หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient broth (NB)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Nutrient broth	8	กรัม
NaCl	5	กรัม

ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.25 โมล/ลิตร ถ้าเป็นอาหารชนิดแข็ง เติม Bacto agar 15 กรัมต่อลิตร นำไป autoclave

อาหารสูตรปรับต่ำ (minimum salt medium)

สารละลาย A	KH_2PO_4	4.4	กรัม
	Na_2HPO_4	4.8	กรัม
	$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 6.0 เติมน้ำให้มีปริมาตรสุดท้าย 1 ลิตร นำไป autoclave

สารละลาย B	$CaCl_2.2H_2O$	0.05	กรัม
	$FeSO_4.7H_2O$	0.04	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.นำไป autoclave

สารละลาย C เตรียม 10 กรัมเปอร์เซนต์ของสารละลายต้นตอที่ต้องการศึกษา เช่น กรดกลูตามิค กลูโคส นำไป autoclave

ในการเตรียมอาหารสูตรปรับต่ำทำได้โดยผสม 100 มล.ของสารละลาย A 1.0 มล.ของสารละลาย B และ 1.0 มล.ของสารละลาย C

3.1.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry, 1951)

สารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์

เป็นส่วนผสมของ 2 เปอร์เซนต์โซเดียมคาร์บอเนตใน 0.1 โมล/ลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มล.กับ 1 เปอร์เซนต์คอปเปอร์ซัลเฟต 1 มล. และ 2 เปอร์เซนต์โซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรต 1 มล.

สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์

ผสมโซเดียมทังสเตต 150 กรัม โซเดียมโมลิบเดต 37.5 กรัม น้ำกลั่น 1050 มล. 85 เปอร์เซนต์กรดฟอสฟอริก 75 มล. และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 150 มล. รีฟลักซ์(reflux) ในขวดก้นกลมประมาณ 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเธียมซัลเฟต 255 กรัม น้ำกลั่น 75 มล. และน้ำโบรมีน 5-6 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรอง และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1500 มล. เก็บในขวดสีชาป้องกันแสงและนำไปเก็บในตู้เย็น ก่อนใช้เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน(2มก./มล.)

ละลาย Bovine serum albumin 200 มก.ในน้ำกลั่น 100 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

3.1.3 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 มก.ใน 95 เปอร์เซนต์เอทิลแอลกอฮอล์ 50 มล. เติม 85 เปอร์เซนต์กรดฟอสฟอริก 100 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.4 สารละลายสำหรับหาเอนไซม์แอคติวิตี

สารละลายทรีสบัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 7.6

ละลายทรีส(ไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน) 24.23 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.6 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก

สารละลาย 0.5 เปอร์เซนต์เคซีน

ละลายเคซีน (casein hammarsten) 0.5 กรัม ใน 0.2 โมล/ลิตร ทรีส

บัฟเฟอร์ pH 7.6

สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก(10 เปอร์เซนต์)

ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 100 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

3.1.5 สารละลายสำหรับโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส

สารละลายอะไครลาไมด์(28 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์, 0.74 เปอร์เซนต์ BIS)

นำอะไครลาไมด์ 28 กรัม และบิส-อะไครลาไมด์ 0.74 กรัม มาละลายน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์-TEMED บัฟเฟอร์ pH 8.9

ชั่งทริส 26.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. เติม 1 โมล/ลิตร กรดไฮโดรคลอริก 48 มล. และ 0.23 มล. TEMED ปรับ pH ให้เป็น 8.9 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์-TEMED บัฟเฟอร์ pH 6.7

ชั่งทริส 5.98 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. เติม 1 โมล/ลิตร กรดไฮโดรคลอริก 48 มล. และ 0.46 มล. TEMED ปรับ pH เป็น 6.7 ด้วย 1 โมล/ลิตร กรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3

ละลายทริส 0.6 กรัม และ ไกลซีน 2.88 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH เป็น 8.3 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต(10 เปอร์เซนต์)

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 มล. สารละลายนี้ต้องเตรียมทุกครั้งที่ใช้

สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง(sample buffer)

เติมกลีเซอรอล 10 มล. ลงในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์-TEMED บัฟเฟอร์ pH 6.7 ปริมาตร 25 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มล.

