บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

Beef Extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
NaCl	2	กรัม
Yeast Extract	2	กรัม
Soluble starch	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำอาหารทั้งหมดผสมเข้าด้วยกันกับน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งจะเติม Bacto-Agar 15 กรัมต่อลิตร ก่อนนำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อ

3.1.2 <u>อาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi</u> (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1971; อุไรวรรณ รัชธร, 2536) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งข้าวเจ้า	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
Na_2CO_3	7.5	กรัม

ปรับ pH ของอาหารให้เท่ากับ 10.1 ด้วยสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซม์ 1.0 โมลาร์ อบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2 <u>การเลี้ยงเชื้อ</u>

3.2.1 <u>การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter Innoculation)</u>

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่เก็บโดยวิธี Lyophilized 1 ลูป (Loop) ลงบน Agar plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเข้าช่วงทวีคูณ

(Log phase) คือวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 0.3-0.5 หน่วย ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

3.2.2 การปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลิต CGTase ในปริมาณสูง

ทดลองใช้แป้งที่มีลักษณะโครงสร้างและความยาวของโมเลกุลแตกต่างกัน เช่น แป้งข้าวเจ้า, อะไมโลส, อะไมโลเพคติน, Dextrin type II และ Dextrin type III เป็นแหล่งคันตอคาร์บอนแทน Soluble starch ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I ที่ประกอบด้วยแป้งชนิดต่างๆ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที แยกส่วนน้ำใสคือสารละลายเอนไซม์ ไปวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีน

3.3 การเก็บรักษา

3.3.1 การเก็บรักษาระยะสั้น

เก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I ชนิดแข็ง ซึ่งบรรจุในหลอดแก้วยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ในลักษณะลาดเอียงโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนี จาก Agar plate ไป streak บน Slant agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเข้าช่วงทวีคูณ (Log phase) ปิดฝาจุกให้แน่นแล้วพันด้วยพาราฟิลม์ (Laboratory sealing film) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 1 เดือน เมื่อต้องการใช้เชื้อในการทดลอง จะนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวต่อไป

3.3.2 การเก็บรักษาระยะยาว

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I ชนิดเหลว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเข้าช่วงทวีคูณ (Log phase) แล้วเก็บเชื้อไว้ในขวดขนาด 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุด้วยกลีเซอรอลที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 เปอร์เซนต์ เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาขวดให้แน่น แล้วพันด้วยพาราฟิลม์ (Laboratory sealing film) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 1 ปี

3.4 การเตรียมสารละลาย

3.4.1 สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของ CGTase

3.4.1.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0

ละลายโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 2.27 กรัม และไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.58 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.4.1.2 สารละลายไอโอดีน (Iodine Reagent)

ละลายไอโอดีน 0.2 กรัม และโปตัสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เมื่อต้องการใช้ ให้เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10

3.4.1.3 สารละลายแป้งมาตรฐาน 0.2 และ 2.0 เปอร์เซนต์

ละลายแป้งมันสำปะหลัง (Potato soluble starch) 0.2 หรือ 2.0 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที

3.4.2 <u>สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน</u>

3.4.2.1 สารละลายโปรตีน (Protein Reagent)

ประกอบด้วย คูแมสซี บริลเลียนท์ บลู (Coomassie Brilliant Blue) 100 มิลลิกรัม เอธานอล 95 เปอร์เซนต์ 50 มิลลิลิตร และ กรดฟอสฟอริก 85 เปอร์เซนต์ (w/v) 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเก็บไว้ในขวดสีชา

3.4.2.2 สารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน

ละลาย α-,β-,γ-Cyclodextrins (CD) มาตรฐานชนิดละ 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

3.4.3 <u>สารละลายสำหรับการทำ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน</u>

3.4.3.1 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเทน 1.21 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 1.47 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ ให้เป็น 8.5 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3.4.3.2 สารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 6.0

