ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

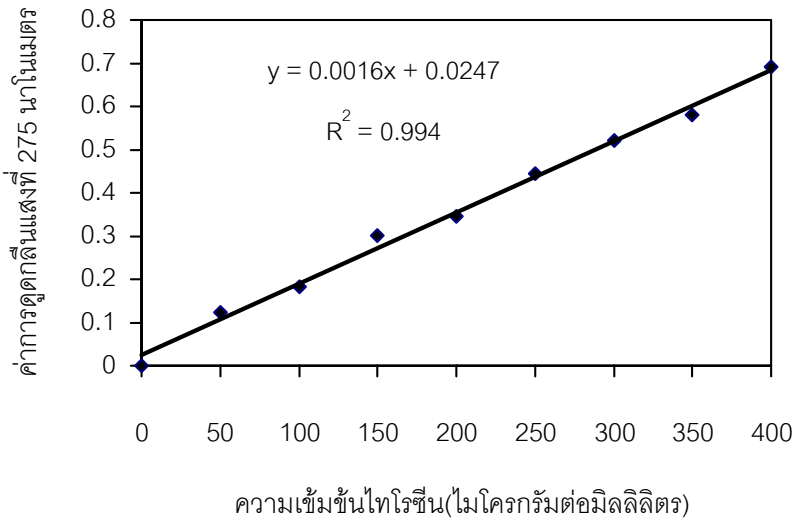
1. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Hagihara *et al*., 1958)

1. ชั่งไทโรซีน 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือ สารละลายไทโรซีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เจือจางสารละลายไทโรซีน (stock solution) ให้อยู่ช่วง 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

4. เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร (ภาพภาคผนวก ก1)



ภาพภาคผนวก ก1 กราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein)

โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A: คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \bullet 5H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2. สารละลาย B: โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate $\bullet 4H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3. สารละลาย C: โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

4. folin-ciocalteu reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย WS1 และ WS2 ใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ โดย

WS1: สารละลายผสมของสารละลาย A: สารละลาย B: สารละลาย C ในอัตราส่วน 1:1: 98 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

WS2: สารละลาย folin-ciocalteu reagent เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2.เติมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม (5-100ไมโครกรัม) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3.เติมสารละลาย WS1 ปริมาตร 2.1 มิลลิลิตร ปั่นผสมแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

4.เติมสารละลาย WS2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปั่นผสมทันทีแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

5.นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ส่วน blank วิเคราะห์ด้วยวิธีการเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

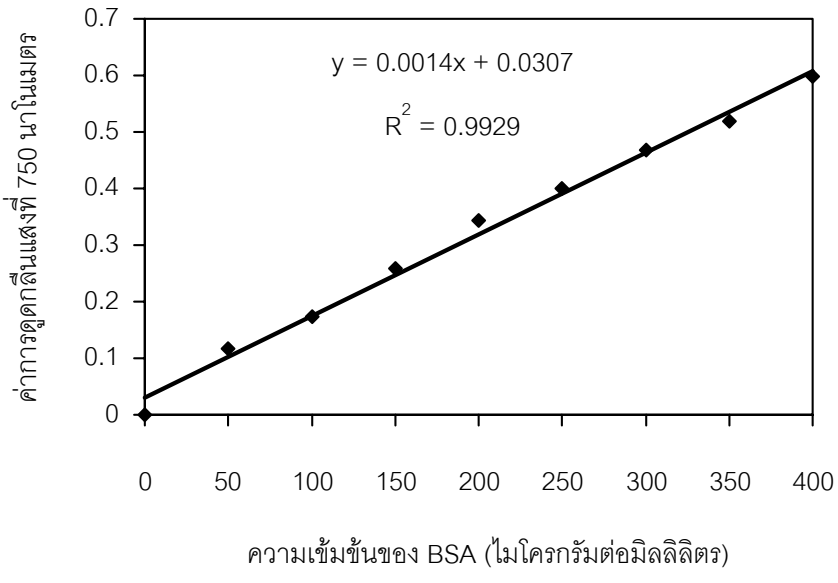
การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA)

1. ละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin: BSA) 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่เป็น stock solution มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เจือจางสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน (stock solution) ให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำ stock solution ปริมาตร 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ มาปรับปริมาตรของแต่ละหลอดให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแต่ละความเข้มข้นดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น

4.นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของโบวินซีรัมอัลบูมิน (ภาพภาคผนวก ก2)



ภาพภาคผนวก ก2 กราฟมาตรฐานโปรตีนโบวินซีรัมอัลบูมินที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

1.ชั่ง N-acetylglucosamine (2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose: GlcNAc) 1 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือสารละลาย N-acetylglucosamine ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เจือจางสารละลาย N-acetyl-glucosamine (stock solution) ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 5-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

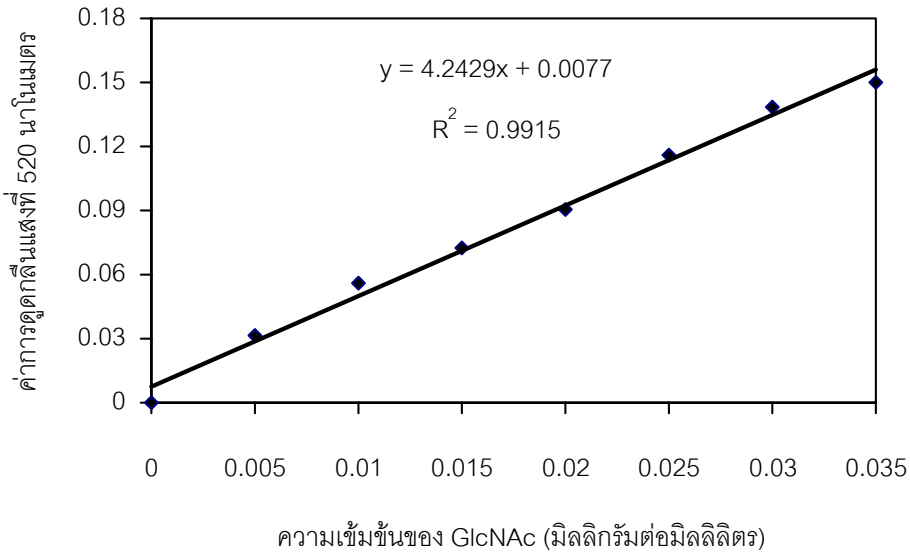
3.สารละลายที่ได้ในแต่ละหลอดนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ตามวิธีการของ Somogyi-Nelson method (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, 2536)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีการของ Somogyi-Nelson **method**

1.เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วทำการเติมสารละลาย copper reagent (ภาคผนวก ข 8.2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที

2.ทำให้เย็นโดยการแช่ลงในอ่างน้ำ เติมสารละลาย Arsenomolybdate reagent (ภาคผนวก ข 8.2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นว่าสารละลายกลายเป็นสีเขียวหรือน้ำเงินเขียว

3.เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ส่วน blank วิเคราะห์ด้วยวิธีการเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาล GlcNAc (ภาพภาคผนวก ก3)



ภาพภาคผนวก ก3 กราฟมาตรฐานน้ำตาล GlcNAc

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

1. ชั่ง N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) 1 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือสารละลาย N-acetyl-glucosamine ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เจือจางสารละลาย N-acetyl-glucosamine (stock solution) ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. สารละลายที่ได้ในแต่ละหลอดนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล GlcNAc ตามวิธีการของ Reissig *et al*., 1955)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล GlcNAc ตามวิธีการของ Reissig's method

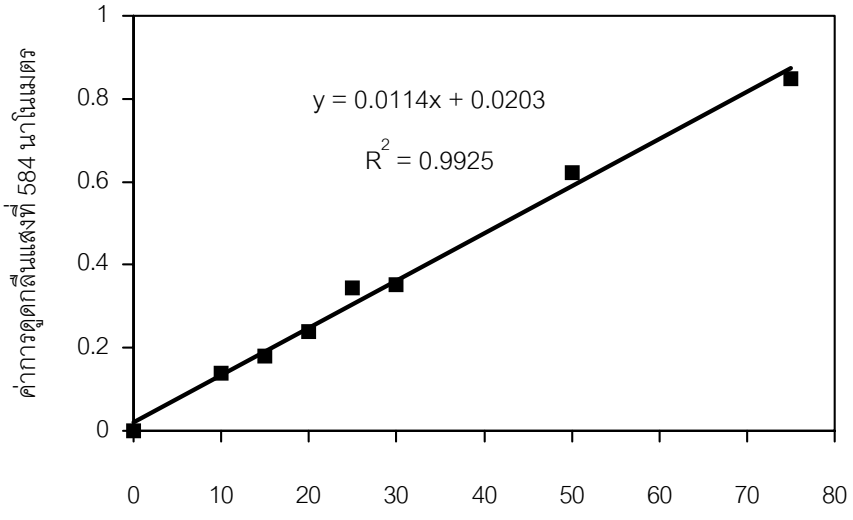
1. นำสารละลาย N-acetylglucosamine (stock solution) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ (10-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย 0.8 M potassium tetraborate ($B_4K_2O_7 \bullet 4H_2O$) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

3. ให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 3 นาที และหลังจากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็นทันที