สารละลายสีตามรอย(tracking dye)

ชั่ง bromophenol blue 25 มก. ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มล.

น้ำยาย้อมสีโปรตีน(staining solution)

ผสม 0.25 เปอร์เซนต์ Coomassie brilliant blue R 250:เมทิลแอลกอฮอล์:กรดอะซีติก ในอัตราส่วน 4:5:1 โดยปริมาตร

น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน(destaining solution)

ผสมกรดอะซีติก 75 มล.กับเมทิลแอลกอฮอล์ 50 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.6 สารละลายสำหรับเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตโฟรีซีส

สารละลายอะไครลาไมด์(30 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์, 0.8 เปอร์เซนต์ BIS)

นำอะไครลาไมด์ 30 กรัมและBIS 0.8 กรัม มาละลายน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 8.8

ชั่งทริส 11.82 กรัม SDS 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ปรับ pH เป็น 8.8 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 6.8

ชั่งทริส 3.94 กรัม SDS 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. ปรับ pH เป็น 6.8 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มล.

สารละลายทริส-ไกลซีน อีเลคโทรดบัฟเฟอร์ 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

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม เติม 2-Mercaptoethanol 5 มล. และ 1 เปอร์เซนต์ Bromophenol blue 0.1 มล. เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มล.

3.1.7 สารละลายนินไฮดริน(ninhydrin reagent)

สารละลาย 1 ละลายนินไฮดริน 0.1 กรัม ใน anhydrous ethanol 50 มล. 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 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เก็บบน nutrient agar (NA) slant ปิดฝาเกลียวและปิดทับด้วยกระดาษกาว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำเชื้อมาเลี้ยงบน NA slant ใหม่ทุกๆ 15 วัน และเมื่อต้องการใช้เชื้อในการทดลองให้นำมาเลี้ยงบน NA slant ใหม่

3.3 การเลี้ยงเชื้อและการติดตามการเจริญของเชื้อ

3.3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น(Starter inoculum)

เขี่ยเชื้อในอาหารวุ้น (NA slant) 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 30 °ซ จากนั้นนำมาเขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ ใช้ความเร็วในการเขย่า 100 stroke จนวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.3 หน่วย

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.3.1 ปริมาณ 10 มล. ลงในขวดรูปกรวยที่มีอาหารสูตรปรับต่ำ ปริมาณ 100 มล.นำมาเขย่าต่อที่ 30 °ซ

3.3.3 การติดตามการเจริญของเชื้อ

เทน้ำเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.3.2 ประมาณ 5 มล. ที่เวลาต่างๆออกมาวัดการเจริญ (ความขุ่น)ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์(Spectronic 20D)

3.4 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส

3.4.1 โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรต (ดัดแปลงจากวิธีของ Richardson และ Te Whaiti, 1978)

อินคิวเบต 0.1 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับ 1.0 มล. ของ 0.5 เปอร์เซนต์ เคซีนใน 0.2 โมล/ลิตรทริสบัฟเฟอร์ pH 7.6 และ 0.9 มล. ของ 0.2 โมล/ลิตร ทรีสบัฟเฟอร์ pH 7.6(บัฟเฟอร์นี้ใช้ในช่วงวิธีทดลองข้อ 3.10 - 3.12) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 10 เปอร์เซนต์กรดไตรคลอโรอะซีติก 2 มล. นำไปปั่น 3500 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

บัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายเคซีนสับสเตรตและใช้ใน reaction mixture ในการทดลองช่วงต้นๆจนถึงวิธีทดลองข้อ 3.9 ใช้ 0.2 โมล/ลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.6 และเปลี่ยนไปใช้ 0.2 โมล/ลิตร ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.5 ในช่วงวิธีทดลองข้อ 3.13 เป็นต้นไป

1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณเพปไทด์หรือกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ 45 °ซ ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทำการทดลอง โดยเปรียบเทียบเป็นไมโครกรัมของไทโรซีน

