หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ B. fuscum

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	7	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.05	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl)	4	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	3	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	7	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 1 โมลาร์โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ ถ้าเป็นอาหารชนิดแข็งเติม bacto agar 15 กรัมต่อลิตร

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ, 1951)

3.2.1.1 สารละลายโซเดียมดีออกซีโคเลท (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลายโซเดียมดีออกซีโคเลท (sodium deoxycholate) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2.1.2 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (24 เปอร์เซนต์)

ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid, TCA) 24 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.2.1.3 สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์

ผสมโซเดียมทังสเตต 50 กรัม, โซเดียมโมลิบเดต 12.5 กรัม น้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร, 85 เปอร์เซ็นต์กรดฟอสฟอริก 25 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น

50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ (reflux) ด้วยความร้อนต่ำ ๆ นาน 10 ชั่วโมง แล้วเติมลิเธียมซัลเฟต 75 กรัม, น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2-3 หยด ต้มไล่โบรมีนที่มากเกินพอประมาณ 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาป้องกันแสง และนำไปเก็บในตู้เย็น เมื่อจะใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร

3.2.1.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.8 โมลาร์)

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง

3.2.1.5 สารละลาย A

ละลายไดโซเดียมตาเตรต 0.2 กรัม และโซเดียมคาร์บอเนต 10 กรัมใน 0.8 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ 69 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.2.1.6 สารละลาย B

ละลายไดโซเดียมตาเตรต 2 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัม ใน 0.8 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ 12.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 7 °ซ

สารละลายเพื่อหาปริมาณโปรตีน เตรียมโดยผสม 0.8 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตร, สารละลาย A 7.2 มิลลิลิตร และสารละลาย B 0.8 มิลลิลิตร ผสมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2.2 สารละลายสำหรับใช้ทำโพลีอะไครลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิสชนิดแท่ง (Disc-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (ดัดแปลงจาก Davis, 1964)

3.2.2.1 สารละลาย A

ละลาย TRIS (Tris-hydroxymethylaminomethane) 36.6 กรัม ใน 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก 50 มิลลิลิตร. เติม TEMED 0.23 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ 8.9 ด้วย 1 นอร์มอลกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา หรือขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 °ซ

3.2.2.2 สารละลาย B

ชั่งอะไครลาไมด์ 28.0 กรัม และ BIS 0.735 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.2.2.3 สารละลาย C

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.14 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2.2.4 สารละลาย D

ชั่งอะไครลาไมด์ 10 กรัม และ BIS 2.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.2.2.5 สารละลาย E

ชั่งไรโบฟลาวิน 4 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.2.2.6 สารละลาย F

ละลายซูโครส 40 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.2.2.7 สารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ (พีเอช 8.3)

ชั่ง TRIS 6 กรัม และไกลซีน 28.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เมื่อจะใช้นำมาเจือจาง 1:10 โดยปริมาตร

3.2.2.8 สารละลาย 80 เปอร์เซนต์ซูโครส

ละลายซูโครส 80 กรัม ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.2.2.9 สารละลายสีตามรอย (tracking dye)

ชั่งโบรโมฟีนอล บลู (bromophenol blue) 5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2.10 น้ำยาย้อมสีโปรตีน

ผสมเมทานอล 454 มิลลิลิตร, กรดอะซิติก 46 มิลลิลิตร และคูแมสซิบริลเลียนท์ บลู (coomassie brilliant blue) 1.25 กรัม คนให้ละลายแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2.11 น้ำยาย้อมสีแอคติวิตี

ผสมไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (0.255 โมลาร์, พีเอช 9.5) 10 มิลลิลิตร, 3 มิลลิโมลาร์ กรดน้ำดี (สับสเตรต) 0.2 มิลลิลิตร, 6 มิลลิโมลาร์ NAD 0.2 มิลลิลิตร, 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรฟีนาซีน เมโทซัลเฟต (phenazine methosulfate) 1 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรไนโตรบลู เตตราโซเลียม (nitroblue tetrazolium) 0.6 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วยาวขนาด 15 มิลลิลิตร (ส่วนผสมนี้ใช้สำหรับย้อมสี 1 แท่งเจล) เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน เตรียมทันที่เมื่อใช้

3.2.2.12 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

ผสมกรดอะซิติก 75 มิลลิลิตร และ เมทานอล 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2.3 สารละลายสำหรับใช้ทำเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Weber, Pringle และ Osborn, 1972)

3.2.3.1 สารละลายอะไครลาไมด์

ชั่งอะไครลาไมด์ 22.2 กรัม และ BIS 0.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.2.3.2 เจล บัฟเฟอร์ (0.2 โมลาร์ พีเอช 7.2)

ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.H_2O$) 7.8 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.7H_2O$) 38.6 กรัม และ SDS 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2.3.3 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/

014418

มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น สารละลายนี้ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.2.3.4 อีเลคโตรด บัฟเฟอร์

เตรียมโดยผสม เจล บัฟเฟอร์ 1 ส่วน และน้ำกลั่น 1 ส่วน โดยปริมาตร

3.2.3.5 บัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer)

ได้แก่สารละลาย 0.01 โมลาร์โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่ผสม 1 เปอร์เซนต์ SDS และ 1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

3.2.3.6 สารละลายสีตามรอย (tracking dye)

ได้แก่สารละลาย 0.05 เปอร์เซนต์ โบรโมฟีนอล บลู ใน 0.01 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1.1 การเก็บรักษาเชื้อระยะสั้น

เชื้อ B. fuscum ที่ใช้ในการทดลองจะถูกเก็บรักษาไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (agar plate, 3.1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ ได้นานประมาณ 1 เดือน เมื่อต้องการใช้ในการทดลองจะนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวต่อไป

3.3.1.2 การเก็บรักษาเชื้อระยะยาว

ผสมเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวกับกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นเป็น 50 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล ในขวดจุกเกลียว เก็บที่อุณหภูมิ -70 °ซ วิธีนี้สามารถเก็บเชื้อจุลินทรีย์ได้นานประมาณ 1 ปี

3.3.2 การเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

3.3.2.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 ลูป (loop) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ นานประมาณ 24 ชั่วโมง

3.3.2.2 การเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลอง

เริ่มจากเชื้อตั้งต้น 5 เปอร์เซนต์ ดูดใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร (อัตราส่วนปริมาตรอาหารต่อปริมาตรขวดเป็น 1 ต่อ 5) เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °ซ อัตราเร็วของการเขย่า 110-120 รอบต่อนาที

3.4 การติดตามการเจริญของเชื้อ

ใช้วิธีวัดความขุ่น โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic 20)

3.5 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

3.5.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ปริมาณน้อย

เตรียมโดยการเก็บเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวตามเวลาที่ต้องการ นำมาปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่น Beckman J-21C ด้วยความเร็ว 7800xg ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 นาที ล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) แล้วกระจายเซลล์ในบัฟเฟอร์เดียวกันนี้ที่เติมสารช่วยให้เอนไซม์เสถียรคือ 20 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล และ 0.1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องความถี่สูง (sonicator) ที่ตั้งรอบของการทำงานไว้ที่ 50 KCS เป็นเวลา 2 นาทีต่อครั้ง จำนวน 2 ครั้ง นำไปปั่นแยกเศษเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่น Beckman J-21C ด้วยความเร็ว 7800xg ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 นาที เก็บส่วนน้ำใสคือ สารละลายเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.5.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ปริมาณมาก

กระจายเซลล์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เสริมด้วยสารช่วยให้เอนไซม์เสถียร หลังจากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องใช้แรงกดดันสูงแบบเฟรนช์ (French press) ที่ความดัน 1100 psi ปั่นแยกเศษเซลล์ด้วยเครื่องปั่น Beckman J21-C ความเร็ว 17,000xg ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 20 นาที เก็บสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.6 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

ใช้วิธีทางสเปคโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) โดยดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Macdonald และคณะ (1973)

3.6.1 ปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน

สับสเตรตที่ใช้จะได้แก่กรดน้ำดี (bile acid) ที่มีหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิล (α-Hydroxyl) ที่ตำแหน่ง 3 (สำหรับเอนไซม์ 3α-HSDH), ตำแหน่ง 7 (สำหรับเอนไซม์ 7α-HSDH) และตำแหน่ง 12 (สำหรับเอนไซม์ 12α-HSDH) กรดน้ำดีเหล่านี้ได้แก่

ชนิดของกรดน้ำดี	ตำแหน่ง α-hydroxyl group
กรดลิโทโคลิก (Lithocholic acid)	3
กรดดีโนดีออกซีโคลิก (Chenodeoxycholic acid)	3 และ 7
กรดดีออกซีโคลิก (Deoxycholic acid)	3 และ 12
กรดโคลิก (Cholic acid)	3,7 และ 12

เอนไซม์ α-HSDH เหล่านี้จะเร่งปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชันที่จำเพาะต่อตำแหน่งของหมู่แอลฟา-ไฮดรอกซิลที่มีอยู่ในกรดน้ำดีข้างต้น ในสภาวะที่สารละลายปฏิกิริยา (reaction mixture) ประกอบด้วยสารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ พีเอช 9.5 เข้มข้น 0.17 โมลาร์, กรดน้ำดีเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์,และ NAD^+ เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายเท่ากับ 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30°ซ NAD^+ จะถูกเปลี่ยนไปเป็น NADH ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ซึ่งวัดได้โดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

กำหนดหน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นต่อนาที ณ สภาวะที่กำหนด

3.6.2 ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน

สับสเตรตที่ใช้ในกรณีนี้ได้แก่ กรดดีไฮโดรโคลิก (dehydrocholic acid) ซึ่งเป็นกรดน้ำดีที่มีหมู่คีโต (Keto group) ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3, 7 และ 12 สารละลายปฏิกิริยาจะประกอบด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์, พีเอช 5 เข้มข้น 0.17 โมลาร์, กรดดีไฮโดรโคลิกเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ NADH เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายปฏิกิริยา 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30°ซ NADH จะถูกเปลี่ยนไปเป็น NAD^+ ทำให้เกิดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ซึ่งวัดได้โดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

กำหนดหน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณไมโครโมลของ NADH ที่ลดลงต่อนาที ณ สภาวะที่กำหนด

3.7 การวัดปริมาณโปรตีน

ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5 ซึ่งอยู่ในสารละลายโปแตสเซียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) ที่ผสม 20 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล และ 0.1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล มาเจือจางด้วยสารละลายเดียวกัน เพื่อให้มีโปรตีนอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม จากนั้นดูดมา 0.6 มิลลิลิตร เติม 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารละลายโซเดียม-ดีออกซีโคเลท (ข้อ 3.2.1.1) 0.01 มิลลิลิตร บ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วเติม 24 เปอร์เซนต์ TCA (ข้อ 3.2.1.2) 0.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแบบตั้งโต๊ะ (Microcentrifuge, Sigma 2 MK) ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 °ซ นาน 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งล้างตะกอนโปรตีนด้วย 24 เปอร์เซนต์ TCA โดยการปั่นแล้วเทส่วนน้ำใสทิ้งอีก 2 ครั้ง นำตะกอนที่ได้มาเติมสารละลายเพื่อหาปริมาณโปรตีน (ข้อ 3.2.1.7) 0.45 มิลลิลิตร เขย่า (vortex) ให้ตะกอนละลาย แล้วเติมสารละลายฟีนอล-รีเอเจนต์ (ข้อ 3.2.1.3) อีก 0.6 มิลลิลิตร เขย่า (vortex) ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดการดูดแสงของสารละลายสีที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากอัลบูมินของซีรัมวัว (bovine serum albumin)

3.8 การศึกษาธรรมชาติของการผลิตเอนไซม์ α-HSDH ในเชื้อ B. fuscum โดยการเหนี่ยวนำด้วยกรดโคลิก และกรดดีไฮโดรโคลิก

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 แบบ คือ

3.8.1 การเหนี่ยวนำตั้งแต่เริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ B. fuscum ตามวิธีในข้อ 3.3.2.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และอาหารชนิดเดียวกันที่เสริมด้วยสารเหนี่ยวนำเอนไซม์ (inducer) คือ กรดดีไฮโดรโคลิก หรือ กรดโคลิก (0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200มิลลิลิตร) ติดตามการเจริญทุกช่วงเวลาโดยวิธีวัดค่าความขุ่น (ข้อ 3.4) และดูดเซลล์ที่ช่วงเวลานั้น ๆ ครั้งละ 20 มิลลิลิตร

นำมาเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.5 วัดปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิด ตามวิธีในข้อ 3.7 และ 3.6.1

3.8.2 การเหนี่ยวนำเฉพาะที่

เพาะเลี้ยง B. fuscum ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจนเชื้อเจริญถึงระยะที่จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH สูงที่สุด (ผลจากข้อ 3.8.1) แล้วจึงค่อยเสริมกรดดีไฮโดรโคลิก หรือกรดโคลิก (0.1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มิลลิลิตร) ลงไปในเชื้อที่กำลังเจริญนั้น ติดตามการเจริญและเก็บเซลล์ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ หลังจากที่เสริมสารเหนี่ยวนำเอนไซม์ นำมาเตรียมสารละลายเอนไซม์ วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์ เหมือนข้อ 3.8.1

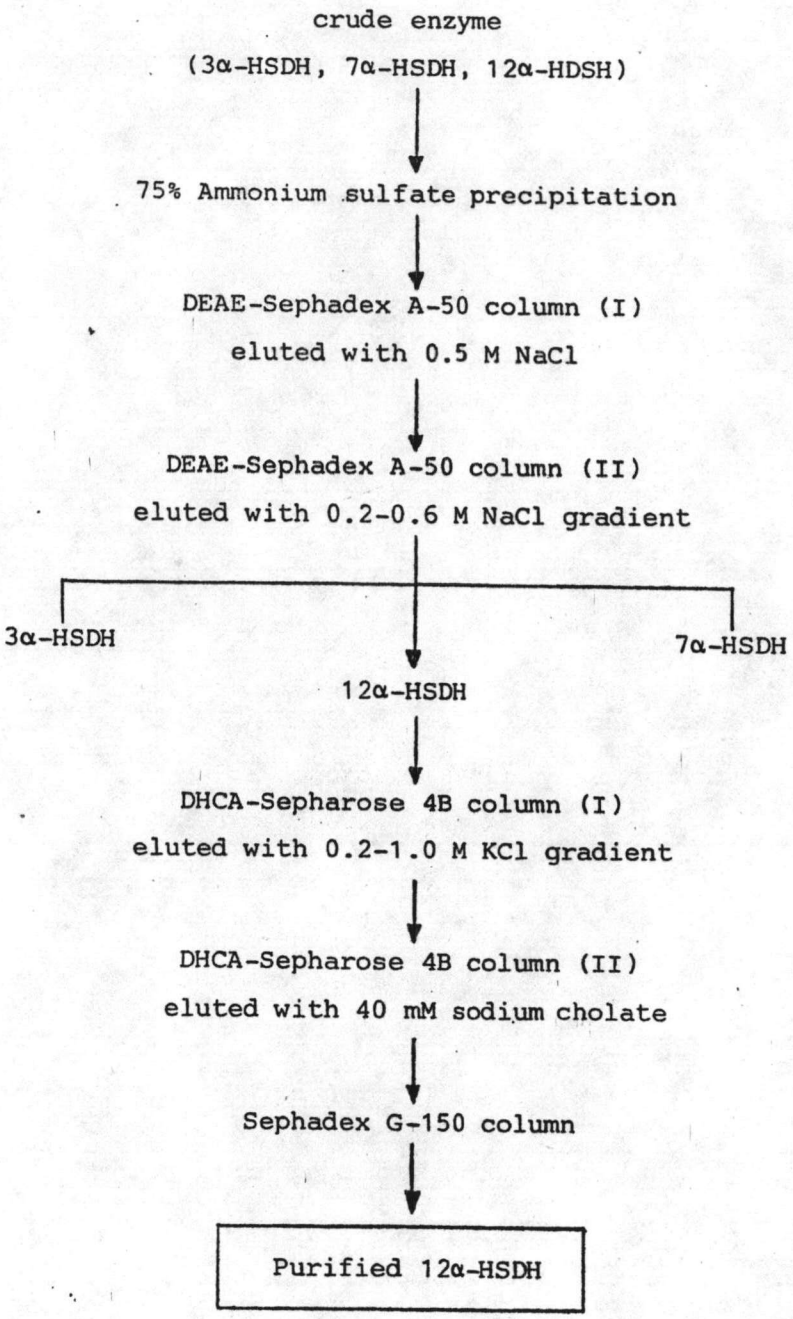
3.9 วิธีการและขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์

เริ่มจากสารละลายเอนไซม์ปริมาณมาก ซึ่งเตรียมได้จาก B. fuscum ตามวิธีข้อ 3.5.2 หลังจากนั้นนำมาทำตามขั้นตอนต่าง ๆ (ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 7 °ซ) ซึ่งได้สรุปไว้ในแผนภาพที่ 4

สารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) ที่จะใช้ในทุกขั้นตอนต่อจากนี้จะต้องผสมสารช่วยให้เอนไซม์เสถียร คือ 20 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล และ 0.1 เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล และหากขั้นตอนใดไม่ได้ผสมสารช่วยความเสถียรของเอนไซม์จะเน้นถึงเป็นครั้งคราวในการทดลองแต่ละครั้ง

3.9.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ทำการทดลองโดยเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตทีบดละเอียดลงในสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.5.2 อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละแฟรคชั่น แฟรคชันละ 10 เปอร์เซนต์ จนสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 80 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นคนต่อไปอีก 15 นาที นำไปปั่นแยกตะกอนและส่วนน้ำใสด้วยความเร็ว 5370xg เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ของแต่ละแฟรคชั่นด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ วัดปริมาตร, หาปริมาณโปรตีน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH



รูปที่ 4 ขั้นตอนการแยกเอนไซม์ 12α-HSDH จาก B. fuscum ให้บริสุทธิ์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทั้งในส่วนตะกอนและส่วนน้ำใส เพื่อหาแฟรคชั่นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้แอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) และผลผลิต (yield) ของเอนไซม์ 12α-HSDH สูงที่สุด

3.9.2 การทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์บางส่วนโดยการใช้คอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

3.9.2.1 การเตรียมคอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

แช่ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปล่อยให้เม็ดเจลพองตัวอย่างเต็มที่ เทส่วนน้ำใสพร้อมทั้งเม็ดเจลเล็ก ๆ ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 ชั่วโมง จึงค่อยเทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำอย่างนี้หลาย ๆ ครั้ง จนน้ำล้างเจลมีพีเอชและค่าความนำไฟฟ้า (conductity) ใกล้เคียงกับของบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง หลังจากนั้นนำเจลมาบรรจุลงในคอลัมน์-แก้วตรงขนาด 5×27 เซนติเมตร (หรือ 2×27 เซนติเมตร) ที่รองก้นด้วยเซฟาเด็กซ์ จี-50 (Sephadex G-50) ให้ได้ความสูงของเจลเป็น 10 เซนติเมตร ทั้ง 2 คอลัมน์ ผ่านสารละลาย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ที่บรรจุดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ปริมาตรอย่างน้อย 3-5 เท่า ของ bed volume เพื่อให้แน่ใจว่าคอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์ พร้อมทั้งวัดพีเอชและค่าความนำไฟฟ้าของสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์จนได้เท่ากับของบัฟเฟอร์ที่ใช้ผ่านคอลัมน์

3.9.2.2 การใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 โดยวิธีการชะด้วย Step-wise elution

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโม-เนียมซัลเฟต (ข้อ 3.9.1) ที่ผ่านการไดอะไลซ์ (dialyse) เอาเกลือแอมโมเนียมออกเรียบร้อยแล้ว เติมลงในคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (ขนาด 5×10 เซนติเมตร) ชะด้วยสารละลาย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 จนไม่มีโปรตีนออกมาจากคอลัมน์อีกต่อไป จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วยสารละลาย 0.5 โมลาร์โซเดียม-คลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 10 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) นำสารละลายมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิด แล้วนำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH มารวมกัน วัดปริมาตรรวม พร้อมทั้งแอคติวิตีรวมของเอนไซม์

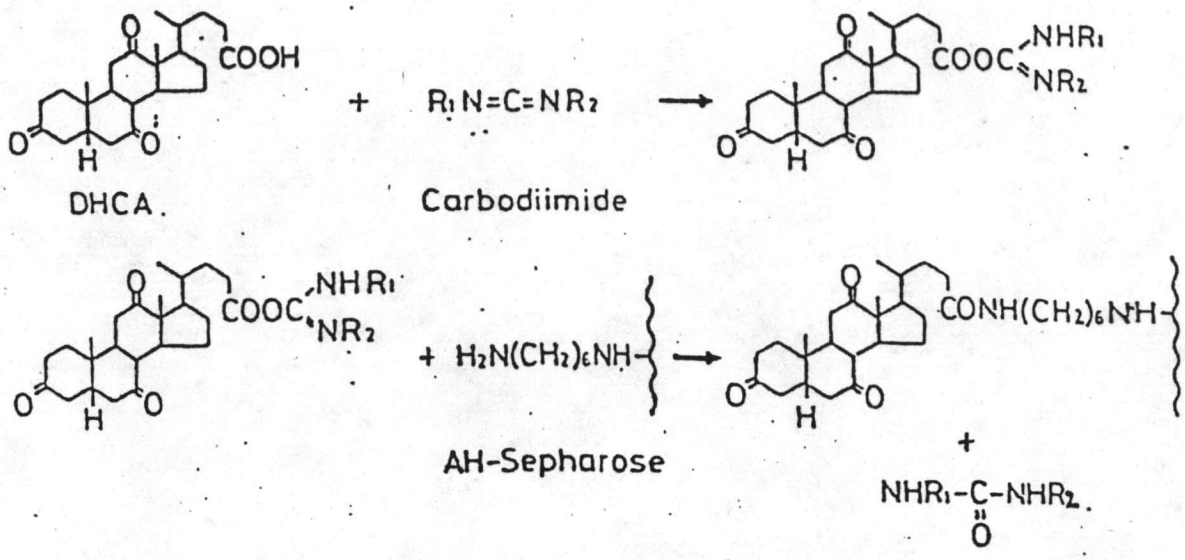
3.9.2.3 การใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 โดยวิธีการชะด้วย Linear salt gradient elution

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ครั้งที่ 1 (ข้อ 3.9.2.2) ที่ไดอะไลซ์เอาเกลือโซเดียมออกเรียบร้อยแล้ว เติมลงในคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (ขนาดคอลัมน์ 2×10 เซนติเมตร) ชะด้วยสารละลาย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีก จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย Linear salt gradient ที่เป็นส่วนผสมของ 500 มิลลิลิตรของสารละลาย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 500 มิลลิลิตรของสารละลาย 0.6 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 10 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิด รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์โดยการวัดค่าความนำไฟฟ้าของโซเดียมคลอไรด์ในสารละลาย นำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH มารวมกัน วัดปริมาตรรวม และแอคติวิตีรวมของเอนไซม์

3.9.3 การทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์แอฟฟินิตีของกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี

3.9.3.1 การเตรียมกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี เจล

แมตริกซ์ (matrix) ที่ใช้ ได้แก่ เอเอช-เซฟาโรส 4 บี (AH-Sepharose 4B) ซึ่งเป็นเซฟาโรส 4 บี ที่มีแขนคาร์บอนยาว 6 คาร์บอนอะตอม (six-carbon spacer arm) และมีหมู่อะมิโนอิสระ (free primary amino group) ที่ปลายแขนคาร์บอนนั้นเพื่อใช้ทำปฏิกิริยากับลิแกนด์ (ligand) ที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (free carboxyl group) ซึ่งลิแกนด์ในที่นี้ได้แก่ กรดดีไฮโดรโคลิก ปฏิกิริยาที่ใช้ในการจับ (couple) หมู่อะมิโนอิสระจากเอเอช-เซฟาโรส 4 บี เข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของกรดดีไฮโดรโคลิกคือปฏิกิริยา carbodiimide coupling แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 Carbodiimide coupling ระหว่าง AH-Sepharose 4B และกรดดีไฮโดรโคลิก

การเตรียมกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี เจล ทำได้โดยชั่งเอเอช-เซฟาโรส 4 บี 5 กรัม แช่ให้พองตัวเต็มที่ใน 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ (1 กรัมของเจลแห้งเมื่อพองตัวเต็มที่จะให้ปริมาตรของเจลที่พองตัวประมาณ 4 มิลลิลิตร) ล้างเม็ดเจลบน glass filter ด้วย 0.5 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ 1 ลิตร ตามด้วยน้ำกลั่นพีเอช 4.5-6.0 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเม็ดเจลมากระจายในน้ำกลั่น (อัตราส่วนระหว่างเม็ดเจลที่พองตัว และน้ำกลั่นเป็น 1:1 โดยปริมาตร) ปรับพีเอชของน้ำที่แช่เม็ดเจลให้อยู่ในช่วง 4.5-6.0 ด้วย 1 นอร์มอลกรดไฮโดรคลอริก แล้วจึงเติมสารละลายกรดดีไฮโดรโคลิก (0.15 กรัม ใน 4 มิลลิลิตร ของเมทานอล) ลงในเจล เขย่าเบา ๆ ปรับพีเอชของสารละลายให้อยู่ในช่วง 4.5-6.0 อีกครั้งหนึ่ง แล้วเติมสารละลาย dicyclohexyl carbodiimide (0.25 กรัม ใน 1.5 มิลลิลิตรของเมทานอล) ทีละหยดพร้อมทั้งเขย่าไปด้วย หลังจากนั้นนำเม็ดเจลในสารละลายผสมของกรดดีไฮโดรโคลิก และ dicyclohexyl carbodiimide ไปเขย่าแบบกลับไปกลับมา (end-over-end mixing) ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบพีเอชของสารละลายในช่วง 1 ชั่วโมงแรกให้อยู่ในช่วง 4.5-6.0 หลังจากนี้แล้วการเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะน้อยมาก และจะคงอยู่ในช่วง 4.5-6.0 เมื่อทำการเขย่านานประมาณ 24 ชั่วโมงแล้ว นำเจลที่ได้มาล้างบน glass filter ด้วยเมทานอล, น้ำกลั่น และโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 มิลลิโมลาร์, พีเอช 6.8) ตามลำดับ และเก็บเจลที่เตรียมได้ไว้ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.9.3.2 <u>การตรวจหาปริมาณของกรดคีไฮโดรโคลิกในกรดคีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี เจลที่เตรียมได้</u> (ดัดแปลงจาก Failla และ Santi, 1972)

นำ 0.5 มิลลิลิตร ของกรดคีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี เจล ที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.3.1 มาทำให้เป็น 2 มิลลิลิตร ด้วย 65 เปอร์เซนต์กรดซัลฟูริก เขย่า (vortex) ให้ละลาย แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 380 นาโนเมตร ในทันที เปรียบเทียบค่าที่อ่านได้กับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดคีไฮโดรโคลิก

3.9.3.3 <u>การเตรียมคอลัมน์ กรดคีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี</u>

นำกรดคีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี เจล ที่เตรียมได้จากข้อ 3.9.3.1 มาบรรจุลงในคอลัมน์พลาสติกที่ทำด้วยหลอดฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร (1.4×10 เซนติเมตร) ให้ได้ความสูงของเจล 5 เซนติเมตร จากนั้นผ่านโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์อย่างน้อย 8-10 เท่าของปริมาตรเจลที่ใช้ เพื่อให้คอลัมน์อยู่ในสภาพสมดุลย์

3.9.3.4 <u>การใช้คอลัมน์กรดคีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี โดยวิธีการชะด้วย Linear salt gradient</u>

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากคอลัมน์ของดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (ข้อ 3.9.2.3) และไดอะไลซ์เอาเกลือโซเดียมออกเรียบร้อยแล้ว เติมลงในคอลัมน์ของกรดคีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์อีกต่อไป จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วย Linear salt gradient ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่าง 250 มิลลิลิตรของสารละลาย 0.2 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ในโปแตส-เซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 250 มิลลิลิตรของสารละลาย 1.0 โมลาร์โปแตสเซียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 4 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH รวมทั้งติดตามความเข้มข้นของเกลือโปแตส-เซียมคลอไรด์โดยการวัดค่าความนำไฟฟ้าของโปแตสเซียมคลอไรด์ในสารละลาย จากนั้นนำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH มารวมกันวัดปริมาตรรวมและแอคติวิตีรวมของเอนไซม์

3.9.3.5 การใช้คอลัมน์กรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี โดยวิธี Specific elution

ผ่านสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.9.3.4 ที่ไดอะไลซ์เอาเกลือโปแตสเซียมออกแล้วลงในคอลัมน์ของกรดดีไฮโดรโคลิก-เซฟาโรส 4 บี (1.4×5 เซนติเมตร) ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จนไม่มีโปรตีนออกจากคอลัมน์จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วยสารละลาย 40 มิลลิโมลาร์โซเดียมโคเลท (sodium cholate) ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 2.5 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายทุกหลอดมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH นำแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH มารวมกัน วัดปริมาตรรวม และแอคติวิตีรวมของเอนไซม์

3.9.4 การทำให้เอนไซม์ 12α-HSDH บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-150

3.9.4.1 การเตรียมคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-150 20 กรัม ในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ ระหว่างที่ต้มคอยคนเบา ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาบรรจุลงในหลอดแก้วตรงขนาด 2.5×75 เซนติเมตร ให้ได้เจลสูง 60 เซนติเมตร ผ่านโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์ที่บรรจุเซฟาเด็กซ์ จี-150 นี้อีกประมาณ 20 ชั่วโมง ด้วยอัตราไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แรงดันการไหลของสารละลาย 30 เซนติเมตรของน้ำ เพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ (ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์โดยการผ่านสารละลายบลูเด็กซ์แทรนเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรลงในคอลัมน์)

3.9.4.2 การใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150

เติมสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.9.3.5 (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 แล้วชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 6 มิลลิลิตรติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พร้อมทั้งวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ 12α-HSDH รวมแฟรคชันที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกันและวัดปริมาตรรวม แอคติวิตีรวมของเอนไซม์

3.9.5 การแยกโปรตีนด้วยโพลีอะไครลาไมด์ เจล ชนิดแท่ง (Disc-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Davis (1964)

3.9.5.1 การเตรียมอะไครลาไมด์ เจล ชนิดแท่ง

ผสมสารละลาย A (ข้อ 3.2.2.1) 1 ส่วน, สารละลาย B (ข้อ 3.2.2.2) 2 ส่วน และน้ำกลั่น 1 ส่วนโดยปริมาตร ดูดเอาอากาศออก (deaerate) จากสารละลายประมาณ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย C (ข้อ 3.2.2.3) 8 ส่วนโดยปริมาตร (ส่วนผสมนี้มีอะไครลาไมด์ 7 เปอร์เซนต์) นำมาบรรจุลงในหลอดแก้วขนาด 0.5×11 เซนติเมตร ที่ปิดปลายข้างหนึ่งด้วยพาราฟิล์มจนกระทั่งสารละลายในหลอดแก้วมีความสูง 9 เซนติเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็วและแผ่วเบา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน (ใช้เวลาประมาณครึ่งชั่วโมง) จึงเทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล เตรียมสแตกกิ้ง-เจล (stacking gel) โดยผสมสารละลาย B (ข้อ 3.2.2.2), สารละลาย D (ข้อ 3.2.2.4), สารละลาย E (ข้อ 3.2.2.5) และสารละลาย F (ข้อ 3.2.2.6) เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:2:1:4 โดยปริมาตร ล้างผิวหน้าเจลด้วยสารผสมสแตกกิ้ง-เจล แล้วเติมสารผสมสแตกกิ้ง-เจลลงในหลอดที่มีโพลีอะไครลาไมด์เจลให้มีความสูงของเจล 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้เจลเกิดโพลีเมอร์ไรเซชั่นอย่างสมบูรณ์ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ประมาณครึ่งชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.9.5.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์

นำสารละลายเอนไซม์จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ที่ต้องการวิเคราะห์มาผสมกับสารละลาย 80 เปอร์เซนต์ซูโครส (ข้อ 3.2.2.8) ด้วยอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร แล้วดูดส่วนผสมนั้นหยอดลงบนเจลที่เตรียมไว้ให้มีปริมาณโปรตีนต่อแท่งเจล 50-100 ไมโครกรัม

3.9.5.3 การทำอีเลคโตรโฟริซิส

บรรจุแท่งเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ พีเอช 8.3 (ข้อ 3.2.2.7) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นล่าง ผสมสารละลายสีตามรอย (ข้อ 3.2.2.9) กับบัฟเฟอร์แล้วใส่ลงในอ่างบัฟเฟอร์ชั้นบนโดยให้บัฟเฟอร์ทั้งอ่างบนและล่างท่วมปลายทั้ง 2 ข้างของแท่งเจล หยอดสารละลายโปรตีน (ข้อ 3.9.5.2) ลงบนผิวหน้าเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้า

ขนาด 3 มิลลิแอมแปร/เจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบนจนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนไปจนถึงระยะอีก 1 เซนติเมตร จะถึงปลายด้านล่างของแท่งเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

การทำอีเลคโตรโฟริซิสนี้จะกระทำที่อุณหภูมิห้องสำหรับการย้อมสีโปรตีนธรรมดา และที่อุณหภูมิ 7 °ซ สำหรับการย้อมสีแอคติวิตีและการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ในแท่งโพลีอะไครลาไมด์เจล

3.9.5.4 วิธีย้อมสีโปรตีนในแท่งโพลีอะไครลาไมด์ เจล

ถ่ายเจลจากข้อ 3.9.5.3 ออกจากหลอดแก้วแล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ข้อ 3.2.2.10) เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำแท่งเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (ข้อ 3.2.2.12) จนกระทั่งเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน เก็บเจลที่ได้ไว้ในสารละลาย 7 เปอร์เซนต์ กรดอะซิติกที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.9.5.5 วิธีย้อมสีแอคติวิตีในแท่งโพลีอะไครลาไมด์ เจล

ทำการแยกเอนไซม์ในสารละลายตัวอย่างโดยใช้เทคนิคเจลอีเลคโตรโฟริซิสที่อุณหภูมิต่ำ (7-10 °ซ ข้อ 3.9.5.3) หลังจากนั้นถ่ายเจลออกจากหลอดแก้วนำมาแช่ในน้ำยาย้อมสีแอคติวิตี (ข้อ 3.2.2.11) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จะปรากฏแถบสีม่วงอย่างชัดเจน จากนั้นจึงนำเจลไปหยุดปฏิกิริยาและล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลาย 7 เปอร์เซนต์กรดอะซิติก เก็บเจลที่ได้ไว้ในสารละลาย 7 เปอร์เซนต์กรดอะซิติกที่อุณหภูมิ 7 °ซ

3.9.5.6 วิธีวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในแท่งโพลีอะไครลาไมด์ เจล

ทำการแยกเอนไซม์ในสารละลายตัวอย่างโดยใช้เทคนิคเจลอีเลคโตรโฟริซิสที่อุณหภูมิต่ำ (7-10 °ซ ข้อ 3.9.5.3) หลังจากนั้นถ่ายเจลออกจากหลอดแก้ว ตัดแท่งเจลออกเป็นชิ้น ๆ ความยาวชิ้นละ 0.5 เซนติเมตร บีบผ่านหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ใน 1.5 มิลลิลิตรของโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ α-HSDH ทั้ง 3 ชนิด ตามวิธีในข้อ 3.6.1

3.10 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ 12α-HSDH ที่บริสุทธิ์

3.10.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยการใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 (ใช้วิธีของ Pharmacia fine chemical)

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ความเข้มข้นตัวละ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งได้แก่ คาตาเลส (Catalase) น้ำหนักโมเลกุล 240,000 ดาลตัน, อัลโดเลส (Aldolase) น้ำหนักโมเลกุล 158,000 ดาลตัน, อัลบูมิน (Albumin, BSA) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน และไคโมทริบซิโนเจน-เอ (Chymotrypsinogen A) น้ำหนักโมเลกุล 25,700 ดาลตัน ลงในคอลัมน์ (ขนาด 2.5×57.5 ซม.) ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 6 มิลลิลิตร ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน วัดปริมาณของสารละลายโปรตีนที่ออกมาจากคอลัมน์ และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำไปคำนวณหาค่า K_{av} ดังนี้

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

เมื่อ V_e คือ elution volume ของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์

V_o คือ void volume ของสารละลาย บลู เด็กซ์แทรน

V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่

หลังจากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์ 12α-HSDH ที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุล (เตรียมจากข้อ 3.9.3.5) ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-150 ชะด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ทุกหลอด ๆ ละ 6 มิลลิลิตร นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดปริมาตรของสารละลายทุกหลอดเพื่อหา V_e ของเอนไซม์ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ คำนวณค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนดังกล่าวข้างต้น

3.10.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจล อีเลคโตรโฟรีซิสชนิดแท่ง (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

(ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Weber, Pringle และ Osborn, 1972)

3.10.2.1 การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจลชนิดแท่ง

ผสมสารละลายอะไครลาไมด์ (ข้อ 3.2.3.1) 10.1 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 3.4 มิลลิลิตร และเจล บัฟเฟอร์ (ข้อ 3.2.3.2) 15 มิลลิลิตร ทำการดูดเอาอากาศออกจากสารละลายประมาณ 10 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ข้อ 3.2.3.3) 1.5 มิลลิลิตร และ TEMED 0.045 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน (ส่วนผสมนี้มีอะไครลาไมด์ 7.5 เปอร์เซนต์) นำมาบรรจุลงในหลอดแก้วขนาด 0.5×11 เซนติเมตร ที่ปิดปลายข้างหนึ่งด้วยพาราฟิล์ม จนกระทั่งสารละลายในหลอดแก้วมีความสูง 9 เซนติเมตร ค่อย ๆ หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็วและแผ่วเบา จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง จะสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงว่าโพลีเมอร์ไรเซชั่นของเจลเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.10.2.2 <u>สารละลายโปรตีนมาตรฐาน</u>

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ อัลบูมิน (Albumin, BSA) น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน, โอวัลบูมิน (Ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดาลตัน, แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase) น้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดาลตัน, ไคโมทริปซิโนเจน-เอ (Chymotrypsinogen A) น้ำหนักโมเลกุล 25,700 ดาลตัน และฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) น้ำหนักโมเลกุล 15,500 ดาลตัน เตรียมโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ให้มีความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.10.2.3 <u>การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์</u>

ผสมบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง (sample buffer) (ข้อ 3.2.3.5) 2 ส่วน และสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ 1 ส่วน โดยปริมาตรในหลอดขนาดเล็ก (ความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วง 0.05-1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ผสมสารละลายสีตามรอย (ข้อ 3.2.3.6) 5 ไมโครลิตร, 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 5 ไมโครลิตร และกลีเซอรอล 1 หยด ในหลอดขนาดเล็ก หลังจากนั้นเติมสารละลายโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เตรียมโดยวิธีข้างต้น เขย่า (vortex) ให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมนี้หยอดลงบนเจลที่เตรียมไว้โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนอยู่ในช่วง 1-20 ไมโครกรัมต่อแท่งเจล

3.10.2.4 <u>การทำอีเลคโตรโฟริซิส</u>

บรรจุแท่งเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง เติมอีเลคโตรด

บัฟเฟอร์ (ข้อ 3.2.3.4) ลงในอ่างบัฟเฟอร์ทั้งอ่างบนและล่างโดยให้บัฟเฟอร์ท่วมปลายทั้ง 2 ข้างของแท่งเจล หยอดสารละลายโปรตีนที่เตรียมไว้ (ข้อ 3.10.2.3) ลงบนผิวหน้าเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 8 มิลลิแอมแปร์/เจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน และตัดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบสีตามรอยเคลื่อนไปจนถึงระยะทางอีก 1 เซนติเมตร จะถึงปลายล่างของแท่งเจล

3.10.2.5 วิธีย้อมสีโปรตีนในเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล

ถ่ายเจลจากข้อ 3.10.2.4 ออกจากหลอดแล้วและนำมาย้อมสีโปรตีน ตามวิธีในข้อ 3.9.5.4

3.10.2.6 การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

ทำได้โดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแท่งเจลนำมาคำนวณหา mobility ดังนี้

$$\text{mobility} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่}}$$

คำนวณหาค่า mobility ของเอนไซม์ 12α-HSDH แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนในข้อ 3.10.2.2

3.11 การสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกรดโคลิกด้วยเอนไซม์ 12α-HSDH (ดัดแปลงจากวิธีของ พิศมัย เปี่ยมทิพย์มนัส, 2530)

3.11.1 การสังเคราะห์กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก จากกรดโคลิก

บ่มเอนไซม์ในสารละลายปฏิกิริยา (ข้อ 3.6.1) ที่ประกอบด้วยกรดโคลิกเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, สารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ พีเอช 9.5 เข้มข้น 0.17 โมลาร์ โดยแปรค่า NAD^+ เข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-5 มิลลิโมลาร์ ปล่อยให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละความเข้มข้นของ NAD^+ เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนคงที่แล้ว ดูดสารละลายขึ้นมา 0.5 มิลลิลิตร เติม 1 นอร์มอลกรดไฮโดรคลอริก 0.4 มิลลิลิตร และสารละลายเทสโทสเทอโรน (testosterone) เข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่า (vortex) 15 วินาที จากนั้นเติมเอทิลอะซิเตต เขย่า (vortex) ต่ออีก 1 นาที นำไปปั่นด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบ

ตั้งโต๊ะด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบน (เอทิลอะซิเตต) แยกออกมาเติมผงโซเดียมซัลเฟต แอนไฮดรัสประมาณ 1 กรัม เขย่า (vortex) แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสนำไประเหยให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 65 °ซ ละลายสารที่ได้ด้วยเมทานอล นำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดน้ำดีโดยวิธี HPLC

3.11.2) การวิเคราะห์ชนิดของกรดน้ำดีโดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

ชนิดและปริมาณของกรดน้ำดีซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาในข้อ 3.11.1 ติดตามวัดได้โดยเทคนิคของ HPLC โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sawada และคณะ (1980) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกบริสุทธิ์โดยมีเทสโทสเทอโรนเป็นสารมาตรฐาน (Internal standard)

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

column size ; 4.6 x 250 mm

Absorbent ; Dupont Zorbax, ODS

Mobile phase ; 0.05 M KH_2PO_4 : Acetic acid : Methanol (30:0.05:70 by volume) pH 3

Flow rate ; 1 ml/min

Detector ; UV monitor at 208 nm

โดยวิธีนี้พบว่า เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดน้ำดีชนิดต่าง ๆ มีค่าดังนี้

กรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก	10.18 นาที
เทสโทสเทอโรน	11.83 นาที
กรดโคลิก	16.83 นาที

คำนวณค่าเปอร์เซนต์ของผลิตภัณฑ์กรดน้ำดีต่อสารเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน (พื้นที่ใต้กราฟของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิก/พื้นที่ใต้กราฟของเทสโทสเทอโรนมาตรฐาน) แล้วนำไปเทียบหาปริมาณของกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 6) เมื่อใช้สารมาตรฐานกรด 12-คีโตคีโนดีออกซีโคลิกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยวิธีการและสภาวะการทดลองเช่นเดียวกัน