4. เติมสารละลาย 10% *p*-DMAB ในสารละลาย gracial acetic acid ที่มี 12.5% HCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำเย็น

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 584 นาโนเมตร ส่วน blank วิเคราะห์ด้วยวิธีการเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาล GlcNAc (ภาพภาคผนวก ก4)



ภาพภาคผนวก ก4 กราฟมาตรฐานน้ำตาล GlcNAc

5. **การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส ตามวิธีการของ Laemmli (1970)**

สารเคมี

1. Acrylamide/bisacrylamide เตรียมโดยละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ bisacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน หลังจากการเตรียม
2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8
4. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
5. Stock sample buffer (SDS-Reducing buffer) ประกอบด้วย

น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.8	มิลลิลิตร
10% SDS	1.6	มิลลิลิตร
เบต้า-เมอแคปโตเอธานอล	0.4	มิลลิลิตร
1% โบรโมฟีนอลบลู	0.4	มิลลิลิตร

6. 5X electrode (running) buffer, pH 8.3

Tris-base	9	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
SDS	3	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

7. Catalyst ประกอบด้วย

2% (w/v) Ammonium persulfate (APS) (เตรียมก่อนที่ใช้)

TEMED (N, N, N', N'- tetramethylenediamine)

8. โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล Low molecular weight (Bio-Rad) ประกอบด้วย โปรตีน 6 ชนิดคือ phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor และ lysozyme ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 97,400, 66,200, 45,000, 31,000, 21,500 และ 14,400 ดาลตัน ตามลำดับ

9. สีย้อมโปรตีน Coomassie Brilliant Blue R-250
10. Staining solution เตรียมโดย ละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 0.04 กรัม ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร ทำให้ละลาย แล้วเติม glacial acetic acid 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร
11. Destaining solution 1 : ผสมเมทานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 30 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร

    Destaining solution 2 : ผสมเมทานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 75 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

5.1 การเตรียมตัวอย่าง

ทำการผสมสารละลายตัวอย่างกับ SDS-reducing buffer ในอัตราส่วน 1:4 ทำการต้มสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ก่อนจะนำตัวอย่างไปใส่ในเจล

5.2 การเตรียมองค์ประกอบของเจลในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

(10% separating gel และ 4% stacking gel) แสดงดังตารางภาคผนวก ก1

5.3 วิธีการ run gel electrophoresis (running the gel)

ประกอบชุดเจลอิเล็กโตรฟอรีซิส จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber จากนั้นทำการ load ตัวอย่างที่เตรียมได้ 5-20 ไมโครลิตร ต่อชุดอิเล็กโตรฟอรีซิสเข้ากับหม้อแปลงไฟฟ้า (power supply) ที่ขั้วแอโนด และแคโทดด้วยกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ถึง running gel (ประมาณ 30 นาที) แล้วเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 150 โวลต์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

ตารางภาคผนวก ก1 องค์ประกอบของเจลในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

Chemical	10% Separating gel	4% Stacking gel
30% Acrylamide-bis	1.167 ml	0.4 ml
1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8	0.875 ml	-
0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8	-	1.0 ml
1% SDS	0.35 ml	0.3 ml
Distilled water	0.7585 ml	0.9 ml
0.1 M EDTA	-	0.8 ml
2% Ammonium persulfate	0.35 ml	0.4 ml
TEMED	6 μl	5 μl

5.4 วิธีการย้อมเจล (Staining the gel)

1. วางเจลที่ได้ลงในกล่องพลาสติกและเติมสารละลายที่ใช้ในการย้อมโปรตีน เรียกว่า staining solution ทำการเขย่าช้าๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

2. ทำการเทสารละลายที่ใช้ย้อมเจลออก แล้วเติมสารละลายที่เรียกว่า Destaining solution 1 ลงไปแทนแล้วทำการเขย่าช้าๆ เป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วแช่ใน Destaining solution 2

6. **การตรวจสอบแบบแผนการย้อมแถบโปรตีนโดยอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)**

มีองค์ประกอบของเจลแสดงดังตารางภาคผนวก ก2

ตารางภาคผนวก ก2 องค์ประกอบของเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

Chemical	Stacking gel	Separating gel	
	4%	10%	12%
30% Acrylamide-bis mixture (ml)	0.65	2.38	2.80
0.5M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	1.25	-	-
1.5M Tris-HCl , pH 8.8 (ml)	-	1.82	1.82
10% Ammonium persulfate (μl)	25	70	70
TEMED (μl)	5	5	5
Distilled water (ml)	3.02	2.66	2.24
Total volume (ml)	5.0	7.0	7.0

ที่มา : Davis (1964)