3.4.2 <u>โดยใช้ N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester (BTEE) เป็นสับสเตรต</u>

อินคิวเบตสารละลาย BTEE 1.0 มล.(ความเข้มข้น 0.2-0.6 มิลลิโมล/ลิตร ใน 0.1 โมล/ลิตร ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.5, 10 เปอร์เซนต์เอทานอล) 5 นาที ที่ 45 °ซ ใน 10 มม. ควอทซ์คิวเวทในเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Shimadzu UV-Visible Spectrophotometer) ปรับเครื่องให้วัดการดูดกลืนแสงที่ 256 นาโนเมตร เป็นศูนย์ เติมสารละลายเอนไซม์ 0.05 มล. แล้วบันทึกการดูดกลืนแสงเป็นเวลา 5 นาที

1 หน่วยของเอนไซม์คือปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่า A_{256} เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.0 ในเวลา 1 นาที

3.5 <u>การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี</u>(Lowry, 1951)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล. ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ปริมาณ 3 มล. ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที เติมฟีนอลรีเอเจนต์ปริมาณ 0.3 มล. เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร

อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีน 0-100 ไมโครกรัม (ใช้วิธีนี้ในการทดลองช่วงต้นๆจนถึงวิธีทดลองข้อ 3.9)

3.6 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล. ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีน 0-40 ไมโครกรัม (ใช้วิธีนี้ในการทดลองข้อ 3.10 เป็นต้นไป)

3.7 การวัดปริมาณกลูโคส

นำสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Glucose oxidase reagent (ของบริษัท Baker Instruments Corporation, U.S.A.) ใน reaction cup ของเครื่อง Glucose Analyzer เป็นเวลา 15 วินาที อ่านผลจากเครื่องเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เข้มข้น 8.3 มิลลิโมล/ลิตร

3.8 การวัดปริมาณโซเดียมไอออน (Na^+)

วัดปริมาณโซเดียมไอออนในสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง BECKMAN System E4A™ Electrolyte Analyzer โดยสารละลายตัวอย่างจะถูกดูด (aspirate) ไปผสมกับรีเอเจนต์ใน Flow cell และ Sodium electrode ที่อยู่ใน Flow cell จะวัดปริมาณโซเดียมไอออนเปรียบเทียบกับโซเดียมไอออนมาตรฐานที่มีปริมาณโซเดียมไอออน 120 และ 180 มิลลิโมล/ลิตรตามลำดับ

3.9 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส

3.9.1 การศึกษาสารอาหารต้นตอที่เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

เลี้ยงเชื้อ Bacillus subtilis TISTR 25 และ B. licheniformis ATCC 21415 ตามข้อ 3.3 ที่มีสารอาหารต้นตอต่างชนิดได้แก่ กลูโคส กลูโคสกับกลูตาเมท

กลูตาเมท หรือกลูตาเมทกับแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารอาหารต้นตอแต่ละชนิด 0.1 เปอร์เซนต์ วัดการเจริญของเชื้อ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และวัดปริมาณโปรตีน ที่เวลาต่างๆ(กรณีศึกษาผลของกลูโคส วัดปริมาณกลูโคสด้วย Glucose analyzer)

3.9.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

เลี้ยงเชื้อ B. subtilis TISTR 25 และ B. licheniformis ATCC 21415 ในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.9.1 โดยเปรียบเทียบผลของการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส

3.10 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

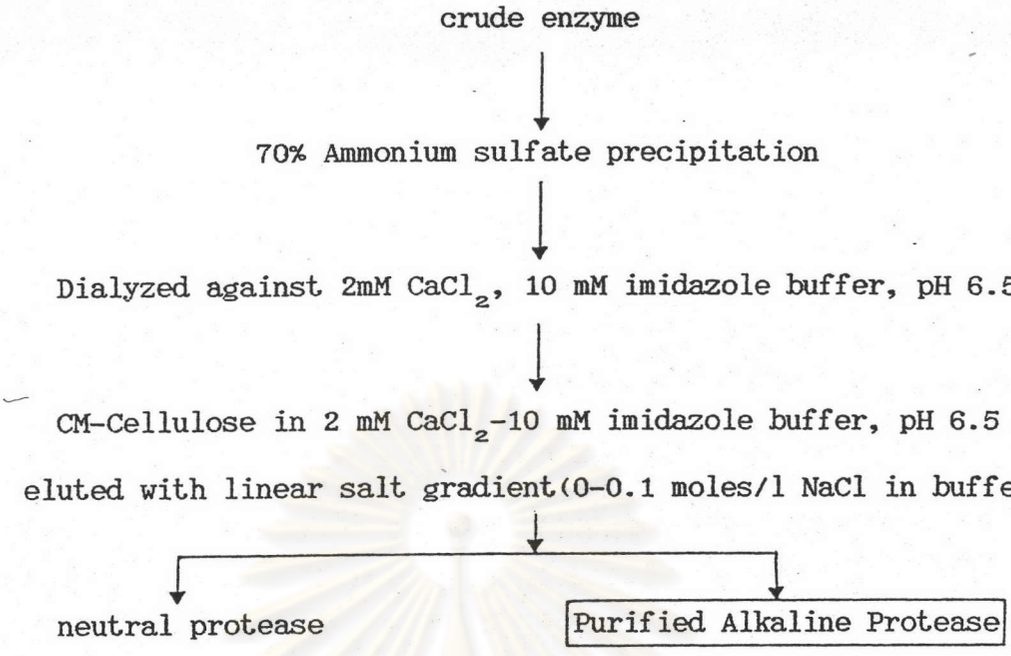
ในการเตรียมเอนไซม์ปริมาณมาก เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกันกับข้อ3.3 ในสภาวะที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.9 แต่เพิ่มขนาดขวดรูปชมพู่เป็น 1 ลิตรจำนวน 4 ขวด(ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อขวดละ 500 มล.) หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. นำไปปั่นที่ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที ที่ 4 °ซ นาน 30 นาที แยกเก็บส่วนน้ำใส นำมาเติมแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมล/ลิตร และปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย 2.5 โมล/ลิตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ เรียกสารละลายนี้ว่า crude enzyme นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7 ° ซ เพื่อจะนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เริ่มจาก crude enzyme สรุปแสดงไว้ในรูปที่ 1 (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 7 °ซ)

3.10.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งบดละเอียดลงใน crude enzyme อย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆจนสารละลายมีความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 0-70 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นคนต่อไปอีก 30 นาที นำไปปั่นเก็บตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยความเร็ว 7,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 45 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 วัดปริมาตรสารละลาย หาปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของโปรตีเอส

หมายเหตุ : สารละลายอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ที่ใช้ในทุกขั้นตอนในข้อ 3.10 คือ 10 มิลลิโมล/ลิตร pH 6.5 ที่มีสารช่วยให้เอนไซม์เสถียรคือ แคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมล/ลิตร ผสมอยู่



รูปที่ 1 ขั้นตอนการแยกเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 ให้บริสุทธิ์

3.10.2 การชจัดเกลือออกจาก crude enzyme โดยวิธีไดอะไลซีส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจากข้อ3.10.1 บรรจุลงในถุงไดอะไลซีส นำไปไดอะไลซ์ในอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ทำซ้ำแบบเดียวกันอีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายมาวัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของโปรตีเอส

3.10.3 การทำเอนไซม์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลส (CM-cellulose)

การเตรียมคอลัมน์

แช่ซีเอ็ม-เซลลูโลส เรซิน 15 กรัมในสารละลาย 0.2 โมล/ลิตรโซเดียม

ไฮดรอกไซด์ปริมาณ 500 มล. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสพร้อมทั้งเรซินเล็กๆที่แขวนลอยอยู่ทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย 0.2 โมล/ลิตรกรดไฮโดรคลอริกปริมาณ 500 มล. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นจนมี pH ประมาณ 7 แล้วนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.7 X 30 เซนติเมตรให้ได้เรซินสูง 25 เซนติเมตร ผ่านอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ลงในคอลัมน์จนเรซินอยู่ในสภาพสมดุลย์ วัด pH ของสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์จนกระทั่งได้ pH 6.5

การใช้คอลัมน์

ใส่สารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.10.2 ปริมาตรประมาณ 35 มล. ลงในคอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส ชะด้วยอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 5 มล.ติดต่อกันจนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์ เปลี่ยนเป็นชะด้วย linear salt gradient (250 มล.ของอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 และ 250 มล.ของอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 0.2 โมล/ลิตรโซเดียมคลอไรด์) เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5.0 มล. นำสารละลายหลอดเว้นหลอดมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของโปรตีเอส แล้วนำหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์มารวมกัน วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

3.11 วิธีแยกโปรตีนด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิสชนิดไม่ต่อเนื่อง (Disc Polyacrylamide Gel Electrophoresis)(ตามวิธีของ Davis, 1964)

3.11.1 การเตรียมโพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น

เตรียม resolving gel โดยผสมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์-TEMED บัฟเฟอร์ pH 8.9 ปริมาณ 5 มล. สารละลาย 28 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์ 10 มล. และน้ำกลั่น 25 มล. เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 10 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 300 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆแล้วนำมาบรรจุในแผ่นแก้วคู่ขนานขนาด 1.50 มม. X 16 X 18 ซม. (ระหว่างแผ่นแก้วจะมี spacer ขั้นอยู่) จนสารละลายมีความสูง 12 ซม. ค่อยๆ หยดน้ำกลั่นลงบนผิวเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล ล้างผิวหน้าเจลด้วย

สารผสม stacking gel เตรียม stacking-gel โดยผสมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์-TEMED บัฟเฟอร์ pH 6.7 ประมาณ 2.5 มล. สารละลาย 28 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์ 2 มล. และน้ำกลั่น 15.2 มล. เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 10 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 170 ไมโครลิตร แล้วเติมสารผสมนี้ลงในแผ่นแก้วคู่ชนานที่มี comb อยู่ โดยเทสารละลายให้ถึงระดับที่ห่างจากขอบบนของแผ่นแก้ว 4 มิลลิเมตร ค่อยๆ หยดน้ำกลั่นลงบนผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ค่อยๆดึง comb ออก ล้างผิวเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เตรียมนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.11.2 <u>การเตรียมสารละลายเอนไซม์</u>

ทำสารละลายเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นโดยกรองผ่าน Amicon YM-10 membrane ด้วยเครื่องอุลตร้าฟิลเตรชั่นภายใต้ความดันของก๊าซไนโตรเจน 2 ก.ก./ตารางนิ้ว ,บางกรณีต้องกรองผ่านหลอด YM-10 Micro Concentrator โดยการปั่นจนมีปริมาตรประมาณ 1.0 มล.อีกขั้นตอนหนึ่งเพื่อทำให้เอนไซม์เข้มข้นมากขึ้น

นำสารละลายเอนไซม์จากขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์(บางกรณีต้องทำให้เข้มข้นขึ้นดังกล่าว)มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมสารละลายนี้ 250 ไมโครลิตรกับสารละลายสีตามรอย 10 ไมโครลิตร

3.11.3 <u>การทำอีเลคโตรโฟริซีส</u>

ใส่แผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3 ลงในอ่างบัฟเฟอร์ทั้งบนและล่างจนท่วมแผ่นเจลทั้งสองข้าง ปรับอุณหภูมิของอ่างบัฟเฟอร์ให้ได้ 4 °ซ นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมในข้อ 3.11.2 ไปหยอดลงบนหลุมเจล (wells) (ปริมาณโปรตีนต่อหลุมประมาณ 10-100 ไมโครกรัม และปริมาตรที่หยอดประมาณ 10-100 ไมโครลิตร) แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 25 มิลลิแอมแปร์/แผ่นเจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนลงไปจนถึงระยะอีก 1 เซนติเมตรจากปลายล่างของแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.11.4 <u>วิธีย้อมสีโปรตีนในแผ่นโพลีอะไครลาไมด์เจล</u>

แกะแผ่นเจลจากแผ่นกระจกแล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีนทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีนจนกระทั่งแผ่นเจลใสและได้แถบสี

น้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน เก็บแผ่นเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

3.12 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส(crude enzyme)

ในการศึกษานี้ใช้ crude enzyme ที่ได้จากการเตรียมดังขั้นตอนในข้อ 3.9

3.12.1 การศึกษาชนิดของเอนไซม์โปรตีเอส

หาชนิดของโปรตีเอสที่แบคทีเรียผลิตเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่ประกอบด้วย 0.1 เปอร์เซนต์กลูตาเมท โดยเปรียบเทียบการผลิตของ B. subtilis TISTR 25 กับ B. licheniformis ATCC 21415 โดยการใช้สารยับยั้ง PMSF หรือ 1,10 Phenanthroline หรือ EDTA เติมลง assay mixture เพื่อช่วยในการจำแนกประเภทของเอนไซม์

3.12.2 การศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาและต่อความเสถียรของเอนไซม์

ศึกษาตามขั้นตอนเหมือนกรณีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว ดังรายละเอียดในข้อ 3.13.2 - 3.13.5

3.13 การศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

3.13.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลและการหาหน่วยย่อยของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชันและเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจลอีเลคโตรโฟรีซีส

เซฟาเดกซ์ จี-75 เจลฟิลเตรชันคอลัมน์

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-75 ปริมาณ 25 กรัมใน 10 มิลลิโมล/ลิตรอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ที่มี 2 มิลลิโมล/ลิตรแคลเซียมคลอไรด์ pH 6.5 ปริมาตร 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมงหรือนำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.7 X 90 เซ็นติเมตรให้ได้เจลสูง 82 เซ็นติเมตร ผ่านสารละลายอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 อีกประมาณ 15 ชั่วโมง ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเด็กซ์แทรน 4 มก./มล. และโปแตสเซียมไดโครเมท 1 มก./มล.

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ Bovine serum albumin (BSA) น้ำหนัก

โมเลกุล 66,000 ดาลตัน Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน โปรตีเอส (Subtilisin Carlsberg) น้ำหนักโมเลกุล 27,600 ดาลตัน และ Lysozyme น้ำหนักโมเลกุล 14,300 ดาลตัน ในปริมาณ 10 มก./มล. ยกเว้น Subtilisin ซึ่งใช้ 20 มก./มล.

เก็บสารละลายซึ่งแยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 1.4 มล. ติดต่อกันโดยใช้เครื่องเก็บแยกส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนผ่านออกมาจากคอลัมน์ นำไปคำนวนค่า K_{av} ดังนี้

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

V_e คือ elution volume ของโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์

V_o คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเด็กซ์แทรนผ่านออกมา

V_t คือปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่(total bed volume) วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโปแตสเซียมไดโครเมทผ่านออกจากคอลัมน์

ผ่านสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสลงในคอลัมน์ แล้วหา elution volume ของเอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตี คำนวนค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น

<u>เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจลอีเลคโตรโฟรีซีส(SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)</u> (ตามวิธีของ Laemmli, 1970)

<u>การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น</u>

เตรียมในทำนองเดียวกันกับการเตรียมโพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแผ่น ข้อ 3.11 แต่เปลี่ยนแปลงส่วนผสมของเนื้อเจลโดยใช้สารละลายที่เตรียม ในข้อ 3.1.6 เตรียม resolving gel โดยผสมสารละลาย ทริส-เอสดีเอส pH 8.8 ปริมาตร 15 มล. สารละลาย 30 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์ 9.9 มล. น้ำกลั่น 5.1 มล. TEMED 9 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.75 มล. และเตรียม stacking gel โดยผสมสารละลาย

ทริส-เอสดีเอส pH 6.8 5 มล. สารละลายอะไครลาไมด์ 1 มล. น้ำกลั่น 4 มล. TEMED 6 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.5 มล.

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ BSA น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน Subtilisin Carlsberg น้ำหนักโมเลกุล 27,600 ดาลตัน Chymotrypsinogen A น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน และ Cytochrome-C น้ำหนักโมเลกุล 12,270 ดาลตัน เตรียมโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ให้มีความเข้มข้นอย่างละ 1 มก./มล.

การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง ข้อ 3.2.5 กับสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:1 ในหลอดขนาดเล็ก(ความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วง 0.5-1.0 มก./มล.) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

การทำอีเลคโตรโฟรีซีส

ทำในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.11.3 แต่เปลี่ยนสารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ข้อ 3.1.5 เป็นสารละลายทริส-ไกลซีน อีเลคโทรด บัฟเฟอร์ ข้อ 3.1.6 เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าที่ผ่านเจลเป็น 30 มิลลิแอมแปร์/แผ่นเจล และปริมาณโปรตีนที่ใช้ 1-20 ไมโครกรัม/หลุม

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

ทำได้โดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วคำนวณหา mobility ดังนี้

Mobility = ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ / ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่

คำนวณค่า mobility ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสแล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน

3.13.2 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสตามวิธีในข้อ 3.4.1 โดยอินคิวเบตสารละลายเอนไซม์กับสับสเตรตในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 4.5-5.7 (0.2 โมล/ลิตรอะซีเตทบัฟเฟอร์), 5.7-8.2 (0.2 โมล/ลิตรอิมิดาโซลบัฟเฟอร์), 7.7-9.2(0.2 โมล/ลิตรทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) และ 9.2-11.3(0.2 โมล/ลิตรคาร์บอเนตบัฟเฟอร์)

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

นำเอนไซม์มาอินคิวเบตกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่างๆคือ 4.7, 6.5 และ 8.3 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวในข้อ 3.13.2 ที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 0, 15, 30, 55, 90 และ 130 นาที จากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีที่เหลือ

3.13.4 <u>การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์</u>

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.4.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20-75 องศาเซลเซียส

3.13.5 <u>การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์</u>(Thermal stability)

นำเอนไซม์มาอินคิวเบตที่อุณหภูมิต่างๆในช่วงระหว่าง 20-70 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือตามวิธีในข้อ 3.4.1

ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ในระยะยาวด้วย โดยการนำเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 ° ซ เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 5, 9, 16, 31 และ 68 วัน แล้วจึงนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ

3.13.6 <u>การศึกษาผลของสับสเตรตธรรมชาติต่อแอคติวิตีของเอนไซม์</u>

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามข้อ 3.4.1 โดยศึกษาผลของการใช้สับสเตรตชนิดอื่นเทียบกับเคซีน สับสเตรตแต่ละชนิดเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ และหาค่า K_m และ V_{max} ของสับสเตรตแต่ละชนิดโดยอาศัยการพลอตแบบ Lineweaver Burk plot

3.13.7 <u>การศึกษาผลของสับสเตรตเอสเทอร์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์</u>

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามข้อ 3.4.2 จากนั้นคำนวณค่า K_m และ V_{max} ในทำนองเดียวกันกับ ข้อ 3.13.6

3.13.8 <u>การศึกษาผลของไอออนของโลหะ และตัวยับยั้งโปรตีเอส</u>

การศึกษาผลของไอออนของโลหะ

อินคิวเบตสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล. กับ 0.2 โมล/ลิตรทริสบัฟเฟอร์ pH 8.5 ปริมาตร 0.9 มล. ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารชนิดหนึ่งชนิดใดต่อไปนี้ คือ $MgCl_2 .6H_2O$, $CaCl_2 .2H_2O$, $MnCl_2 .4H_2O$, $FeCl_3$, $FeSO_4$ หรือ $CoCl_2.6H_2O$ อย่างละ 1 มิลลิโมล/ลิตร เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 45 °ซ นำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.4.1

การศึกษาผลของตัวยับยั้งโปรตีเอส

อินคิวเบตสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล. กับ 0.2 โมล/ลิตรทริสบัฟเฟอร์ pH 8.5 ปริมาตร 0.9 มล. ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารต่อไปนี้อยู่ในระหว่าง 1-10 มิลลิโมล/ลิตร คือ PMSF, 1,10 Phenanthroline, DL-Dithiothreitol, Iodoacetamide, p-Chloromercuribenzoic acid, 2-Mercaptoethanol, L-Cysteine และ 0.1-1 มก./มล. ของ Soybean trypsin inhibitor เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 45 °ซ นำไปหาแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.4.1

3.13.9 การหาความจำเพาะของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสต่อเพปไทด์สังเคราะห์

การศึกษาผลของการไฮโดรไลส์เพปไทด์สังเคราะห์ที่มีสี (chromogenic peptide substrate) โดยวิธีไคเนติคส์

อินคิวเบตเพปไทด์สังเคราะห์ที่มีสีความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล/ลิตรใน 0.1 โมล/ลิตร ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.5 และ 10 เปอร์เซนต์ Dimethylsulfoxide ในคิวเวตของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ปรับอุณหภูมิได้ที่ 55 °ซ นาน 5 นาที เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายเอนไซม์ (ความเข้มข้น 0.003 - 15 ไมโครโมล/ลิตร) วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรเป็นเวลา 5 นาทีโดย recorder

การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อเพปไทด์สังเคราะห์โดยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

การเตรียม TLC plate

นำแผ่นกระจกขนาด 20 X 20 ซม. 5 แผ่นเรียงกันบนราง (aligning tray) ปิดหัวท้ายด้วยกระจกขนาด 5 X 20 ซม. ผสมซิลิกาเจล-จี 25 กรัม กับน้ำ 50 มล.

ในขวดรูปกรวย ปิดจุกและเขย่าแรงๆให้เข้ากันเป็นเวลา 30-45 วินาที แล้วเทใส่ใน Spreader ที่ตั้งความหนาของแผ่นเจลให้เท่ากับ 0.25 มม. ลาก Spreader ผ่านแผ่นกระจกที่วางไว้ ปล่อยซิลิกาเจล-จีแห้ง นำไปอบที่ 105 °ซ เป็นเวลา 30 นาที

การเตรียมสารตัวอย่าง

ละลายเพปไทด์สังเคราะห์ที่เข้มข้น 2 มิลลิโมล/ลิตรใน 0.05 โมล/ลิตร ทริสบัฟเฟอร์หรือ 0.1 โมล/ลิตรคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 8.5 เติม Dimethyl formamide ในเพปไทด์สังเคราะห์ที่ไม่มีสี Dimethylsulfoxide ในเพปไทด์สังเคราะห์ที่มีสี โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 เปอร์เซนต์ นำไปอินคิวเบตที่ 37 °ซ นาน 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล.(ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.015 - 30 ไมโครโมล/ลิตร) อินคิวเบตอีก 9 ชม. ที่ 37 ° ซ หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วนำไปเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 5 เท่า จากนั้นนำไปจุด(spot)ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้

การ run TLC

นำแผ่น TLC ที่จุดสารตัวอย่างแล้วใส่ลงในแทงค์ที่ equilibrate แล้ว 2 ชม. โดยใช้อัตราส่วนของ solvent คือ n-butanol : acetic : น้ำ = 4:1:1 เมื่อสังเกตว่าสารละลายซึมขึ้นไปจนห่างจากขอบบนของแผ่นประมาณ 2 ชม. จึงนำแผ่น TLC ออกจากแทงค์

การตรวจวัดผลการ run TLC

การ spray

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

การหาค่า R_f

นำแผ่น TLC ไปหาระยะทางระหว่างกรดอะมิโน สารเพปไทด์ หรือ solvent front กับจุด spot เริ่มต้นของสารตัวอย่าง ด้วยเครื่อง High Speed TLC Scanner นำระยะทางที่ได้มาคำนวณหาค่า R_f โดยใช้สูตรดังนี้

R_f = ระยะทางที่กรดอะมิโนหรือสายเพปไทด์เคลื่อนที่ / ระยะทางที่ solvent front เคลื่อนที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย