.3 nm bandpass ที่ความสูงทั้งหมด 0.5 nm ไม่ใช้ matrix modification ขั้นตอนในการเผาและการเกิด atomization และปริมาณก๊าซที่ใช้ดังตาราง

ตารางที่ 4 ภาวะของการวัดปริมาณตะกั่วของเครื่องอะตอมมิกแอบซอบชัน

ขั้นที่	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (วินาที)	อัตราการไหลของก๊าซ (ลิตร/นาที)
1	100	30.0	0.2
2	800	20.0	0.2
3	2100	3.0	-
4	2200	3.0	0.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การหาแอคติวิตีของเซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin's oxidase activity determination) **โดยดัดแปลงวิธีของ** Wolf **และ** Williams (Wolf and Williams, 1973)

แอคติวิตีของเซอรูโลพลาสมินติดตามจากอัตราการออกซิเดชันของสารพวก amine โดยใช้สารพาราฟีนิลีนไดเอมีน (p-phenylenediamine hydrochloride) ใน 0.1 M acetate buffer, pH 6.0 ที่ 37 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 30 นาที วัดการเกิดผลผลิตของการออกซิเดชันซึ่งมีสีม่วง (Wuerster's red) ที่ความยาวคลื่น 530 nm (A_{530}) โดยใช้วิธีสเปกโทรสโกปี (spectroscopic method)

3.1 สารเคมีสำหรับการวัดแอคติวิตี

3.1.1 0.1 M acetate buffer, pH 6.0

ละลาย sodium acetate 1.36 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. แล้วเติม 0.1 M acetic acid 10.0 มล. เพื่อปรับ pH เป็น 6.0 เติมน้ำกลั่นจนครบ 200 มล.

3.1.2 0.1% sodium azide

ละลาย sodium azide 0.1 กรัม ใน 0.1 M acetate buffer, pH 6.0

3.1.3 0.5% p-phenylenediamine.2 HCl (PPD)

ละลาย 50 มก. p-phenylenediamine.2HCl ใน 6.0 มล. ของ 0.1 M acetate buffer ปรับ pH 6.0 ด้วย 0.1 N sodium hydroxide ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10.0 มล. เก็บสารไว้ในที่มืดได้นาน 2 ชม.

3.2 วิธีการตรวจวัดแอคติวิตีและการคำนวณ

หลอด blank ประกอบด้วย 0.1% sodium azide , 0.1 M acetate buffer, pH 6.0 และ PPD อย่างละ 330 µl

หลอดตัวอย่างประกอบด้วย 0.1 M acetate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 660 µl และ PPD ปริมาตร 330 µl นำทุกหลอดมาบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 5 นาที เติมสารละลายเซอรูโลพลาสมินในทุกหลอดๆ ละ 33 µl บ่มต่อไปอีก 30 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm โดยใช้หลอด blank ตั้งค่าศูนย์

หน่วยของเซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin unit) = $A_{530} \times 1000$

4. เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis (Disc-PAGE))

4.1 การเตรียมสารละลาย

4.1.1 30% acrylamide และ 0.9% bis-acrylamide

ละลาย acrylamide 29.1 กรัม และ bis-acrylamide 0.9 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. กรอง และเก็บในขวดสีชาที่ 4°ซ

4.1.2 Electrode buffer, 0.05 M tris-glycine, pH 8.3

ละลาย tris(hydroxymethyl)-aminomethane 6 กรัม และ glycine 28.8 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วย 1 N HCl แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.1.3 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ละลาย tris(hydroxymethyl)-aminomethane 27.73 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 6 N HCl ปรับปริมาตรเป็น 150 มล.

4.1.4 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

ละลาย tris(hydroxymethyl)-aminomethane 6 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 1 N HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

4.1.5 10% ammonium persulfate

ละลาย ammonium persulfate 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มล. (เตรียมทันทีก่อนใช้)

4.1.6 Sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 0.5% bromophenol blue)

ละลาย bromophenol blue 0.04 กรัม ในน้ำกลั่น เติม 0.5 M tris-HCl, pH 6.8 จำนวน 1 มล. เติม glycerol 0.8 มล. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 8.0 มล.

4.1.7 สีย้อมโปรตีน (protein staining)

ละลาย coomassie blue R-250 0.5 กรัม ใน methanol 100 มล. คนประมาณ 1 ชม. แล้วกรอง เติม 20% acetic acid 100 มล.

4.1.8 สารละลายสำหรับขะสี (destaining solution)

ผสม acetic acid 70 มล.กับ methanol 100 มล. ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.1.9 0.5% p-phenylenediamine

ละลาย p-phenylenediamine 0.25 กรัม ใน 0.1 M acetate buffer ปรับ pH เป็น 5.7 ด้วย 2 M NaOH

4.2 การเตรียมเจล

Polymerize separating gel 8 x 5 x 0.075 ซม. ซึ่งประกอบด้วย 7% acrylamide และ stacking gel 8 x 2 x 0.075 ซม. ซึ่งประกอบด้วย 5% acrylamide ระหว่างกระจก 2 แผ่น (8 x 7 ซม.)

ตารางที่ 5 ส่วนผสมสารละลายในอิเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่เสียสภาพ

สารละลาย (Solution)	Separating gel (ml)	Stacking gel (ml)
30% acrylamide	2.33	0.83
1.5 M tris-HCl pH 8.8	2.50	-
0.5 M tris-HCl pH 6.8	-	1.25
น้ำกลั่น	5.15	2.90
10% ammonium persulfate (µl)	50.0	25.0
N,N,N',N'-Tetraethylmethylenediamine (TEMED) (µl)	10.0	10.0
ปริมาตรทั้งหมด (ml)	**10.0**	**5.00**

4.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

เติม sample buffer ในโปรตีนตัวอย่างด้วยอัตราส่วน sample buffer ต่อสารตัวอย่าง เป็น 1:5 ปริมาตร 10-20 µl ในช่องสำหรับใส่สารตัวอย่าง

4.4 การทำอิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoresis run)

วางอิเล็กโทรโฟริซิสในแนวตั้ง ทำที่อุณหภูมิ 4°ซ ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 40 mA รอจนแถบสีวิ่งลงจนตกแผ่นเจล ใช้เวลาประมาณ 45-50 นาที จึงปิดเครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) ตัดเจลออกเป็น 2 ส่วน แกะเจลออกจากกระจกและแช่ในสีย้อม ส่วนหนึ่งย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน อีกส่วนหนึ่งย้อมด้วยสับสเตรท (substrate)

4.5 การย้อมแอคติวิตี (activity staining) (Sato *et al*,1991)

0.5% p-phenylenediamine ใน 0.1 M acetate buffer, pH 5.7

ปริมาตร 50 มล. แช่เจลส่วนที่ย้อมแอคติวิตีลงในสารละลายบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 1-1.30 ชม. ตรงบริเวณที่มีออกซิเดส แอคติวิตีจะติดเป็นแถบสีม่วงแดง

4.6 การย้อมสีโปรตีน (protein staining)

แช่เจลส่วนที่ย้อมโปรตีนลงในสีย้อม coomassie brilliant blue นาน 20 นาที รินสีย้อมออก เติม destaining solution จนแผ่นเจลใส

5. ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelectricfocusing polyacrylamide gel electrophoresis (IEF-PAGE))

5.1 วิธีเตรียมสารละลาย

5.1.1 30%acrylamide

ละลาย acrylamide 6 กรัม ในน้ำกลั่น 20 มล.

5.1.2 1% N,N'-Methylene-bisacrylamide (bis)

ละลาย bis 0.1กรัม ในน้ำกลั่น 10 มล.

5.1.3 10% (w/v) ammonium persulfate

ละลาย ammonium persulfate 100 มก. ในน้ำกลั่น 1 มล. (เตรียมทันทีก่อนใช้)

5.1.4 50% sucrose

ละลาย sucrose 5 กรัม ในน้ำกลั่น 10.0 มล.

5.1.5 ampholyte pH 4-6

5.1.6 TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethylenediamine)

5.1.7 สีย้อมแอคติวิตี (activity staining)

ละลาย p-phenylenediamine 0.25 กรัม ใน 0.25 M acetate buffer 50 มล. ปรับ pH เป็น 5.7 ด้วย 2 M NaOH

5.1.8 สีย้อมโปรตีน (protein staining)

ละลาย 0.4 กรัม coomassie brilliant blue R-250 ใน ethanol 270 มล. น้ำกลั่น 500 มล. เติม acetic acid 100 มล. และเติม $CuSO_4$ 5.0 กรัมที่ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5.1.9 สารละลายสำหรับชะสี (destaining solution)

สารละลายสำหรับชะสีตัวแรก (first destaining solution)

ผสม ethanol 120 มล. กับ acetic acid 70 มล. ในน้ำกลั่น 500 มล.แล้วเติม $CuSO_4$ 5.0 กรัมที่ละลายในน้ำกลั่น 200 มล. แล้วจึงเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

สารละลายสำหรับชะสีตัวที่สอง (second destaining solution)

ผสม ethanol 250 มล. กับ acetic acid 70 มล. ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

5.2 การเตรียม IEF-PAGE

ฉีดน้ำกลั่นบน gel support film ด้านไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) นำมาติดกับกระจก โดยรีดฟองอากาศออกจนหมด นำแผ่นเจลและกระจกวางลงบนถาดเตรียมเจล (casting tray) โดยวางด้าน hydrophilic ติดกับ casting tray เทเจลระหว่าง gel support film กับ casting tray เจลจะพอลิเมอไรซ์ (polymerize) ภายใน 1.30 ชม. แกะเจลที่กับ gel support film และกระจกออกจาก casting tray วางกระดาษกรองขนาด (0.2-0.35) x 1 x 0.1 ชม. ที่มีตัวอย่าง 3-15 µl ลงบนเจล รอตัวอย่างติดกับเจล 5 นาที คว่ำวางเจลลงบนกราไฟต์ อิเล็กโทรด (graphite electrode)

5.3 การเตรียมเจล

ตารางที่ 6 ส่วนผสมสารละลายที่ใช้ในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

สารละลาย (solution)	ปริมาตร(ml)
Deionized water	1.39
30% acrylamide	0.90
1% bis-acrylamide	1.28
Ampholyte	0.25
50% sucrose	1.186
10%(W/V) ammonium persulfate (µl)	30
TEMED (µl)	1.5

5.4 การทำไอโซอิเล็กโทรโฟกัสซิง อิเล็กโทรโฟรีซิส (isoelectrofocusing electrophoresis)

วาง IEF-PAGE ลงบน graphite electrode ที่มีน้ำปราศจากอิออนเล็กน้อยตาม แนวนอนที่ 4°ซ ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ (constant voltage) 3 ช่วง ช่วงแรก 100 V นาน 15 นาที ช่วงที่สอง 200 V นาน 15 นาที ช่วงที่สาม 400 V นาน 1.20 ชม.

5.5 การย้อมและการชะสีออกเจล (staining and destaining)

หลังจากทำอิเล็กโทรโฟกัสซิง (electrofocusing) เจลที่ติดอยู่กับ gel support film แช่ลงในสีย้อม coomassie blue นาน 2 ชม. นำเจลไปแช่ใน first destaining solution นาน 1 ชม. และนำไปแช่ต่อใน second destaining solution นาน 15 นาที นำขึ้นผึ่งให้แห้ง

5.6 การย้อมแอคติวิตี (activity staining ดัดแปลงจากวิธี Sato *et al*, 1991)

ละลาย 0.5% p-phenylenediamine ใน 0.25 M acetate buffer, pH 5.7 ปริมาตร 50 มล. แช่เจลส่วนที่ย้อมแอคติวิตีลงในสารละลายบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 1-1.30 ชม. ตรงบริเวณที่มีออกซิเดส แอคติวิตีจะติดเป็นแถบสีม่วงแดง

6. การหาปริมาณโปรตีน (protein determination)

6.1 โดยวัดการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 nm (A_{280})

ค่า A_{280} ใช้ในการทำ protein elution profile หลังจากทำโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้ 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 เป็น blank

6.2 วิธี dye-binding (Bradford, 1976)

ใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ตั้งแต่ความเข้มข้น 20-100 µg โปรตีนปริมาตร 0.1 มล/ 1.0 มล. สารละลายสีเตรียมจาก coomassie blue G-250 100 มก. ละลายใน 95% ethanol 50 มล. และ 85% o-phosphoric acid 100 มล. เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595nm (A_{595}) อ่านค่าเทียบกับ blank ที่เตรียมจากน้ำกลั่น 0.1 มล.ในสารละลายสี 1.0มล.

7. เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบยูเรีย (urea polyacrylamide gel electrophoresis)

7.1 การเตรียมสารละลาย

7.1.1 28.5% acrylamide และ 0.15% bis-acrylamide

ละลาย acrylamide 28.5 กรัม และ bis-acrylamide 0.15 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

7.1.2 Tris/borate/EDTA, pH 8.4 (2 M tris, 0.2 M boric acid, 0.1 M EDTA)

ละลาย tris 121.14 กรัม, boric acid 6.18 กรัม และ EDTA 37.22 กรัม ในน้ำปราศจากอิออน 300 มล. นำไปปรับ pH เป็น 8.4 ด้วย 1 M NaOH แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากอิออนจนครบ 500 มล.

7.1.3 electrode buffer tris/borate/EDTA, pH 8.4 (0.1 M tris, 0.01 M boric acid, 0.05 M EDTA)

นำสารละลายข้อ 7.1.2 ไปเจือจาง 20 เท่า

7.1.4 8 M urea

ละลาย urea 7.21 กรัม ในน้ำปราศจากอิออน 15 มล. แล้วผ่านลง mixed-bed-ion-exchange resin (AG-501-X8, Biorad) คอลัมน์ขนาด 1 x 20 ซม. อัตราเร็วในการไหล 1 มล./นาที นำ 8 M urea ที่ผ่านคอลัมน์แล้ว 7.5 มล. เติมลงใน tris/borate/EDTA, pH 8.4 ปริมาตร 05 มล. (จากข้อ 7.1.2) ทันที

7.1.5 Sample buffer (0.25 M tris, 0.025 M boric acid, 0.0125 M EDTA, pH 6.8, 41% sucrose, 0.5% bromophenol blue)

ละลาย urea 0.5 กรัม และ sucrose 0.5 กรัม ในน้ำปราศจากอิออน 1.05 มล. ผสม 0.5% bromophenol blue ใน 0.25 M tris, 0.025 M boric acid, 0.0125 M EDTA, pH 6.8 ปริมาตร 0.15 มล.

7.1.6 10% (w/v) ammonium persulfate

ละลาย ammonium persulfate 100 มก. ในน้ำกลั่น 1 มล.

7.1.7 TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethylenediamine)

7.2 การเตรียมเจล

Polymerize separating gel 8 x 7 x 0.075 ซม. ซึ่งประกอบด้วย 7% acrylamide และ stacking gel 8 x 2 x 0.075 ซม. ซึ่งประกอบด้วย 5% acrylamide ระหว่างกระจก 2 แผ่น (10 x 10 ซม.)

ตารางที่ 7 ส่วนผสมของสารละลายเจลยูเรียพอลิอะคริลาไมด์

สารละลาย (Solution)	Separating gel (ml)	Stacking gel (ml)
30% acrylamide	2.0	0.4
6 M urea ใน tris/borate/EDTA pH 8.4	8.0	-
6 M urea ใน tris/borate/EDTA pH 6.8	-	3.45
10% ammonium persulfate (µl)	60.0	30.0
N,N,N',N'-Tetraethylmethylenediamine (TEMED) (µl)	6.0	6.0
ปริมาตรทั้งหมด (ml)	10.0	5.00

7.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

เติม sample buffer ในโปรตีนตัวอย่างอัตราส่วน 1:2 ปริมาตร 10-20 µl ในช่องสำหรับใส่สารตัวอย่าง

7.4 การทำอิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoresis run)

วางอิเล็กโทรโฟริซิสในแนวตั้ง ทำที่อุณหภูมิห้องภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 mA รอจนแถบสีวิ่งลงจนตกแผ่นเจล ใช้เวลาประมาณ 3.5 ชั่วโมง จึงปิดเครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) แกะเจลออกจากกระจกและแช่ในสีย้อม ย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน

8. การเตรียมอะโปเซอรูโลพลาสมิน (preparation of apoceruloplasmin) ดัดแปลงจากวิธีของ Morell และ Scheinberg (Morell and Scheinberg, 1958)

นำเซอรูโลพลาสมิน (0.90 มก./มล.) 20 มล. มา dialyse ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 ที่มี ascorbic acid 10 mM ปริมาตร 20 ลิตร ที่ 4°ซ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อรีดิวซ์ $Cu^{+2} \rightarrow Cu^{+1}$ หลังจากนั้นเติม sodium diethyldithiocarbamate (DTC) 5 มก./มล. ปริมาตร 5 มล. ลงในบัฟเฟอร์ด้านนอกถุง dialyse และ dialyse ต่อนาน 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็น 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 dialyse ต่อที่ 4°ซ ข้ามคืน (เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง) เพื่อแยก DTC และ ascorbic acid ออก แล้วนำมาปั่นแยกที่ 40,000 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง แยกส่วนน้ำใสซึ่งได้แก่อะโปเซอรูโลพลาสมินเก็บไว้ ทิ้งส่วนตะกอนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างทองแดงกับ DTC ออก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย