บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

<u>เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (controlled environmental incubator shaker) ของ New Brunswick Co., U.S.A.

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, Spectronic 21) ของ Bausch and Lomb, U.S.A.

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/visible recording spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของ Shimadzu corporation, Japan.

4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) รุ่น 240 ของ Corning, U.S.A.

5. เครื่องชั่งรุ่น L2200P และ A200S ของ Sartorius, U.S.A.

6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 ของTomy Seiko Co., LTD., Japan.

7. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 Beckman,U.S.A.

8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของ Memmert, Germany.

9. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar Flow ของ ISSCO รุ่น J2-21 U.S.A.

10. ตู้แช่แข็ง (Deep Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น F0535 ของ Sanyo electronic Co.,Ltd., Japan.

11. เครื่องโครมาโตรกราฟี (Low Pressure Liquid chromatography) รุ่น Econo ของ Bio-Rad,U.S.A.

12. อุปกรณ์อัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration cell) ของ Amicon, U.S.A.

13. เครื่องอิเลคโตรโฟริซิส (electrophoresis) ของ Hoefler Scientific Instrument, San Francisco, U.S.A.

14. เครื่องอิเลคโตรโฟริซิสแบบแผ่น (slab gel electrophoresis equipment) รุ่น Mini-Protein II Dual ของ Bio-Rad, U.S.A.

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ไซแลนจากเปลือกข้าวโอ๊ต (xylan from oat spelts) ของ Sigma, U.S.A.

2. พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.

3. ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (o-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) ของ Sigma, U.S.A.

4. พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ของ Sigma, U.S.A.

5. อะลูมินา (alumina) ของ Sigma, U.S.A.

6. ดีอีเออี-ไบโอเจล อกาโรส (DEAE-Biogel Agarose) ของ Bio-Rad, U.S.A.

7. เซฟาเด็กซ์ จี-200 (Sephadex G-200) ของ Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

8. อะคริลาไมด์ (acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.

9. บิส (N,N-methylene bis acrylamide) ของ Sigma, U.S.A.

10. ทริส (Tris 2-amino-2 (hydroxymethyl) propane-1-3 diol) ของ Sigma, U.S.A.

11. TEMED (N,N,N',N',- Tetramethylethylenediamine) ของ Sigma, U.S.A.

12. สีโคแมสซี บลู จี-250 (Comassie brilliant blue G-250) ของ Fluka, Switzerland.

13. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) ของ Sigma, U.S.A.

14. ไดไธโอธริอีทอล (dithiothreitol) ของ Sigma, U.S.A.

15. เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethlymaleimide) ของ Sigma, U.S.A.

16. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ของ Sigma, U.S.A.

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp.43-4 และการเตรียมบีตา-ไซโลซิเดส

การเตรียมสปอร์ *Streptomyces* sp.43-4

ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. 43-4 ในอาหารแข็งเอียงชนิด MS (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จึงนำมาขูดสปอร์ออกโดยเทคนิคปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวทำละลาย ดูดสารละลายแขวนลอยของสปอร์ที่ได้มากรองผ่านชุดกรองสปอร์ (ภาคผนวก จ หมายเลข 1) นำสารแขวนลอยสปอร์ที่กรองได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จึงเทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง จากนั้นใช้ 20 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เป็นตัวทำละลายและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การเพาะเลี้ยง *Streptomyces* sp.43-4

นำสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริพติคซอย บรอท (Tryptic soy broth) pH 7.0 ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีขดลวดสปริงอยู่ภายใน นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิชนิด rotary shaker ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จึงนำมาเป็นหัวเชื้อ (inoculum) ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 เปอร์เซนต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไซแลน คอมเพล็กซ์ มีเดียม (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร และมีขดลวดสปริงอยู่เช่นกัน นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบ rotary shaker ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองเซลล์ *Streptomyces* sp. 43-4 ที่เลี้ยงได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำและ 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 จากนั้นนำเซลล์มาเตรียมบีตา-ไซโลซิเดสตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nakanishi และคณะ (1987) โดยนำเซลล์ที่ได้มาทำให้แตกโดยบดรวมกับผงอะลูมินา (alumina) ในโกร่งด้วยอัตราส่วนน้ำหนักเซลล์เปียกต่อผงอะลูมินาเป็น 1 ต่อ 1 จากนั้นเติม 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 เพื่อเป็นตัวทำละลายนำส่วนผสมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา

10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสและปริมาณโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การตรวจสอบแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส

การตรวจสอบแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสเป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Nakanishi และคณะ (1987) ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 มิลลิลิตร ของ 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) ที่ละลายอยู่ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 และสารละลายบีตา-ไซโลซิเดสความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงเติม 500 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม (vortex mixer) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานใช้ พาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenyl) ความเข้มข้นในช่วง 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1 หน่วยของบีตา-ไซโลซิเดสเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลาย พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ แล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอลปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้ภาวะที่ทดสอบแอคติวิตี ดังกล่าวข้างต้น

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Layne และคณะ (1957) โดยนำโปรตีนตัวอย่างความเข้มข้นที่เหมาะสมมาตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร

1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 1.55 x ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร - 0.76 x ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์

1. การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนบีตา-ไซโลซิเดส

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ที่บดละเอียดอย่างช้าๆ พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) โดยเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นลำดับส่วนคือ 0-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70 และ 70-80 เปอร์เซนต์ แต่ละลำดับส่วนกวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกส่วนตะกอนและน้ำใสออกจากกัน ด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ของแต่ละลำดับส่วนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ในปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ดังกล่าว หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของไซโลซิเดส

2. การทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนในการตกตะกอนบีตา-ไซโลซิเดส พร้อมทั้งกวนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) กวนสารแขวนลอยเอนไซม์ประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกส่วนตะกอนและน้ำใสออกจากกัน ด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ผสม 2 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอลในปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายตะกอนได้หมด ไดอะไลส์ข้ามคืนใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ผสม 5 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอล ครั้งสุดท้ายไดอะไลส์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่ผสม 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอลและ 50 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของไซโลซิเดส

3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.1 ความเข้มข้นและชนิดของเกลือต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

นำบีตา-ไซโลซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 2 ปริมาณเท่าๆกัน มาผสมกับซับสเตรทและแปรโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ นำไปหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสตามวิธีการในหน้า 32

3.2 ผลของเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethylmaleimide) ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

บ่มบีตา-ไซโลซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 2 ปริมาณเท่าๆกัน ในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-40 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่เหลืออยู่ตามวิธีการในหน้า 32

3.3 ผลของไดไธโอธริอีทอล (dithiothreitol) ในการกลับคืนแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ ผ่านการบ่มด้วยเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ (N-ethylmaleimide)

บ่มบีตา-ไซโลซิเดสที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อ 2 ปริมาณเท่าๆกัน ในเอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 และ 25 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเติมไดไธโอธริอีทอล ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0-30 มิลลิโมลาร์และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 15 นาที นำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่เหลืออยู่ตามวิธีการในหน้า 32 โดยมีบีตา-ไซโลซิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มใน เอ็น-เอธิลมาลีอิไมด์และไดไธโอธริอีทอลเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.4 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส

เทสารแขวนลอยดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส ลงในน้ำกลั่น ปล่อยให้เจลนอนก้น เทส่วนน้ำใสพร้อมกับเจลละเอียดทิ้งทำเช่นนี้หลายๆครั้ง ครั้งสุดท้ายแช่ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 นำเจลไปกำจัดฟองอากาศออกโดยการดูดอากาศออกประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.6 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ปริมาตร 85 มิลลิลิตร ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอล ลงในคอลัมน์ ปริมาตร 2-3 เท่าของปริมาตรเจล ที่อัตราการไหล 48 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อิ่มตัว 40-80 เปอร์เซนต์ ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนที่ไม่ถูกจับกับดีอีเออี-ไบโอเจล อกาโรส ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ติดตามโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าใกล้ศูนย์ จึงชะโปรตีนที่ถูกจับด้วยเจลออกโดยใช้ 0-500 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์เกรเดียนท์ใน 50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอล เก็บลำดับส่วนละ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีในแต่ละลำดับส่วนภายหลังจากการไดอะไลส์เพื่อกำจัดโพแทสเซียม คลอไรด์ออกแล้ว จากนั้นรวบรวมลำดับส่วนที่มีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสสูงเข้าด้วยกัน กำจัดเกลือและทำให้เข้มข้นโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) วัดปริมาตรของสารละลายที่ได้ แอคติวิตีและปริมาณโปรตีน

3.5 การทำให้บีตา-ไซโลซิเดสบริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-200 ในน้ำกลั่นปริมาตรมากเกินพอ นำไปต้มในอ่างน้ำ ปรับอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น เทส่วนน้ำใส พร้อมเจลละเอียดทิ้ง ทำเช่นนี้หลายๆครั้ง ครั้งสุดท้ายแช่ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 50 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ ผสมอยู่ นำเจลไปดูดอากาศออกประมาณ 20-30 นาที แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.6 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ผ่านสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 50 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์และ 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอล ผสมอยู่ลงในคอลัมน์ประมาณ 3 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำบีตา-ไซโลซิเดสที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอเจล-อกาโรส และทำให้เข้มข้นโดยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน มาใส่ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนด้วย 100

