หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 การเก็บเชื้อระยะสั้น

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

3.1.2 การเก็บเชื้อระยะยาว

ผสมเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB ในระยะการเจริญเติบโตช่วง log phase กับกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เก็บในขวดจุกเกลียวที่อุณหภูมิ -70°ซ วิธีนี้สามารถเก็บได้เป็นปี

3.2 การเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย crude enzyme (จิโรจน์กุลกิจ, 2532)

3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

017901

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

3.2.2 <u>การเตรียมเชื้อตั้งต้น</u>(Starter inoculum)

เขี่ยเชื้อในอาหารวุ้น (NA slant) 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 30 °ซ จากนั้นนำมาเขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 °ซ จนวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.3-0.5 หน่วย

3.2.3 <u>การเตรียม crude เอนไซม์เพื่อไปทำให้บริสุทธิ์</u>

ถ่ายเชื้อตั้งต้นในข้อ 3.2.2 ปริมาณ 10% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำในขวดชมพู่ขนาด 1 ลิตรจำนวน 4 ขวด (ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อขวดละ 375 มล.) นำมาเขย่าที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 24 ชม. นำไปปั่นที่ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที ที่ 4 °ซ นาน 30 นาที แยกเก็บส่วนน้ำใส นำมาเติมแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมล/ลิตรและปรับ pH เป็น 7 ด้วย 2.5 โมล/ลิตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ เรียกสารละลายนี้ว่า crude enzyme นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7 °ซ เพื่อจะนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.3 <u>การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Richardson และ Te Whaiti, 1978)

3.3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับหาเอนไซม์แอคติวิตี

สารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 7.6

ละลายทริส (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 ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.6

สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (10 เปอร์เซนต์)

ละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 100 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

3.3.2 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส

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 ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.6 ที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 10 เปอร์เซนต์กรดไตรคลอโรอะซีติก 2 มล. นำไปปั่น 3500 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเพปไทด์หรือกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ 45 °ซ ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทำการทดลอง โดยเปรียบเทียบเป็นไมโครโมลของไทโรซีน

3.4 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

3.4.1 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน

สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

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

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน(2มก./มล.)

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

3.4.2 วิธีการวัดปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล.ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มล.เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีน 0-10 ไมโครกรัม

3.5 ขั้นตอนการทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เริ่มจาก crude enzyme ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3

3.5.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตชิ่งบดละเอียดลงใน crude enzyme อย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆจนสารละลายมีความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 0-40 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นคนต่อไปอีก 30 นาที นำไปปั่นเก็บตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยความเร็ว 7,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนน้ำใสไปเติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัว 40-70เปอร์เซนต์ นำไปคนต่อที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 ชม.จึงนำไปปั่นเก็บตะกอนด้วยความเร็วและเวลาเท่าเดิม ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 วัดปริมาตรสารละลายหาปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของโปรตีเอส

3.5.2 การขจัดเกลือออกจาก crude enzyme โดยวิธีไดอะไลซีส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจากข้อ3.5.1 บรรจุลงในถุงไดอะไลซีส นำไปไดอะไลซ์ในอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ปริมาตร 2 ลิตร ทำ 2 ครั้งเป็นเวลา 4 และ 10 ชั่วโมงตามลำดับ หลังจากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายมาวัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของโปรตีเอส

3.5.3 การทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลส (CM-cellulose)

การเตรียมคอลัมน์

แช่ซีเอ็ม-เซลลูโลส เรซิน 15 กรัมในสารละลาย 0.2 โมล/ลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 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 20 เซนติเมตร ผ่านอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ลงในคอลัมน์จนเรซินอยู่ในสภาพสมดุลย์ วัด pH ของสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์จนกระทั่งได้ pH 6.5

การใช้คอลัมน์

ใส่สารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.5.2 ปริมาตรประมาณ 40 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

การวัดปริมาณโซเดียมไอออน (Na^+)

วัดปริมาณโซเดียมไอออน ในสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลังจากชะด้วย Linear salt gradient ด้วยเครื่อง BECKMAN System E4A™

3.5.4 การทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยเซฟาเดกซ์ จี-75 เจลฟิลเตรชันคอลัมน์ (Sephadex G-75 Gel filtration)

การเตรียมคอลัมน์

แช่เซฟาเด็กซ์ จี-75 ปริมาณ 25 กรัมใน 10 มิลลิโมล/ลิตร อิมิดาโซล บัฟเฟอร์ที่มี pH 6.5 ปริมาตร 1 ลิตร นำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.7 X 90 เซ็นติเมตรให้ได้เจลสูง 85 เซ็นติเมตร ผ่านสารละลายอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 อีกประมาณ 15 ชั่วโมง ด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชั่วโมงเพื่อให้เม็ดเจลเรียงตัวอยู่ในสภาพสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเด็กซ์แทรน 2 มก./มล.และโปแตสเซียมไดโครเมท 1 มก./มล.

การใช้คอลัมน์

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3.5.3 ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยกรองผ่าน Amicon YM-10 membrane ด้วยเครื่องอุลตร้าฟิลเตรชันภายใต้ความดันของก๊าซไนโตรเจน 2 กก./ตารางนิ้ว ให้เหลือปริมาตร 3 มล. ผ่านลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-75 ชะออกด้วยอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 มล. นำแต่ละหลอดมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

หมายเหตุ: ในสารละลายอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ที่ใช้ทุกขั้นตอน มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมล/ลิตร pH 6.5 และมีสารช่วยให้เอนไซม์เสถียร คือ 2 มิลลิโมล/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ผสมอยู่

3.6 วิธีแยกโปรตีนด้วยโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (ตามวิธีของ Davis, 1964)

3.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส

สารละลายอะไครลาไมด์ (28 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์, 0.74 เปอร์เซนต์บิส-อะไครลาไมด์)

นำอะไครลาไมด์ 28 กรัมและบิส-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

สารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3

ละลายทริส 0.6 กรัม และไกลซีน 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 8.9 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

3.6.2 การเตรียมโพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแท่ง

เตรียมเจลโดยผสมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์-TEMED บัฟเฟอร์ pH 8.9 ปริมาณ 5 มล. สารละลาย 28 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์ 10 มล. และน้ำกลั่น 25 มล. ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 10 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

300 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆแล้วนำมาบรรจุในหลอดแก้วขนาด 0.50 x 11 ซม. ที่ปิดปลายข้างหนึ่งด้วยพาราฟิล์มจนสารละลายในหลอดแก้วมีความสูง 10 ซม. ค่อยๆหยอดน้ำกลั่นลงบนผิวเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจนจึงเทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล

3.6.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ไดอะไลส์ในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.9 แล้วทำให้เข้มข้นขึ้น ด้วยเครื่องอุลตร้าฟิลเตรชั่นเหมือนในข้อ 3.5.4 บางกรณีต้องกรองผ่านหลอด YM-10 Microconcentrator โดยการปั่นจนมีปริมาตรประมาณ 1.0 มล. อีกขั้นตอนหนึ่งเพื่อทำให้เอนไซม์เข้มข้นมากขึ้น

3.6.4 การทำอิเลคโตรโฟริซีส

บรรจุแท่งเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3 ลงในอ่างบัฟเฟอร์ทั้งบนและล่างจนท่วมปลายแท่งเจลทั้งสองข้าง ปรับอุณหภูมิของอ่างบัฟเฟอร์ให้ได้ 4 °ซ นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมในข้อ 3.6.3 ไปหยอดลงบนผิวหน้าเจล (ปริมาณโปรตีนต่อเจลประมาณ 10-100 ไมโครกรัม และปริมาตรที่หยอดประมาณ 10-100 ไมโครลิตร) แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 3 มิลลิแอมแปร์/เจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนลงไปจนถึงระยะอีก 1 เซนติเมตรจากปลายล่างของแท่งเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

3.6.5 วิธีย้อมสีโปรตีนในแท่งโพลีอะไครลาไมด์เจล

แกะเจลจากหลอดแก้วแล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีนทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชม. จากนั้นนำแท่งเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน จนกระทั่งเจลใสและได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน เก็บเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

3.7 การศึกษาสมบัติของนิวทรัลโปรตีเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

3.7.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเด็กซ์ จี-75)

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน, Ovalbumin น้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดาลตัน, นิวทรัลโปรตีเอส

(Thermolysin) น้ำหนักโมเลกุล 34,000 ดาลตัน และ Myoglobin น้ำหนักโมเลกุล 17,500 ดาลตัน ในปริมาณ 2 มก./มล. ลงในคอลัมน์ทีละตัว (ใช้คอลัมน์เดียวกับการทดลองในข้อ 3.5.4) ชะด้วยอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 0.2 โมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ เก็บสารละลายซึ่งแยกได้จากคอลัมน์หลอดละ 1.5 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) วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโปแตสเซี่ยมไดโครเมทผ่านออกจากคอลัมน์

หลังจากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส ที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในคอลัมน์ แล้วหา elution volume ของเอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตี คำนวนค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3.7.2 <u>การหาน้ำหนักโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์ โดยวิธี เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)</u> (ตามวิธีของ Laemmli, 1970)

<u>การเตรียมสารละลายสำหรับเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตโฟรีซีส</u>

<u>สารละลายอะไครลาไมด์</u> (30 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์, 0.8 เปอร์เซนต์ BIS)

นำอะไครลาไมด์ 30 กรัม และ BIS 0.8 กรัมมาละลายน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

สารละลายทริส-เอสดีเอส pH 8.8

ชั่งทริส 11.82 กรัม SDS 0.2 กรัมละลายในน้ำกลั่น 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 อิเลคโทรดบัฟเฟอร์ 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.

สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง

ผสมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ pH 6.8 กับ 1เปอเซนต์ SDS และ 1เปอร์เซนต์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล

การเตรียมเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล ชนิดแผ่น

เตรียม resolving gel โดยผสมสารละลาย ทริส-เอสดีเอส pH 8.8 ปริมาตร 15 มล.สารละลาย 30 เปอร์เซนต์อะไครลาไมด์ 9.9 มล.น้ำกลั่น 5.1 มล.TEMED 9ไมโครลิตรและแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.75 มล. และเตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายทริส-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 Thermolysin น้ำหนักโมเลกุล 34,000 ดาลตัน Chymotrypsinogen A น้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน และ Cytochrome-C น้ำหนักโมเลกุล 12,270 ดาลตัน เตรียมโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ให้มีความเข้มข้นอย่างละ 1 มก./มล.

การเตรียมสารละลายโปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องการวิเคราะห์

ผสมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่าง ข้อ 3.7.2 กับสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์ อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:1 ในหลอดขนาดเล็ก (ความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ในช่วง 0.5-1.0 มก./มล.) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

ทำในทำนองเดียวกันกับข้อ 3.6.4 แต่เปลี่ยนสารละลายทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ข้อ 3.6.1 เป็นสารละลายทริส-ไกลซีน อีเลคโทรด บัฟเฟอร์ข้อ 3.7.2 เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าที่ผ่านเจลเป็น 30 มิลลิแอมแปร์/แผ่นเจล และปริมาณโปรตีนที่ใช้ 1-20 ไมโครกรัม/หลุม

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

ทำได้โดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ และระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วคำนวณหา mobility ดังนี้

Mobility = ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่ / ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่

คำนวณค่า mobility ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน

3.7.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสตามวิธีในข้อ 3.3.2 โดยอินคิวเบตสารละลายเอนไซม์กับสับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 4.5 - 5.5 (0.2 โมล/ลิตรอะซีเตทบัฟเฟอร์), 5.5-7.5 (0.2 โมล/ลิตรคาโคไดเลตบัฟเฟอร์), 7.0-9.0 (0.2 โมล/ลิตรทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์) และ 9.0-10.0 (0.2โมล/ลิตรคาร์บอเนตบัฟเฟอร์)

3.7.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.3.2 ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 25-70 องศาเซลเซียส

3.7.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์

โดยการนำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส (ความเข้มข้น 0.06 มก./มล.) ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 °ซ เป็นเวลา 1, 2, 5, 9, 15, 30 และ 60 วัน แล้วจึงนำมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ

3.7.6 การศึกษาผลของโปรตีนสับสเตรทต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามข้อ 3.3.2 โดยศึกษาผลของการใช้โปรตีนสับสเตรทชนิดอื่นเทียบกับเคซีน สับสเตรทแต่ละชนิดเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ และหาค่า K_m และ V_{max} ของสับสเตรทแต่ละชนิดโดยอาศัยการพลอตแบบ Lineweaver Burk plot

3.7.7 การศึกษาผลของสับสเตรทเอสเทอร์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้ N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester (BTEE) เป็นสับสเตรท

อินคิวเบตสารละลาย BTEE 1.0 มล. (ความเข้มข้น 0.2-0.6 มิลลิโมล/ลิตร ใน 0.1 โมล/ลิตร ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.0, 10 เปอร์เซนต์เอทานอล) 5 นาที ที่ 45 °ซ ใน 10 มม. ควอทซ์คิวเวตในเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (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

3.7.8 การศึกษาผลของไอออนของโลหะ และตัวยับยั้งโปรตีเอส

การศึกษาผลของไอออนของโลหะ

อินคิวเบตสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล. กับ 0.2 โมล/ลิตรทริสบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 0.9 มล. ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารชนิดหนึ่งชนิดใดต่อไปนี้ คือ $MgCl_2 .6H_2O$, $CaCl_2 .2H_2O$, $MnCl_2 .4H_2O$, $ZnCl_2$, $FeCl_2$ หรือ $CoCl_2.6H_2O$ อย่างละ 1 มิลลิโมล/ลิตร เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 45 °ซ นำไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.3.2

การศึกษาผลของตัวยับยั้งโปรตีเอส

อินคิวเบตสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล. กับ 0.2 โมล/ลิตรทริสบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 0.9 มล. ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารต่อไปนี้อยู่ในระหว่าง 1-10 มิลลิโมล/ลิตร คือ PMSF, 1,10 Phenanthroline, p-Chloromercuribenzoic acid, EDTA, Iodoacetamide และ N-Ethylmaleimide เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 45°ซ นำไปหาแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.3.2

3.7.9 การศึกษาความสำคัญของ Zn^{++} ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

การหาปริมาณ Zn^{++} และความสัมพันธ์กับแอคติวิตีของเอนไซม์

หาปริมาณของ Zn^{++} ในโมเลกุล โดยนำสารละลายเอนไซม์มาต้มกับกรดไนตริกที่เข้มข้น ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร จนสารละลายระเหยหมด นำมาละลายใหม่ในอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ให้มีปริมาตรเท่าเดิม หลังจากนั้นจึงส่งตัวอย่างไปหาปริมาณของ Zn^{++} ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิธี Atomic absorption spectrophotometry และศึกษาความสำคัญของ Zn^{++} ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยไดอะไลส์เอนไซม์ในอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมลาร์ แล้วตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลือและปริมาณของ Zn^{++} ในเอนไซม์ หลังจากนั้นนำไปไดอะไลส์ในบัฟเฟอร์เดิมที่ไม่มี EDTA หรือในบัฟเฟอร์ที่มีปริมาณ Zn^{++} ที่ความเข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปตรวจสอบแอคติวิตีและปริมาณ Zn^{++} อีกครั้ง ในทุกขั้นตอนของการไดอะไลส์ ทำ 2 ครั้ง โดยใช้เวลา 4 และ 6 ชม. ตามลำดับ

การแทนที่ Zn^{++} ด้วยไดวาเลนท์ไอออนชนิดอื่น

นำสารละลายเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 0.06 มก./มล. อินคิวเบตกับ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ที่ 4°ซ เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดแอคติวิตีที่ถูก inactivate แล้วเติมไดวาเลนท์ไอออนชนิดต่างๆ คือ Ca^{++}, Co^{++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Fe^{++} และ Zn^{++} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรที่ทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์เจือจางลง 20 เท่า อินคิวเบตที่ 4°ซ เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดแอคติวิตีอีกครั้ง

3.7.10 การหาความจำเพาะของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสต่อเปปไทด์สังเคราะห์

การศึกษาผลของการไฮโดรไลส์เปปไทด์สังเคราะห์ที่มีสี (chromogenic peptide substrate) โดยวิธีไคเนติคส์

อินคิวเบตเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีสีความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมล/ลิตรใน 0.1 โมล/ลิตร ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.0 และ 10 เปอร์เซนต์ Dimethylsulfoxide ในคิวเวตของเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ปรับอุณหภูมิได้ที่ 50 °ซ นาน 5 นาที เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายเอนไซม์ (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล/ลิตร) วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรเป็นเวลา 5 นาทีโดย recorder

การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อเปปไทด์สังเคราะห์โดยเทคนิค 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

การเตรียมสารละลายนินไฮดริน(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

การเตรียมสารตัวอย่าง

ละลายเปปไทด์สังเคราะห์ที่เข้มข้น 2 มิลลิโมล/ลิตร ใน 0.05 โมล/ลิตร ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.0 เติม Dimethyl formamide ในเปปไทด์สังเคราะห์ที่ไม่มีสี

Dimethylsulfoxide ในเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีสี โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 เปอร์เซนต์ นำไปอินคิวเบตที่ 37 °ซ นาน 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มล.(ความเข้มข้น 40 ไมโครโมล/ลิตร) อินคิวเบตอีก 9 ชม.ที่ 37 °ซ หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วนำไปเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 5 เท่า จากนั้นนำไปจุด(spot)ลงบนแผ่น TLC ที่เตรียมไว้

การ run TLC

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

การตรวจวัดผลการ run TLC

การ spray

นำแผ่น TLC ออกจากแทงค์ ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำมาอบที่ 110 °ซ เป็นเวลา 10 นาที นำไปสเปรย์ในตู้ดูดควันด้วย ninhydrin reagent นำไปอบที่ 110 °ซ อีกวาดจุดที่เกิดขึ้น

การหาค่า R_f

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

R_f = ระยะทางที่กรดอะมิโนหรือสายเปปไทด์เคลื่อนที่ / ระยะทางที่ solvent front เคลื่อนที่