ละลายโซเดียมอะซิเตท 4.1 กรัม และแคลเซียมคลอไรด์ 0.74 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วยกรดแอซีติก แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.4.4 <u>สารละลายสำหรับการทำดิสค์โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟริซีส แบบไม่เสียสภาพ (Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)</u>

3.4.4.1 สารละลายอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (Tris-glycine electrode buffer, pH 8.3)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเทน 3 กรัม และไกลซีน 14.4 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3.4.4.2 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-choride buffer stock solution, pH 8.8)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเทน 18.2 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.4.4.3 สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-choride buffer stock solution, pH 6.8)

ละลายทริส (ไฮดรอกซีเมทธิล)-อะมิโนมีเทน 5.98 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.4.4.4 สารละลายอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซนต์ (Resolving gel acrylamide stock solution)

ชั่งอะคริลาไมด์ 30 กรัม และ บิส-อะคริลาไมด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองแล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานไม่เกิน 2 สัปดาห์

3.4.4.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.4.4.6 บัฟเฟอร์สำหรับสารตัวอย่าง (5x Sample Buffer)

ผสมทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ pH 6.8 3.1 มิลลิลิตร โบรโมฟีนอลบลู 1 เปอร์เซนต์ 0.5 มิลลิลิตร และกลีเซอรอล 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3.4.4.7 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining Solution)

ละลายคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู (Coomassie Brilliant Blue R 250) 1 กรัม ในเมธานอล 450 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วเก็บในขวดสีชา

3.4.4.8 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining Solution)

ผสมเมธานอล 100 มิลลิลิตร และกรดอะซิติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร

3.4.5 สารละลายสำหรับการทำไอโซอิเล็กทริค โฟคัสซิง โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟริซิส (Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel ; IEF)

3.4.5.1 การเตรียมสารละลายเจล

สารละลายอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซนต์ ชั่งอะคริลาไมด์ 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้เป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายบิส-อะคริลาไมด์ 0.8 เปอร์เซนต์ ชั่ง บิส-อะคริลาไมด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้เป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายซูโครส 50 เปอร์เซนต์ ชั่งน้ำตาลซูโครส 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้เป็นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ให้เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.4.5.2 น้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining Solution)

ละลายคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู (Coomassie Brilliant Blue R 250) 0.04 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ในกรดอะซิติก (acetic acid) 10 มิลลิลิตร เอธานอล (ethano) 27 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วเก็บในขวดสีชา

3.4.5.3 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining Solution)

ผสมเอธานอล 12 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก 7 มิลลิลิตร คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

3.4.6 สารละลายสำหรับโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง(Thin-LayerChromatography; TLC)

3.4.6.1 การเตรียม Microcrystalline Cellulose

ชั่ง Microcrystalline Cellulose 10 กรัม กับน้ำกลั่น 43 มิลลิลิตร ในขวดทรงกรวยที่มีฝาปิด (Stoppered conical flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ให้เข้ากัน เป็นเวลา 40 วินาที แล้วนำไปเคลือบบนแผ่นแก้วทันที

3.4.6.2 สารละลาย Methanolic Iodine 1 เปอร์เซนต์

สารละลายไอโอดีน 1 กรัม ในเมธานอล 100 มิลลิลิตร

3.4.6.3 สารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐาน

ละลาย α-,β-,γ-Cyclodextrins มาตรฐานชนิดละ 1 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

3.5 การวัดแอคติวิตีของ CGTase

3.5.1 Dextrinizing Activity (Iodine Method)

ดัดแปลงจากวิธีของ Fuwa (1954)

เติมสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน 0.2% สารละลายแป้งมันสำปะหลัง ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex genie) แล้วเติม Iodine reagent 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

หลอดควบคุม (Control) ให้ใส่เอนไซม์ภายหลังการเติมกรดไฮโดรคลอริก

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Enzyme unit) คือปริมาณเอนไซม์ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินของสารประกอบแป้ง-ไอโอดีนลดลง 10 เปอร์เซนต์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (Specific activity) คือจำนวนหน่วยเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนหนึ่งมิลลิกรัม

3.5.2 Cyclodextrin-Trichloroethylene Assay (CD-TCE Assay)

ดัดแปลงจากวิธีของ Nomoto และคณะ (1986)

เจือจางสารละลายเอนไซม์ในอัตราส่วนต่างๆ (1:2, 1:4, 1:8,.....$1:2^n$) ด้วยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 โดยให้แต่ละหลอดมีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายแป้ง (Soluble starch, potato) ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไตรคลอโรเอธิลีน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12 ชั่วโมง บันทึกผลการเกิดตะกอน Cyclodextrin-Trichloroethylene Complex เป็นค่า dilution limit ($1:2^n$)

กำหนดให้ dilution limit ($1:2^n$) คือ 1:2, 1:4, 1:8,....., $1:2^n$ เป็นค่าที่สารละลายเอนไซม์เจือจางมากที่สุดที่ยังสังเกตุเห็นตะกอนขาวขุ่นที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นแป้งกับสารละลายไตรครอโรเอธิลีนได้

3.6 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำตามวิธีของ Bradford (1976)

3.6.1 Protein Assay (Standard method)

ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 10-100 ไมโครกรัม

นำสารละลายเอนไซม์ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องผสมสาร แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายสีด้วยเครื่อง Spectronic 20 D ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 60 นาที หลังจากเติมสารละลายโปรตีน อ่านค่าโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin Fraction V (ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร; ภาคผนวก 5)

3.6.2 **Micromethod Assay**

ใช้สำหรับวัดปริมาณโปรตีน 1-10 ไมโครกรัม

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน (Protein reagent) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 60 นาที ภายหลังการเติมสารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin fraction V (ความเข้มข้น 0-10 ไมโครกรัมต่อ 0.1 มิลลิลิตร; ภาคผนวก 5)

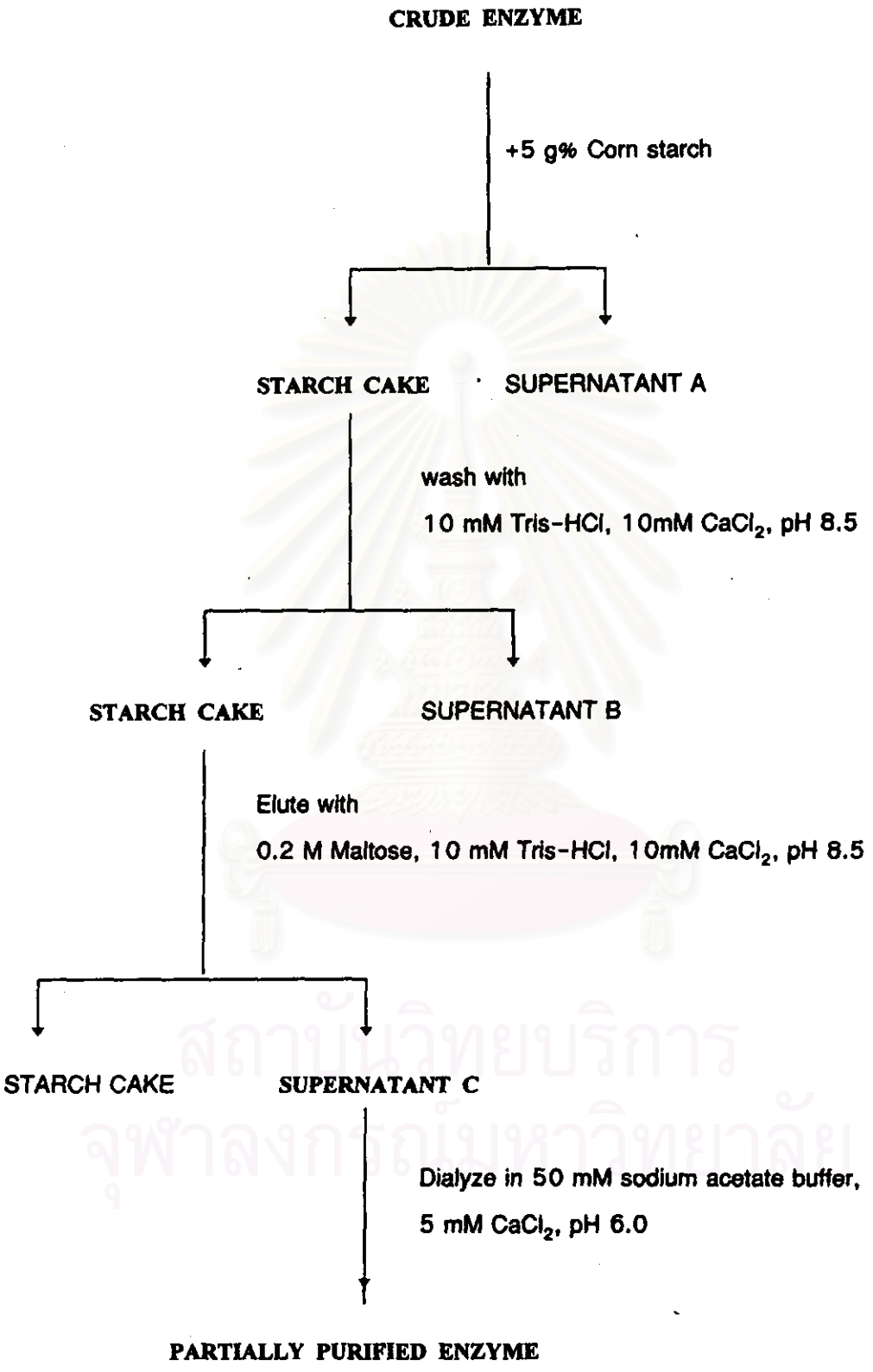
3.7 **การดูดซับโดยแป้ง (Starch Adsorption)**

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ อุไรวรรณ วัชธร (2536) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Kato และ Horikoshi (1984)

นำสารละลายเอนไซม์ (Crude enzyme) มาเติมแป้งขาวโพด (ที่ผ่านการอบในตู้อบอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้องก่อนใช้) 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) คนเบาๆด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ประมาณ 3 ชม. แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนแป้งด้วยเครื่องปั่น Beckmam JA21-C ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนแป้งด้วยทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ 2 ครั้ง หลังจากปั่นแยกตะกอนแป้งแล้ว ชะเอนไซม์ออกจากตะกอนแป้งด้วยการกวนใน 0.2 โมลาร์ มอลโตส ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.5 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที โดยใช้สารละลายมอลโตสปริมาตร 80 มิลลิลิตร ในแต่ละครั้งของการชะ ถ้าเริ่มจาก Crude enzyme ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นแยกตะกอนแป้งออกที่

ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่เก็บได้ไปไดอะไลซ์ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร pH 6.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ลิตร อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง นำส่วนน้ำใสส่วนหนึ่งมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์และหาปริมาณโปรตีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แผนภาพแสดงการทำ CGTase ให้บริสุทธิ์ (Starch adsorption)

3.8 การทำดิสค์โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเล็กโทรโฟรีซิส แบบไม่เสียสภาพ

(Non-denaturing- Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ทำตามวิธีของ Davis (1964)

3.8.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจล 7.5 เปอร์เซนต์

เตรียม Separating gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 6.8 มิลลิลิตร ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.8 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 6.8 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วเติม TEMED 10 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ๆ 100 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นำสารละลายเจลไปบรรจุลงในแม่แบบเจล (Gel mould) ซึ่งเป็นแผ่นแก้วสี่เหลี่ยมขนาด 16 X 18 เซนติเมตรวางขนานห่างกัน 1.5 มิลลิเมตร จนกระทั่งสารละลายมีความสูงประมาณ 6 เซนติเมตร (ห่างจากขอบบน 2.3 เซนติเมตร) ค่อยๆหยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลอย่างรวดเร็วและเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที เมื่อสังเกตเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน แสดงว่าเจลแข็งตัว จึงเทน้ำกลั่นออกจากผิวหน้าเจล

เตรียม Stacking gel โดยผสมสารละลายอะคริลาไมด์ 1.35 มิลลิลิตร ทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 6.8 จำนวน 2.0 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 4.6 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วเติม TEMED 10 ไมโครลิตร และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตที่เตรียมใหม่ๆ 100 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ใส่หวี (Comb) บรรจุลงในแม่แบบเจล (Gel mould) แล้วเท Stacking gel อย่างรวดเร็ว ให้ระดับสารละลายต่ำกว่าขอบบนประมาณ 2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที ให้เกิดโพลีเมอร์ไรเซชั่นอย่างสมบูรณ์ ค่อยๆดึงหวีออก แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

I17212157

3.8.2 <u>การเตรียมสารละลายโปรตีน</u>

นำสารละลายโปรตีน 100 ไมโครลิตร มาเติมกลีเซอรอล (Glycerol) 10 ไมโครลิตร และโบรโมฟีนอล บลู (Bromophenol blue) 4 ไมโครลิตร แล้วหยอดส่วนผสมนี้ลงบนหลุมเจลที่เตรียมไว้ ให้มีปริมาณโปรตีน 1-100 ไมโครกรัม/หลุม

3.8.3 <u>การทำอิเล็กโทรโฟริซิส</u>

บรรจุแผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3 ลงในอ่างบัฟเฟอร์ ให้ท่วมปลายด้านล่างและด้านหลังของแผ่นแจลจนถึงขอบเจลด้านบน หยอดสารละลายโปรตีน (ข้อ 3.8.2) ลงบนหลุมเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่ขนาด 20 มิลลิแอมแปร์ ต่อแผ่นเจลทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนไปอยู่ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร จึงปิดกระแสไฟฟ้า

3.8.4 <u>การติดตามแถบโปรตีน</u>

3.8.4.1 Coomassie blue staining

นำเจลที่ได้จากข้อ 3.8.3 ออกจากแผ่นแก้ว แล้วนำไปแช่ลงในน้ำยาย้อมโปรตีนเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีโปรตีน หลายๆครั้ง จนกระทั่งเจลใส และได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏอยู่อย่างชัดเจน

3.8.4.2 การติดตามเอนไซม์แอคติวิตีในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์ เจล

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Kobayashi และคณะ, 1978

Dextrinizing activity staining

ถ่ายเจลจากข้อ 3.8.3 ออกจากแผ่นแก้ว แล้วนำไปแช่ในสารละลายแป้ง 2.0 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปล้างแป้งส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายไอโอดีน 2.0 เปอร์เซนต์ แถบโปรตีนที่มี CGTase จะปรากฏเป็นแถบใสในแผ่นเจล

Dye staining for cyclodextrin

ทำตามวิธีของทิพย์สุภา มาลัย, (2535) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Park (1989)

นำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่สารละลายแป้ง 2.0 เปอร์เซนต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 6.0 ที่มี Phenolphthalein 0.03 เปอร์เซนต์ และ Methyl orange 0.01 เปอร์เซนต์ แล้วปรับ pH เป็น 10.3 ด้วยสาระลายโซเดียมคาร์บอเนต 1.0 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แถบโปรตีนที่มี CGTase จะปรากฏแถบสีเหลืองในแผ่นเจลที่เป็นสีเหลือง-ส้ม

3.9 การวิเคราะห์ค่า pI ด้วยวิธี ไอโซอิเล็กทริค โฟคัสซิง โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรไฟริซิส (Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel ; IEF)

3.9.1 การเตรียมแผ่น gel support film

นำแผ่นพลาสติก (Gel bond) สำหรับทำ IEF หันด้านที่เป็น Hydrophilic ประกบเข้ากับแผ่นกระจกโดยใช้น้ำหยดเล็กน้อย ไล่ฟองอากาศออกให้หมด แล้วนำไปคว่ำลงบนชุดพลาสติก IEF set (Casting tray)

3.9.2 <u>การเตรียมเจล</u>

ผสม 30 เปอร์เซนต์ อะคริลาไมด์ 0.9 มิลลิลิตร 1.0 เปอร์เซนต์ บิส-อะคริลาไมด์ 1.25 มิลลิลิตร แอมโฟไลท์ pH 5-7 0.243 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 1.39 มิลลิลิตร 50 เปอร์เซนต์ ซูโครส 1.186 มิลลิลิตร TEMED 2 ไมโครลิตร 0.02 M แอมโมเนียม เปอร์ซัลเฟต 39.5 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วใช้ไมโครปิเปต ดูดส่วนผสมไปหยอดช่องว่างระหว่างแผ่นเจลกับ Casting tray จนเต็มแผ่น ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วจึงใช้ Spatula พลิกขึ้นมา เนื้อเจลจะติดอยู่กับแผ่นพลาสติก รอขั้นตอนต่อไป

3.9.3 <u>การเติมสารตัวอย่างและการทำ อิเล็กโทรโฟริซิส</u>

นำกระดาษกรองตัดเป็นชิ้นเล็กๆ 3x5 มิลลิเมตร วางขวางไว้บริเวณกลางแผ่นเจล ห่างกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1-10 ไมโครกรัม ลงบนแผ่นกระดาษกรอง ทิ้งให้สารละลายตัวอย่างซึมลงในเนื้อเจลประมาณ 5-10 นาที แล้วนำแผ่นกระดาษกรองออก ระวังไม่ให้เจลขาด

นำแผ่นเจลวางคร่ำระหว่างแท่งกราไฟท์ ควบคุมความต่างศักย์คงที่ ตั้งความต่างศักย์ให้เพิ่มทีละขั้น (Stepwise) เริ่มจาก 100 โวลท์ 15 นาที 200 โวลท์ 15 นาที และ 450 โวลท์ 1 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นเจลออกมาย้อมสีด้วยสารละลายย้อมโปรตีน (protein staining solution) ประมาณ 10 นาที จะปรากฏแถบโปรตีนที่แยกจากกันตามค่า pI เปรียบเทียบค่า pI ที่เกิดขึ้นกับแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่า pI (ภาคผนวก 4) ที่ประกอบไปด้วย Phycocyanin (4.65), β-Lactalbumin B (5.10), Bovine carbonic anhydrase (6.00), Human carbonic anhydrase (6.50), Equine myoglobin (7.00),

Human hemoglobin A (7.10), Human hemoglobin C (7.50), Lentil lectin (7.80, 8.00, 8.20), Cytochome C (9.60)

3.10 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทริน

3.10.1 การวิเคราะห์ โดยวิธี TLC (Thin-Layer Chromatography)

ทำตามวิธีของ Takeo และคณะ (1970)

เป็นวิธีการที่ประหยัด ใช้ระยะเวลานานประมาณ 4 ชั่วโมง และมีความไวต่อไซโคลเดกซ์ทริน 3-5 ไมโครกรัม

3.10.1.1 การเตรียมแผ่น Microcrystalline cellulose

ผสม Microcrystalline Cellulose กับน้ำกลั่นตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.6.1 แล้วเทสารผสมลงในเครื่องลาก (Spreader) ซึ่งปรับความหนาไว้ 250 ไมโครเมตร ลาก Spreader ไปตามแผ่นแก้วที่สะอาดและแห้งขนาด 0.25 X 20 X 20 เซนติเมตร ด้วยความเร็วสม่ำเสมอจนสุดแผ่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องค้างคืน แล้วเก็บไว้ในตู้อบแห้งจนกว่าจะใช้

3.10.1.2 การเตรียมถังแก้วโครมาโตกราฟีให้สมดุลย์ (Chamber Equilibration)

ผสมตัวทำละลายผสมที่ประกอบด้วย n-butyl alcohol : ethyl alcohol : water อัตราส่วน 4:3:3 (v/v) เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงถังแก้ว (Chromatographic tank) ปิดฝาถัง ทิ้งให้สมดุลย์ ประมาณ 1 ชั่วโมง เตรียมสารละลายนี้ก่อนทำการทดลองเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

3.10.1.3 การวิเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทริน

ใช้หลอดแก้วขนาดเล็ก (Capillary Tube) ดูดสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินตัวอย่าง และสารละลายไซโคลเดกซ์ทรินมาตรฐานอย่างละ 10 ไมโครลิตร มาจุดลงบนแผ่น Microcrystalline cellulose ปล่อยให้สารละลายซึมลงทีละน้อยๆ ทิ้งให้แห้ง แล้วจึงจุดซ้ำจนได้ปริมาตรที่ต้องการ ระวังอย่าให้จุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางเกิน 5 มิลลิเมตร เมื่อจุดสารละลายแห้งหมดแล้ว จึงนำแผ่นแก้วมาวางในถังแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายผสม ปิดฝาถัง ปล่อยให้ตัวทำละลายผสมซึมผ่านตามแผ่นขึ้นมาจนระดับตัวทำละลายห่างจากปลายบนประมาณ 1-2 เซนติเมตร จึงหยุด โดยยกแผ่นกระจกออกจากถัง นำไปวางผึ่งให้แห้ง ทำการทดลองอย่างเดียวกัน 2 ครั้ง (แต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง) ทำเครื่องหมายแสดงระยะที่ตัวทำละลายเครื่องที่ เมื่อแผ่นกระจกแห้งแล้ว ตรวจวัดผลด้วยการฟ่นสารละลาย Methanolic Iodine 1 เปอร์เซนต์ จะได้แถบของ α-, β-, γ-Cyclodextrins ซึ่งจะให้แถบสีต่างกัน คือ สีม่วง, สีเหลือง และสีน้ำตาล ตามลำดับ นำมาคำนวณหาค่า Rf เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานผสม α-, β-, γ-Cyclodextrins

$$\text{กำหนดค่า Rf} = \frac{\text{ระยะทางที่สีของสารตัวอย่างเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น (ซม.)}}{\text{ระยะท างที่สีของตัวทำละลายผสมเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น (ซม.)}}$$

3.10.2 **High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Pongsawasdi และ Yagisawa (1987)

แยกตะกอนไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นสารละลายแป้งกับสารละลายไตรคลอโรเอธิลีน มาละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Millpore (0.45 mm) ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์แยกชนิด และหาปริมาณไซโคลเดกซ์ทริน ด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับ

สารละลายมาตรฐานผสมของ α-, β- และ γ-Cyclodextrins ความเข้มข้นชนิดละ 5-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Supelco-NH2 column ขนาด 4.6 มม. ID.x 25 ซม. ใช้สารละลายผสม Acetonitrile: Water อัตราส่วน 67:33 (โดยปริมาตร) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ RI เป็น Detector และฉีดสารตัวอย่าง ปริมาตรอย่างละ 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC วิเคราะห์ชนิดและหาปริมาณไซโคลเดกซ์ทรินในสารละลายโดยเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (Retention Time) กับความสูงของพีค (Peak height) ของสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของ α-, β- และ γ-Cyclodextrins(ภาคผนวก 1-3) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (100-400 ไมโครกรัม) และฉีดเข้าเครื่องวิธีและสภาวะเดียวกัน ซึ่งจะถูกแปลผลออกมาใน รูปของ % Conversion จากแป้ง

$$\% \text{ Conversion} = \frac{\text{Concentration of Cyclodextrins detected (g/l)} \times 100}{\text{Concentration of Starch Substrate (g/l)}}$$

3.11 ศึกษาการใช้แป้งชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรทของ CGTase

ทดลองใช้แป้งชนิดต่างๆคือ แป้งข้าวเจ้า, Dextrin type II, Dextrin typeIII, อะไมโลส และอะไมโลเพคติน รวมทั้งน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสับสเตรตของ CGTase แทน Soluble starch (Potato) โดยวิธี CD-forming activity (CD-TCE method)