บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การคัดเลือก การเก็บรักษา และการจำแนกสกุล (genus) แบคทีเรีย

1.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย

นำตัวอย่างดิน หรือน้ำ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม สารละลายที่ได้นำมากระจายบนจานเลี้ยงเชื้อ (สูตรอาหารตามภาคผนวก 1.1) บ่มที่ 40 °ซ 18-24 ชม. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันมาแยกให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนจานเลี้ยงเชื้อ

1.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียใส่หลอดทดลองที่มีอาหารเอียงตามสูตรในภาคผนวก 1.1 ปิดปากหลอดด้วยกระดาษพาราฟิล์ม เก็บที่ 4 °ซ เขี่ยเชื้อใหม่ทุก 15 วัน

1.3 การจำแนกสกุลของแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อให้ได้อายุ 18-24 ชม. บนอาหารตามสูตรในภาคผนวก 1.2 นำมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test) โดยจำแนกตามวิธีของ Bergey (Sneath และคณะ,1986)

1.3.1 การย้อมสีแบบกรัม (Gram stain)

กระจายเชื้อบนสไลส์ ทำให้แห้งในอากาศ ผ่านเปลวไฟ ย้อมสีกรัมคริสตัลไวโอเลต 1 นาที ล้างด้วยน้ำ ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน 1 นาที ล้างน้ำ ล้างสีออกโดยใช้ 95 % เอทธานอล โดยเอียงสไลส์ให้แอลกอฮอล์ไหลผ่าน สังเกตดูสีคริสตัลไวโอเลตที่ถูกชะออกมาพอเริ่มจางลง หยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มลงในน้ำ ซับให้แห้ง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน

1.3.2 การศึกษาการเคลื่อนที่ของจุลชีพโดยวิธี Hanging drop technique

ใช้ดินน้ำมันปั้นเป็นก้อนกลมเล็กขนาดเส้นลวด แล้วขดเป็นวงกลม วางบนแผ่นสไลส์ ใช้ลูปแตะเชื้อ วางหยดเชื้อลงบนกระจกปิดสไลส์ตรงกลาง นำสไลส์วางคว่ำลงบนกระจกปิด

สไลส์ โดยใช้หยดเชื้ออยู่ตรงกลางวงดินน้ำมัน หงายทั้งหมดขึ้น นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์กำลังขยายสูง 400 เท่า

1.3.3 การย่อยแป้ง (starch hydrolysis)

เขี่ยเชื้อ ลากเป็นเส้นตรง บนอาหารที่ผสมแป้ง (starch agar plate)ตามสูตรในภาคผนวก 1.4.1 เพาะเชื้อที่ 37 °ซ 18-24 ชม. ดูผลการทดลองโดยราดสารละลายกรัมไอโอดีน ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว

1.3.4 การย่อยเคซีน (casein hydrolysis)

วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.3.3 โดยเปลี่ยนจากแป้งเป็น skim milk 10 % (กรัม/มล.)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.5 การย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis)

แทงเชื้อลงไปตรงๆในหลอดทดลองที่มีอาหารผสมด้วย 12 % เจลาติน (ภาคผนวก 1.4.3) เทียบกับหลอดที่ไม่ได้แทงเชื้อ เพาะเชื้อที่ 37 °ซ 18-24 ชม. แช่หลอดลงในอ่างน้ำแข็ง แล้วนำมาเอียงดูว่าสามารถแข็งอยู่ในสภาพเจลหรือไม่

1.3.6 การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide production)

แทงเชื้อลงไปตรงๆในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้น Triple sugar iron agar (TSI) เพาะเชื้อที่ 37 °ซ 48 ชม. ตรวจดูผลการทดลอง

1.3.7 กิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลส (catalase activity)

เพาะเชื้อในอาหารเหลวตามภาคผนวก 1.2 18-24 ชม. หยดอาหารเลี้ยงเชื้อบนแผ่นสไลส์ 1 หยด ใช้ 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หยด 1-2 หยด สังเกตฟองแกสที่เกิดขึ้น

1.3.8 การย้อมสีสปอร์ (endospore stain)

กระจายเชื้อจุลชีพ โดยหยดน้ำลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด ผสมกับเชื้อทำให้แห้งในอากาศ หยดมาลาไคท์กรีน 5 % ลงบนบริเวณที่กระจายเชื้อไว้ ใช้ไฟลนใต้สไลส์พอให้เกิดไอ 1-2 นาที คอยหยดสีเติมลงไปอย่าให้แห้ง ล้างด้วยน้ำที่ไหลจากก๊อก 30 วินาที ย้อมสีทับด้วยสีซาฟรานินโอ 1 นาที ล้างน้ำ ซับ ทิ้งให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยหัวน้ำมัน จะเห็นสปอร์ที่อยู่ภายในเซลสีเขียว ส่วนเซลที่เหลือจะติดสีแดง

1.3.9 กิจกรรมของเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase activity)

กระจายเชื้อบนกระดาษทดสอบขนาด 5-10 x 50-60 มม. ที่ชุบสารละลายออกซิเดส

019164

ทิ้งให้แห้ง สังเกตุสีกระดาษที่เปลี่ยนไป

1.3.10 การเกิดไนไตรท์ (nitrite production)

เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนเตรท (nitrate broth) 18-24 ชม. เติมสารละลาย ก. 1 มล. ตามด้วยสารละลาย ข. ถ้ามีไนไตรท์ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

1.3.11 การหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose fermentation)

ใส่เชื้อลงในอาหารเหลวที่ผสมน้ำตาลกลูโคส เพาะเชื้อที่ 37 °ซ 18-24 ชม. สังเกตุสีของอาหารที่เปลี่ยนไป และหลอดดักแกสที่คว่ำอยู่ในหลอดทดลอง

2. การเลี้ยงเชื้อ และการศึกษาสภาวะเหมาะสมในการชักนำให้แบคทีเรียสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส

2.2 การเลี้ยง และติดตามการเจริญของแบคทีเรีย

2.2.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อที่มีอายุ 18-24 ชม. 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามภาคผนวก 1.2 เขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่เขย่าได้ ที่ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที 40 °ซ จนวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.3

2.2.2 การติดตามการเจริญของเชื้อ

2.2.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อจากข้อ 2.2.1 10 มล. ลงในอาหารที่ต้องการติดตามการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 100 มล. ซึ่งสูตรอาหารจะระบุในการทดลอง เขย่าต่อที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 35, 40,45,50,55 °ซ นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆมาวัดการเจริญ โดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

2.2.2.2 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 2.2.2.1 เปรียบเทียบการเจริญที่ pH ต่างๆ

2.3 การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอนไซม์

2.3.1 แหล่งคาร์บอน

2.3.1.1 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อในอาหารตามสูตรภาคผนวก 1.3 เติมสารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน 1 %

(กรัม/ปริมาตร) เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชม. จนกระทั่ง 72 ชม. วัดปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

2.3.1.2 ปริมาณแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 2.3.1.1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เลือกได้จากข้อ 2.3.1.1 เปลี่ยนแปลงปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ดังนี้ 1,2,3,4,5 % (กรัม/ปริมาตร)

2.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ศึกษาในทำนองเดียวกับแหล่งคาร์บอน

2.4 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford,1976)

นำสารละลายตัวอย่าง 0.1 มล. เติมสารละลายแบรดฟอร์ด 1 มล. (สำหรับโปรตีนปริมาณ 1-10 ไมโครกรัม) หรือ 5 มล. (สำหรับโปรตีนปริมาณ 10-100 ไมโครกรัม) ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีโปรตีน 1-10 ไมโครกรัม และ 10-100 ไมโครกรัม

2.5 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท

บ่ม 0.1 มล. ของสารละลายเอนไซม์กับ 1 มล. ของ 0.5 % เคซีนใน ไกลซีน ไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ pH 10.5 และ 0.9 มล. ของ 0.1โมลาร์ ไกลซีนไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ pH 10.5 ที่อุณหภูมิ 55 °ซ 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 10 % กรดไตรคลอโรอะซิติก 2 มล. นำไปปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที นำส่วนน้ำใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

หมายเหตุ 1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเคซีนแล้วได้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ตามสภาวะการทดลองที่กำหนด

3. การเตรียม และเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อโดยใช้สภาวะเหมาะสมที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้า ด้วยขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร 5 ขวด ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ 200 มล. เขย่านาน 72 ชม. นำไปปั่นแยกเซลที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที 4 °ซ นาน 30 นาที เก็บส่วนน้ำใส เติมแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมล/ลิตร เก็บที่ 4 °ซ

4. การศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3 มาทำการศึกษา

4.1 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส โดยใช้บัฟเฟอร์ดังนี้

pH 4-6.5 : 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์

6.5-8.5 : 0.1 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์

8.5-12 : 0.1 โมลาร์ ไกลซีน-ไฮดรอกไซด์

4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆกันดังนี้ 25,30,35, 40,45,50,55,60,65,70 ^{o}ซ

5. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

5.1 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยโครมาโตรกราฟีบน DEAE-sephadex A-50

ชั่ง DEAE-sephadex 3 กรัม แช่ใน 10 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 7.5 ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมลาร์(บัฟเฟอร์ ก) ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน หรือ ต้มในอ่างน้ำเดือด 3 ชม. จะได้เรซินประมาณ 500 มล.

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 3 1,000 มล. ซึ่งวัดปริมาณโปรตีนได้ 36,000 มิลลิกรัมผสมกับ DEAE-sephadex ที่เตรียมไว้ กวนเบาๆประมาณ 2 ชม. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ล้างเจลด้วยบัฟเฟอร์ ก 500 มล. นำสารละลายที่กรองได้มารวมกัน วัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์

5.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย CM-sephadex C-50

เตรียมเจลเช่นเดียวกับ DEAE-sephadex นำมาผสมกับสารละลายที่ผ่านมาจาก DEAE-sephadex กวนเบาๆ 2 ชม.

นำไปบรรจุลงคอลัมน์ขนาด 3*40 ซม. ล้างคอลัมน์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ ก จนไม่มีโปรตีนออกมาอีก จึงเปลี่ยนไปชะด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ไกลซีนไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ pH 10 ที่เติมแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 7 มล. นำมาตรวจหาโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร สารละลายหลอดที่มีโปรตีน นำมาวัด

ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส รวบรวมสารละลายหลอดที่มีแอคติวิตีวัดปริมาตร

5.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรตีเอสด้วย โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Polyacrylamide gel electrophoresis)

5.3.1 การเตรียมแผ่นเจล

เตรียม 7 % separating gel โดยผสมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 1.5 โมลาร์ pH 8.8 3.8 มล. N,N,N',N'-Tetramethylenediamine (TEMED) 9.0 ไมโครลิตร สารละลาย 30 % อะคริลาไมด์-0.8 % บิส 3.5 มล. และน้ำกลั่น 5.8 มล. เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 10 % แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 40 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำมาบรรจุในแผ่นแก้วคู่ขนานขนาด 8x6.5 ซม.x 0.75 มม. จนสารละลายสูงประมาณ 5 ซม. ค่อยๆหยดน้ำกลั่นลงบนผิวเจล ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตุเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล ล้างผิวหน้าเจลด้วยสารละลายผสม stacking gel เตรียม stacking gel โดยผสมสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 6.8 3.7 มล. TEMED 10.0 ไมโครลิตร สารละลาย 30 % อะคริลาไมด์-0.8 % บิส 1.5 มล. และน้ำกลั่น 5.1 มล. เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 10 % แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 200 ไมโครลิตร แล้วบรรจุสารผสมนี้ลงในแผ่นแก้วคู่ขนานที่มี comb อยู่ โดยเทสารละลายให้ถึงระดับที่ห่างจากขอบบนของแผ่นแก้ว 1.5 ซม. ค่อยๆหยดน้ำกลั่นลงบนผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ค่อยๆดึง comb ออก ล้างผิวเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เตรียมนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5.3.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

ทำสารละลายให้เข้มข้นขึ้นโดยกรองผ่านแผ่นเยื่อ (Amicon YM-10) ด้วยเครื่องอุลตราฟิวเตรชัน ภายใต้ความดันของกาซไนโตรเจน 2 กก./ตารางนิ้ว ผสมสารละลายนี้กับสารละลายสีตามรอย ด้วยอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร

5.3.3 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

ใส่แผ่นเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่สารละลายทริสไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3 ลงในอ่างบัฟเฟอร์จนท่วมเจล ปรับอุณหภูมิในอ่างบัฟเฟอร์ให้ได้ 5 °ซ นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 5.3.2 หยอดลงหลุมเจล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วผ่านกระแสไฟฟ้า 40

มิลลิแอมแปร์ โดยให้ขั้วลบอยู่ด้านลบ จนกระทั่งแถบสีตามรอยเคลื่อนลงไปจนถึงระยะอีก 1 ซม. จากปลายล่างของแผ่นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า

5.3.4 วิธีย้อมสีโปรตีน

แกะแผ่นเจลจากแผ่นกระจก แล้วนำไปแช่ในน้ำยาย้อมสี coomassie blue stain ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นนำไปล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อม (สูตรตามภาคผนวก 2.3.6 จนกระทั่งเจลใส และได้แถบสีน้ำเงินของโปรตีนอยู่อย่างชัดเจน เก็บแผ่นเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน

6. การศึกษาสมบัติของอัลคาไลส์โปรตีเอสหลังการทำให้บริสุทธิ์

6.1 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

วิธีทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1

6.2 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ 0.1 มล. กับ 0.9 มล. บัฟเฟอร์ (ระบบบัฟเฟอร์เหมือนกับข้อ 4.1) ที่ 55 °ซ นาน 0,15,30,45,60 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ เปรียบเทียบกันที่ pH ต่างๆ ดังนี้ 4,5,6,7,8,9,10,11 และ 12

6.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

วิธีทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3

6.4 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

บ่มเอนไซม์ 0.1 มล. กับ 0.9 มล. บัฟเฟอร์ pH ที่เลือกได้จากข้อ 6.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 50,55,60 °ซ นาน 0,15,30,45,60 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ

6.5 การหาน้ำหนักโมเลกุล และหน่วยย่อยของเอนไซม์ โดยวิธีเจลฟิวเตรชัน และ เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

การทำเจลฟิลเตรชัน โดยใช้เซฟาเดกซ์ จี-75

แช่เซฟาเดกซ์ จี-75 ปริมาณ 25 กรัม ใน 10 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ ที่มี 2 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ pH 7.5 ปริมาตร 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม. หรือนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด นาน 3 ชม. นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.7 x 90 ซม. ให้ได้เจลสูง 80 ซม. ผ่านบัฟเฟอร์ ข้ามคืน ด้วยอัตราไหล 30 มล./ชม. เพื่อให้เจลอยู่ในสภาวะสมดุลย์ ทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ด้วยสารละลายบลูเดกซ์แทรน 4 มก./มล. และโปแตสเซียมไดโครเมต 1 มก./มล.

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ Bovine serum albumin (BSA) Ovalbumin Lysozyme น้ำหนักโมเลกุล 66,000 , 45,000, 14,300 ดาลตัน ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้น 10 มก./มล.

เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.0 มล. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนผ่านออกจากคอลัมน์ คำนวณหาค่า K_{av} จากสูตร

$$K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o$$

เมื่อ V_e = elution volume ของโปรตีนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์

V_o = void volume ของคอลัมน์ (ปริมาตรของสารละลายที่บลูเดกซ์แทรนผ่านออกมา)

V_t = ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ (total bed volume) คือ ปริมาตรของสารละลายที่วัดได้เมื่อโปแตสเซียมไดโครเมตผ่านออกจากคอลัมน์

ผ่านสารละลายอัลคาไลน์โปรตีเอสลงคอลัมน์ หา elution volume ของเอนไซม์โดยการวัดแอคติวิตี คำนวณหาค่า K_{av} แล้วเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

<u>เอสดีเอส โพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส</u> (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)

<u>การเตรียมแผ่นเจล</u>

วิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมเจลในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส แต่เติม 1 % SDS 1.5 มล. ลงใน separating gel และ stacking gel ด้วย

<u>การทำอิเลคโตรโฟรีซิส</u>

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส แต่ไม่จำเป็นต้องปรับอุณหภูมิในอ่างบัฟเฟอร์

การคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ คำนวณได้จากสูตร

Mobility = ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่/ระยะทางที่แถบสีตามรอยเคลื่อนที่

หลังจากนั้นเทียบหาน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

6.5 การศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรทชนิดต่างๆ หาค่า K_m และ V_{max} ของสับสเตรทแต่ละชนิดโดย Line weaver-Burk plot

6.6 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH 10.5 อุณหภูมิ 55°ซ แต่เติมอิออนของโลหะลงในบัฟเฟอร์ 1 มิลลิโมลาร์

6.7 การศึกษาผลของตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส

บ่มเอนไซม์ 0.1 มล. กับ 0.1 โมลาร์ ไกลซีนไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ pH 10.5 ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ Phenylmethylsulfonate (PMSF) หรือ Ethylenediaminetetraacetic acid ระหว่าง 0-10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที ที่ 55 °ซ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