I17046294

มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 50 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมคลอไรด์ และ 10 มิลลิโมลาร์ ไดไธโอธริอีทอล ผสมอยู่ด้วยอัตราเร็ว 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บลำดับส่วนละ 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสสูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตร แอคติวิตี และปริมาณโปรตีน

การศึกษาสมบัติของบีตา-ไซโลซิเดสจาก *Streptomyces* sp.43-4

1. ความจำเพาะของบีตา-ไซโลซิเดสต่อ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์

นำบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกันมาผสมกับซับสเตรท พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside) หรือ ออร์โธ-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ (*o*-nitrophenyl β-D-xylopyranoside)ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ ซับสเตรทขณะทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0-15 มิลลิโมลาร์และ0-20 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ นำไปหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส ตามวิธีการในหน้า 32

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

วิเคราะห์แอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในปริมาณเท่าๆกัน ตามวิธีการในหน้า 32 ยกเว้นแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 30-70 องศาเซลเซียส

3. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

หาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วตามวิธีการในหน้า 32 ยกเว้นแปรผันความเป็นกรดด่างของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำงานความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ให้อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างต่างๆ ดังนี้

อะซิเตท บัฟเฟอร์ (acetate buffer) ในช่วง pH 4.0-6.5

ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ในช่วง pH 6.0-8.5

ทริส ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-hydrochloride) ในช่วง pH 8.0-9.0

4. ความเข้มข้นของอะซิเตท บัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 6.5 ที่เหมาะสมในการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

หาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วตามวิธีการในหน้า 32 ยกเว้นแปรผันความเข้มข้นของอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 6.5 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในสารผสมปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 20-200 มิลลิโมลาร์

5. ผลของไซโลส(xylose) ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

ผสมบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในปริมาณเท่าๆกัน กับ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆดังระบุในผลการทดลองและเติมไซโลสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไซโลส อยู่ในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสตามวิธีการในหน้า 32

6. ผลของอะราบิโนส (arabinose) ในการยับยั้งการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

ผสมบีตา-ไซโลซิเดสในปริมาณเท่าๆกัน กับ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆดังระบุในผลการทดลองและเติมอะราบิโนสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของอะราบิโนสอยู่ในช่วง 0-500 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดส ตามวิธีการในหน้า 32

7. ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของบีตา-ไซโลซิเดส

ใช้บีตา-ไซโลซิเดสในปริมาณเท่าๆกัน บมกับซับสเตรทคือ พารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของซับสเตรทขณะทำปฏิกิริยาเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ และมีเกลือแร่ความเข้มข้น 10^{-2} - 10^{-6} โมลาร์ ชนิดต่างๆ ดังนี้

ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$)

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)

โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

แคลเซียมซัลเฟต ($CaCl_2.2H_2O$)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)

สแตนนัสคลอไรด์ ($SnCl_2.2H_2O$)

ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$)

นิเกิลคลอไรด์ ($NiCl_2.2H_2O$)

โดยมีบีตา-ไซโลซิเดสในปฏิกิริยาที่ไม่เติมเกลือแร่เป็นตัวเปรียบเทียบ

8. ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่ออุณหภูมิ

บ่มบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน 100 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ (acetate buffer) pH 6.5 ที่อุณหภูมิในช่วง 30-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในหน้า 32 และมีบีตา-ไซโลซิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

9. ความเสถียรของบีตา-ไซโลซิเดสต่อความเป็นกรดด่าง

บ่มบีตา-ไซโลซิเดสที่ pH 4.0-9.0 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ดังระบุในข้อ 3 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหาแอคติวิตีของบีตา-ไซโลซิเดสที่เหลืออยู่ ตามวิธีการในหน้า 32 โดยมีบีตา-ไซโลซิเดสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

1. การทำโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่ง (disc polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีของ Williams และ Reisfeld (1964)

บรรจุสารละลายผสม 7 เปอร์เซนต์ เซพาเรติงเจล (seperating gel) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.9) ในหลอดแก้วขนาด 0.5 x 8 เซ็นติเมตร ให้มีความสูง 6.5 เซนติเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ปิดทับหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นให้มีความสูงประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เพื่อให้หน้าเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้ว ซับน้ำที่ผิวหน้าเจลให้แห้ง เทสาร

ละลายผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.10) ให้มีความสูง 0.5 เซ็นติเมตร ปิดทับหน้าเจลด้วยน้ำ ตั้งทิ้งไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ จนกระทั่งเจลแข็งตัว ซับน้ำที่ผิวหน้าให้แห้ง จากนั้นนำหลอดแก้วที่มีเจลอยู่ บรรจุเข้ากับชุดทำอิเลคโตรโฟริซิส เตรียมสารละลายโปรตีนที่จะทดสอบโดยผสมกับสารละลาย 0.005 เปอร์เซนต์ บรอมฟีนอล บลู ใน 50 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดตัวอย่างที่จะทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ซึ่งเตรียมดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 1) ลงบนผิวหน้าเจล แล้วทำอิเลคโตรโฟริซิสในบัฟเฟอร์ ทริส-ไกลซีน pH 9.5 (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.8) ผ่านกระแสไฟฟ้า 5.0 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจล จนกระทั่งสีของ บรอมฟีนอล บลู เคลื่อนลงมาเกือบถึงปลายสุดของเจล นำเจลออกจากแท่งแก้วจากนั้นนำเจล แช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.11) นาน 30 นาที แล้วจึงล้างสีส่วนที่เกินออกโดยใช้น้ำยาล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ข หมายเลข 1.12) หลายๆ ครั้งจนเห็นแถบสีโปรตีนชัดเจน สำหรับการย้อมสีเพื่อตรวจสอบแถบโปรตีนของบีตา-ไซโลซิเดส โดยการนำเจลออก จากแท่งแก้ว แล้วนำมาแช่ในพารา-ไนโตรฟีนิล บีตา-ดี-ไซโลไพรา-โนไซด์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตรวจสอบแถบสีของพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น นำมาคำนวณหาค่า Rf จากสูตร

$$Rf = \text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่} / \text{ระยะทางที่สีเคลื่อนที่}$$

2. <u>การทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u> (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ตามวิธีการของ Laemmli (1970)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 7.3 x 10.3 เซนติเมตรและ 8.3 x 10.3 เซนติเมตร เข้าด้วยกัน โดยให้มีแผ่นพลาสติก (spacer) หนา 2 มิลลิเมตร ที่ขอบด้านข้างทั้ง 2 ข้าง ประกอบเข้ากับชุดหล่อเจลเทสารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (seperating gel) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.8) ลงในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูง 0.5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว ซับน้ำออกแล้ววางแผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้ว เทสารผสมสแตกกิงเจล (stacking gel) (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.9) ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเจลแข็งตัว ดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดทำอิเลคโตรโฟริซีส เติมอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงในชุดทำอิเลคโตรโฟริซิสจนเต็ม นำโปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐาน ละลายในบัฟเฟอร์สำหรับโปรตีนที่จะใช้วิเคราะห์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.6) ต้มให้

เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นหยอดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร (เตรียมดังแสดงในภาคผนวก ค หมายเลข 2) ลงในช่องใส่ตัวอย่างในช่องใส่ตัวอย่างในแผ่นเจลทำการอิเลคโตรโฟริซิสที่ 60 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีของ บรอมฟีนอล บลู เคลื่อนมาถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำเจลออกจากแผ่นแก้วและแช่ในน้ำยาย้อมสี (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.10) เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลายล้างสี (ภาคผนวก ข หมายเลข 2.11) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

<u>การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดส</u>

1. <u>การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสโดยการทำเจลฟิลเตรชันผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200</u>

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานได้แก่ คะตะเลส น้ำหนักโมเลกุล 240,000 ดาลตัน โบวีน ซีรัม อัลบูมิน น้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดาลตัน และ ไซโตโครม ซี น้ำหนักโมเลกุล 12,000 ดาลตัน ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-200 ในภาวะเดียวกับที่ใช้ทำบีตา-ไซโลซิเดสให้บริสุทธิ์ นำแต่ละลำดับส่วนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 410 นาโนเมตร ตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลส โดยพิจารณาจากความสามารถในการย่อยสลายไฮโดรเจนเจนเปอร์ออกไซด์ นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับปริมาตรของบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะคอลัมน์

2. <u>การหาน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสโดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u>

โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสของสารละลายบีตา-ไซโลซิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ภาวะเดียวกับการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ประมาณน้ำหนักโมเลกุลของบีตา-ไซโลซิเดสโดยพิจารณาการเคลื่อนที่ของบีตา-ไซโลซิเดสเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน