2. การทดลอง

2.1 การสกัดเอนไซม์เอสเทอเรส

ใช้วิธีของไพเราะ ทิพยทัศน์ (2510) โดยแช่ร่ำในน้ำให้เป็น 25 % suspension (w/v) ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงในเครื่อง International Portable Refrigerated Centrifuge ด้วยแรง 3,500 x g ที่ 0 °ซ 15 นาที จะได้สารละลายใสซึ่งใช้เป็น crude enzyme

2.2 วิธีสังเคราะห์ β - Naphthyl acetate

ใช้วิธีของ Vogel (1966) โดยละลาย β-naphthol 5.0 กรัมใน 25 มิลลิลิตรของสารละลาย 10 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมน้ำแข็ง 60 กรัม เติม acetic anhydride 5.5 มิลลิลิตรแล้วเขย่าแรง ๆ 10-15 นาที จะได้ β-naphthyl acetateแยกออกมาเป็นผลึกที่ไม่มีสี กรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิของห้องแล้วตกผลึกใหม่อีก 2 ครั้งด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์เจือจาง β-napthyl acetate ที่ได้เป็นผลึกรูปเข็มใส มีจุดหลอมตัว 68.5-70 °ซ ซึ่งมีความบริสุทธิ์พอที่จะเป็น substrate ของเอสเทอเรสได้

2.3 การเตรียมสารละลาย substrate

ชั่ง β-naphthyl acetate 0.151 กรัม นำมาละลายในเมทิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร หยดสารละลายที่ได้ทีละหยดลงในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตรพร้อมกับคนให้เข้ากันตลอดเวลาจนครบ 25 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 500 มิลลิลิตร substrate ที่ได้มีความเข้มข้น 0.81×10^{-3} M และเตรียมไว้ใช้นานได้ไม่เกิน 8 ชั่วโมง

2.4 การวัด activity ของเอสเทอเรส

activity ของเอสเทอเรสวัดโดยการไตเตรตกรดที่เกิดจาก substrate ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.004 M วัดปฏิกริยาไฮโดรไล-

ซึ่งที่เกิดขึ้นโดยการไตเตรตติดต่อกันไป (continuous titration) โดยใช้เครื่องมือ Radiometer pH - stat titrimeter บันทึกปริมาณด่างที่ใช้ด้วยเครื่อง Radiometer titrigraph reaction mixture จะต้องคนอยู่ตลอดเวลาด้วย stirror glass electrode ที่ใช้ต้องยังคงไวต่อการเปลี่ยนแปลง pH น้อย ๆ วิธีนี้สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของ substrate ได้น้อยที่สุดถึง 4 nanomoles และจะวัดอัตราของกรดที่เกิดขึ้นได้ถูกต้องเมื่อเกิดกรดไม่เกิน 500 nanomoles / min. เพราะถ้าเกิดกรดในอัตราเร็วกว่านี้ด่างจะออกมาจากเครื่องมือไม่ทัน (Wilde & Kekwick, 1964; Downey & Andrews, 1965)

ในการวัด activity ของเอสเทอเรสทำโดยนำสารละลายต่อไปนี้ใส่ไว้ใน reaction cell:- 0.15 M โซเดียมคลอไรด์, 0.65 x 10^{-6} M β-naphthyl acetate เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ปริมาตรสุดท้ายรวมเป็น 25 มิลลิลิตร ปรับให้ enzyme-substrate mixture มี pH เท่ากับ 8.0 ด้วยด่างจาก auto-burette แล้วคอยให้ pH ของสารละลายนี้ลดลงมาถึง pH ที่กำหนดไว้คือ 7.8 ปล่อยให้ไตเตรตโดยไม่บันทึกปริมาณด่างเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงเริ่มบันทึกปริมาณของด่างด้วย titrigraph เป็นเวลาอย่างน้อย 3 นาที กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงตลอดเวลาที่ทดลองและปริมาณด่างที่ใช้เป็นปฏิภาคตรงกับปริมาณเอนไซม์ที่ใส่ลงใน reaction mixture ในการทดลองได้เลือกใช้ปริมาณของเอนไซม์ที่จะทำให้การไตเตรตใช้ด่างในอัตรา 200 ถึง 400 nanomoles/min, สำหรับ blank ทำทุกอย่างแบบเดียวกัน แต่ไม่ได้เติมเอนไซม์

2.4.1 <u>unit ของเอสเอทเรส</u>

activity ของเอนไซม์เอสเทอเรส 1 unit กำหนดว่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ไฮโดรไลส์ substrate แล้วให้ product ซึ่งจะทำปฏิกริยาพอดีกับ 1 μ mole NaOH / min.

specific activity หมายถึง activity ของเอสเทอเรสคิดเป็น unit/ mg. protein (โดยวิธีของ Lowry et al, 1951)

2.5 การวัดปริมาณโปรตีน

2.5.1 วิธีวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry et al (1951)

2.5.1.1 วิธีเตรียม Phenol Reagent (Folin and Ciocalteu)

นำ sodium tungstate มา 50 กรัม sodium molybdate 12.5 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 350 มิลลิลิตร เติม 85 % phosphoric acid 25 มิลลิลิตร และกรดเกลือเข้มข้นจำนวน 50 มิลลิลิตร reflux ด้วยไฟอ่อน ๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เสร็จแล้วเติม lithium sulfate 75 กรัม น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และเติมโบรมีน 2-3 หยด ต้มสารละลายนี้ 15 นาที เพื่อไล่โบรมีนที่มากเกินพอออกไป ทำให้เย็นลงแล้วทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 500 มิลลิลิตร ก่อนนำมาใช้ต้องทำให้เจือจางลงเป็น 1:1.2 ด้วยน้ำกลั่น (Hawk, Oser & Summerson, 1965)

2.5.1.2 วิธีทดลอง

สารละลายที่จะหาปริมาณโปรตีนจะต้องทำให้เจือจางลงจนกระทั่งมีโปรตีนอยู่ประมาณ (25-500) x 10^{-6} กรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายนี้มา 1 มิลลิลิตร เติม reagent C (50 ml of 2% Na_2CO_3 in 0.1M NaOH : 1 ml of 0.5% $CuSO_4 .5H_2O$ in 1 % pot.tartrate) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที หรือนานกว่านั้นแล้วเติม reagent E (Phenol reagent ที่ทำให้เจือจางแล้ว) 0.5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว เขย่าให้เข้ากันทันทีภายใน 1-2 วินาที ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที วัด absorbance ของสีที่เกิดขึ้นที่ 750 nm การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีนี้เมื่อทดลองกับ bovine serum albumin ซึ่งใช้เป็นมาตรฐาน พบว่าวัดปริมาณโปรตีนได้ละเอียดถึง 0.2 x 10^{-6} กรัม

2.5.2 วิธีวัดปริมาณโปรตีนที่ 280 nm

นำ effluent ที่ได้หลังจากผ่านเอนไซม์ใน Sephadex G-100column จำนวน 72 fractions ไปวัด absorbance ที่ 280 nm ด้วยเครื่องมือ spectrophotometer

2.6 การทำเอสเทอเรสให้บริสุทธิ์ (Purification of Esterase)

2.6.1 Ammonium Sulfate Fractionation

ดัดแปลงจากวิธีของ Okuda and Fujii (1967) โดยใช้ข้าวขาว 50 กรัมสกัดเอนไซม์ออกมาได้ประมาณ 130 มิลลิลิตร นำมาทำให้เข้มข้นเป็น 20 %saturation ของ ammonium sulfate โดยค่อย ๆ เติมผลึก ammonium sulfate ที่บดละเอียดและอบให้แห้งแล้ว ด้วยความเร็วประมาณ 1 กรัม ต่อนาที พร้อมทั้งกนอยู่ตลอดเวลาที่ 4 °ซ ด้วย magnetic stirror ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 M ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บตะกอนซึ่งเป็น 0-20 % fraction โดยนำไปเหวี่ยงในเครื่อง International Portable Refrigerated Centrifuge ด้วยแรง 12,000 xg ที่ 0 °ซ 15 นาที ส่วน supernatant ที่เหลือก็ทำเช่นเดียวกันนี้ ต่อไปเรื่อย ๆ จนได้ 20-45 %,45-60% และ 60-100 % fraction ครั้นแล้วนำตะกอนทั้ง 4 fractions มาละลายในน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 3-4 °ซ จนได้ปริมาตรสุดท้ายของแต่ละ fraction เท่ากับ 25,500,25 และ 25 มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำไปวัด activity ของเอสเทอเรสตามวิธี 2.4 และนำสารละลายของเอนไซม์ส่วนที่เหลือไปหาปริมาณของโปรตีน ตามวิธีของ Lowry et al (1951)

2.6.2 Sephadex G-100 Gel - filtration

2.6.2.1 การเตรียม Sephadex G-100 column

ใช้วิธีของ Flodin (1952) โดยนำ Sephadex G-100 (particle size 40-120 μ) มา 13 กรัม เติมสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ซึ่งเข้มข้น 0.025 M คน ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ particle ตกลงมา รอจนเห็นเป็นรอยต่อระหว่าง gelกับ supernate จึงริน supernate ทิ้งเพื่อขจัด particle เล็ก ๆ ออกไป ทำเช่นนี้ 4-5 ครั้ง จนเห็นว่า supernate ใส นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 40 นาที เมื่อ sterilize gel แล้วแช่ gel นี้ไว้ที่ 4 °ซ 7 วัน เพื่อให้ gel อมน้ำไว้จนพองตัวเต็มที่ ต่อจากนั้นจึงนำมาทำให้เจือจางลง 2เท่าด้วยสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ซึ่งเข้มข้น 0.025M ก่อน จึงเติม gel นี้ลงไปใน column

ซึ่งมีสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เข้มข้น 0.025 M บรรจุอยู่แล้วสูงประมาณ 1/3 ของความสูงของ column จนได้ความสูงของ gel ประมาณ 2 - 5 เซ็นติเมตร จึงเปิดปลาย column ให้สารละลายไหลออกแต่ผิวของ gel ยังไม่หันแห้งและยังตกลงมาไม่หมด ปิดปลายของ column เติม gel ลงไปใหม่ ทำเช่นนี้จนได้ความสูงของ gel 35 เซ็นติเมตร หรือคิดเป็นปริมาตรของ gel เท่ากับ 170 ลบ.ซม. เมื่อตรวจดูแล้วว่าไม่มีฟองอากาศอยู่เลยตลอด column จึงดูดเอา supernate ออกด้วยปิเปตต์จนเกือบแห้ง ปิดผิว gel ด้วย adapter แล้วพลิก column กลับให้ adapter อยู่ข้างล่าง เพื่อจะได้ผ่านเอนไซม์จากข้างล่างแล้วออกทางข้างบนของ column ตรวจความสม่ำเสมอของ column โดยผ่านสารละลาย blue dextran ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งละลายอยู่ในสารละลาย sucrose 0.5 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วพิจารณาความสม่ำเสมอของ column จาก band สีน้ำเงินที่เกิดขึ้นขณะเดียวกันก็วัด void volume ด้วย โดยเก็บ effluent ตั้งแต่เริ่มผ่าน blue dextran จนกระทั่ง blue dextran ออกจาก column ซึ่ง column ที่เตรียมนี้มี void volumn ประมาณ 65 มิลลิลิตร ก่อนจะใช้ Sephadex G-100 column จะต้องผ่าน eluant ที่จะใช้ในการทดลองอย่างน้อย 3-5 เท่าของปริมาตรของ gel เสียก่อน

2.6.2.2 <u>การผ่านเอสเทอเรสใน Sephadex G-100 column</u>

ใช้วิธีของ Downey & Andrews (1965) โดยนำเอาเอนไซม์ที่ได้จากการทำ ammonium sulfate fractionation จาก 100 มิลลิลิตรของ crude enzyme ที่ fraction 20-45 % saturation ละลายในสารละลายของโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.2 M จนปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 มิลลิลิตร แล้วนำมาเหวี่ยงในเครื่อง International Portable Refrigerated Centrifuge ด้วยแรง 15,000xg ที่ 0 °ซ 15 นาที เป็นการเอา particle ใหญ่ ๆ ที่ปนอยู่ออกไป เพื่อกันไม่ให้ไปอุดตันใน column แล้วเก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ 20 มิลลิลิตรสำหรับผ่าน Sephadex G-100 column ส่วนที่เหลือเก็บไว้หา activity ของเอสเทอเรส และปริมาณของโปรตีน

(Lowry, 1951) ครั้นแล้วจึงผ่านเอนไซม์จำนวน 20 มิลลิลิตร นั้นไปตาม column ซึ่งเก็บไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิประมาณ 4-6 °ซ โดยผ่านจากข้างล่างขึ้นสู่ข้างบนของ column ด้วย flow rate 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง operating pressure เท่ากับ 26 เซ็นติเมตร และใช้โซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.2 M เป็น eluant แล้วเก็บ effluent ไว้ fraction ละ 5 มิลลิลิตร ด้วย Fraction collectorเป็นจำนวน 72 fractions ใช้เวลาทั้งหมด ประมาณ 12 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำแต่ละ fraction ไปวัดactivity ของเอนไซม์ วัด absorbance ที่ 280 nm ด้วยเครื่องมือ Spectrophotometer และหาปริมาณของโปรตีนโดยวิธีของLowry et al (1951)