บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ

ส่วนของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดลองจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ กุ้งกุลาดำทะเล (Seawater black tiger shrimp) และกุ้งกุลาดำเลี้ยง (Cultured black tiger shrimp) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์ หาดใหญ่ จำกัด อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา

2. สารเคมี

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส, เอนไซม์ไลเปส, เอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส, เอนไซม์แคทาเลส, เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส, เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส, เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส, เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และเอนไซม์ไคติเนส รวมทั้งการหาปริมาณโปรตีน และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

อุปกรณ์

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2000 ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer) ยี่ห้อ Jasco รุ่น V-530 ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น SCR-20B ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Homogenizer) ยี่ห้อ KIKA labortechnik รุ่น IKA ประเทศมาเลเซีย

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350 ประเทศเยอรมัน

เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer) ยี่ห้อ KIKA labortechnik รุ่น MS1 ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องกวนผสม (Magnetic stirrer) ยี่ห้อ KIKA labortechnik รุ่น RO5 power ประเทศเยอรมัน

เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 210S ประเทศเยอรมัน

เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 2100S ประเทศเยอรมัน

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Schott รุ่น CG 825 ประเทศเยอรมัน

ปั๊ม (Peristaltic pump) ยี่ห้อ Isamotec รุ่น Reglo Analog 2 channels MS-2/8 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ตัวกรองแบบละเอียด (Ultrafiltration Vivacell 70 Concentrator) ขนาด 10 kDa MWCO. PES ยี่ห้อ Vivascience รุ่น VS 6001 ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเก็บแยกส่วนอัตโนมัติ (Automatic fraction collector) ยี่ห้อ LKB รุ่น LKB 2212 Herirac ประเทศสหรัฐอเมริกา

ชุดอิเล็กโทรฟอรีซิส (Electrophoresis apparatus) ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น Mini-Protein II ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการศึกษา

1. การเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง

1.1 การสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงจากโรงงาน บันทึกจำนวนตัวต่อกิโลกรัมของกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด แล้วนำมาดึงเอาหัวออก หลังจากนั้นนำเอาส่วนของหัวที่ได้ มาชั่งน้ำหนักหาสัดส่วนของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำต่อน้ำหนักตัวกุ้ง และร้อยละของน้ำหนักตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ และเก็บตัวอย่างที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำที่ได้ด้วยวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Chuang และ Shin (1990) และ Chen และคณะ (1997) โดยนำตัวอย่างตับอ่อนจากกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด น้ำหนักตัวอย่างละ 50 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร [อัตราส่วนของตับอ่อนกุ้งกุลาดำต่อสารละลาย

บัฟเฟอร์เท่ากับ 1:3 (น้ำหนักต่อปริมาตร)] นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปสกัดต่อโดยการกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735x*g*) นาน 30 นาทีจะได้สารละลายเอนไซม์สกัด 2 ส่วน คือ ส่วนสกัดสารละลาย (supernatant) และส่วนสกัดอิมัลชั่น (emulsion)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์

นำเอนไซม์สกัดที่ได้ทั้ง 2 ส่วนของกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก2) และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส เอนไซม์แคทาเลส เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ตามวิธีการในข้อ 1.2.1-1.2.9 ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงเลือกทำให้บริสุทธิ์เฉพาะเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมสูงสุดและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ชนิดนั้นในขั้นตอนต่อไป

1.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hagihara และคณะ (1958) ดังนี้

นำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสับสเตรต (สารละลายเคซีน ความเข้มข้น ร้อยละ 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมบัฟเฟอร์ที่ใช้หยุดปฏิกิริยา (ภาคผนวก ข6) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (ภาพภาคผนวก ก1)

หลอดควบคุม เตรียมโดยเติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา 2 มิลลิลิตร ลงในสารละลายสับสเตรต 1 มิลลิลิตร แล้วเติมเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรตได้ กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไทโรซีน (กรัมต่อโมล)} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไทโรซีน} \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส(ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

$$\text{กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (ร้อยละ)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์} \times 100}{\text{กิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์}}$$

1.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงวิธีการของ Winkler และ Stuckmann (1979) ดังนี้

นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรต [ผสม *p*-nitrophenol palmitate 30 มิลลิกรัม ที่ละลายใน 2-propanol 10 มิลลิลิตร กับ sodium deoxycholate (Na-DOC) 207 มิลลิกรัม และ arabic gum 100 มิลลิกรัมใน 90 มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์] ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เอนไซม์ไลเปสมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ 15.0 $M^{-1}cm^{-1}$ (Winkler and Stuckmann, 1979)

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรตได้ *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A_{410nm} \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา(มิลลิลิตร)}}{\text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{extinction coefficient} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

1.2.3 กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส โดยดัดแปลงวิธีการของ Wilson และ Ingledew (1982)

นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรต (สารละลายแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 0.2) (ภาคผนวก ข7.1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นทำการเติมสารละลายแป้ง ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายที่ได้ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำมาเติมสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข7.2) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส} = \frac{(\text{ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของควบคุมกับหลอดทดสอบ}) \times 40D}{\text{หลอดควบคุม}}$$

เมื่อ D = dilution factor ; 40 = แป้ง 4 มิลลิลิตรที่เข้าทำปฏิกิริยา ใน 10 นาที

1.2.4 กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส โดยดัดแปลงวิธีการของ Hildedrandt และ Roots (1975), Hicks (1995) และ Koga (1999)

นำสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 2.84 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาจะเริ่มเมื่อมีการเติมสารละลายเอนไซม์ลงไป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร ด้วย UV-VIS spectrophotometer ภายในเวลา 1 นาที เอนไซม์แคทาเลสมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ 43.6 $M^{-1}cm^{-1}$ (Hildebrandt and Roots, 1975; Hicks, 1995; Koga *et al*., 1999)

กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{dAbs_{240nm}/\text{นาที} \times 1000 \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{\text{extinction coefficient} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ dAbs = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงสุดท้ายกับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น

1.2.5 กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ตามวิธีการของ Shannon และคณะ (1966)

นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.4 ปริมาตร 2.84 มิลลิลิตร และสารละลาย *o*-dianisidine ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร บันทึกค่าทุก 15 วินาที

จนครบ 3 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วย UV-VIS spectrophotometer ปฏิกิริยาจะเริ่มเมื่อมีการเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในส่วนผสม ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จะมีชุดควบคุมซึ่งเติมสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกันแต่ไม่เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ 11,300 M^{-1} cm^{-1} (Mliki and Zimmermann, 1992)

กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต (*o*-dianisidine) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{dAbs_{460nm}/\text{นาที} \times 1000 \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{\text{extinction coefficient} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ dAbs = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงสุดท้ายกับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น

1.2.6 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยดัดแปลงวิธีการของ Malamy และ Horecker (1966) และ Ericksson และคณะ (2001)

นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรต คือ สารละลาย *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายผสมของสารละลาย ammediol บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.8 และแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ในอัตราส่วน 97.9 : 2.1, ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ 18,500 M^{-1} cm^{-1} (Ericksson *et al*., 2001)

กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต (*p*NPP) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A_{405nm} \times 1000 \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{\text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{extinction coefficient} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

1.2.7 กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ตามวิธีการของ Chen และคณะ (1991)

นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.04 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรตคือ สารละลาย DL-DOPA (DL-β-3,4-dihydroxyphenylalanine) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.56 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ 3,600 $M^{-1}cm^{-1}$ (Chen *et al*., 1991)

กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต (DL-DOPA) ความเข้มข้น1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A_{475nm} \times 1000 \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{\text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{extinction coefficient} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

1.2.8 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส โดยดัดแปลงวิธีการของ Tsujibo และคณะ (1991)

ทำการบ่มสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร กับสับสเตรตคือ สารละลาย colloidal chitin ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ภาคผนวก ข8.1) ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร ในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 7.60 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการของ Somogyi-Nelson (ภาคผนวก ก3) ในการทดลองแต่ละครั้งจะมีหลอดควบคุม 2 หลอดคือ หลอดที่ 1 เติมสารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายเอนไซม์ และหลอดที่ 2 มีสารละลายเช่นเดียวกับหลอดปฏิกิริยา แต่นำไปต้มทันทีนาน 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาล N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) (ภาพภาคผนวก ก3)

กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต (colloidal chitin) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของ GlcNAc} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของ GlcNAc (กรัมต่อโมล)} \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

1.2.9 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ตามวิธีการของ Krishnapillai และคณะ (1999a)

นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรตคือ สารละลายโซเดียมไฮยาลูโรเนต (sodium hyaluronate) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.4 ที่ประกอบด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น

0.15 โมลาร์ ปริมาตร 0.40 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติมสารละลายโปแตสเซียมเตตราบอเรต ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที และทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็นแล้วเติม สารละลาย *p*-DMAB (*p*-dimethylamino-benzaldehyde) (ภาคผนวก ข9) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำให้เย็นในทันที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 584 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล N-acetyl-glucosaminidase (GlcNAc) (ภาพภาคผนวก ก4) นำค่าที่ได้มาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของGlcNAc} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของGlcNAc (กรัมต่อโมล)} \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำไดอะไลซิส

นำตัวอย่างเอนไซม์สกัดได้มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆ เมื่อทดสอบหาช่วงความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนเอนไซม์ที่ต้องการเตรียม (โดยคัดเลือกช่วงความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์นั้นๆ สูงสุด) แล้วจึงทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความอิ่มตัวที่เหมาะสมโดยค่อยๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยอย่างช้าๆ พร้อมทั้งทำการกวนด้วยเครื่องกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมด นำสารละลายที่ได้มาเหวี่ยงแยกเพื่อตะกอนโปรตีน ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735x*g*) นาน 20 นาที เก็บตะกอน

ที่ได้มาละลายด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 จนตะกอนละลายหมด แล้ววัดปริมาตร

นำสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้บรรจุลงในถุงไดอะไลซิส (dialysis tubing) ซึ่งมีขนาดของรูกำจัดโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับหรือต่ำกว่า 8,000 ดาลตัน ผูกถุงให้แน่น แช่ในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วนสารละลายในถุง 1 ส่วนต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 50 ส่วน โดยมีการกวนสารละลายบัฟเฟอร์ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ภายหลังเวลาผ่านไป 1, 2 และ 4 ชั่วโมง นำสารละลายในถุงไดอะไลซิสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735x*g*) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

2.2 การทำโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนอิออน (Ion-exchange chromatography)

เตรียมเรซินแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M ซึ่งเป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนอิออน (anion exchange) แล้วบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.4x20 เซนติเมตร (ปริมาตร 30.79 มิลลิลิตร) ซึ่งผ่านการปรับสมดุล (equilibrate) ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรเจล โดยมีอัตราการไหลคงที่เท่ากับ 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.2 ผ่านลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการปรับสมดุล เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ในหลอดทดลองปริมาตร 3.0 มิลลิลิตรต่อหลอด ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ (automatic fraction collector) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าใกล้ศูนย์หรือไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก แล้วจึงเริ่มชะโปรตีนที่เกาะกับเรซินด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้นต่อเนื่องจาก 0-0.35 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ในอัตราการไหลเท่าเดิม ทำการติดตามปริมาณโปรตีนของสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ นำเฉพาะส่วนที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงมารวมกันแล้วทำให้เข้มข้นโดยวิธีอุลตราฟิวเตรชั่น ด้วยเมมเบรน Vivacell 70 concentrator (ขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 10,000 ดาลตัน) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไป

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน ก่อนจะนำเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นในขั้นตอนต่อไป

2.3 การทำโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิวเตรชัน (Gel filtration chromatography)

นำสารละลายส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่รวมได้จากคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M และผ่านการทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นแล้ว มาทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นอีกโดยการผ่านลงในคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่น โดยใช้เรซินชนิด Sephadex G-100 ทำการบรรจุเรซินลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.4x25 เซนติเมตร (ปริมาตร 38.48 มิลลิลิตร) ซึ่งผ่านการปรับให้คอลัมน์ให้สมดุลแล้วด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล แล้วนำสารละลายส่วนที่ทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วด้วยวิธีอุลตราฟิวเตรชั่น ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 ทำการชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการปรับให้สมดุล ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนอัตโนมัติ ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของสารละลายแต่ละหลอดจนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาโดยสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ นำสารละลายที่เก็บได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แล้วทำการรวมสารละลายของหลอดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน นำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี อุลตราฟิวเตรชั่น ด้วยเมมเบรน Vivacell 70 concentrator ซึ่งมีขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 10,000 ดาลตัน นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

นอกจากนี้ยังสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้โดยการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิวเตรชัน ในข้อ 2.4

2.4 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเจล-ฟิวเตรชัน (Gel filtration chromatography)

การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิวเตรชันโครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 นำเอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนชนิดอื่นๆ ออกไปจนบริสุทธิ์ในขั้นตอนคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 ขนาด 1.4x25 เซนติเมตร แล้วทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50

มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ในอัตราเร็วคงที่เท่ากับ 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ชะออกมาในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยเครื่องเก็บแยกส่วนอัตโนมัติ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พร้อมทั้งวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหลอดที่มีโปรตีนแล้ววัดปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการชะเอนไซม์ออกมา (elution volume, V_e) เปรียบเทียบกับปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ได้ในการชะโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่มีขนาดต่างๆ กัน จำนวน 4 ชนิด คือ โบวินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, M_r 67,000 ดาลตัน) โอวัลบูมิน (ovalbumin, M_r 43,000) ไคโมทริปซิโนเจน เอ (chymotrypsinogen A, M_r 25,000) และไรโบนิวคลีเอส เอ (ribonuclease A, M_r 13,700) ซึ่งบรรจุลงในคอลัมน์เดียวกันทีละชนิดโดยโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิดมีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วชะด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ด้วยอัตราการชะเช่นเท่ากับการชะตัวอย่างเอนไซม์ข้างต้นออกจากคอลัมน์ ปริมาตรชะของโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ หาได้โดยติดตามการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ส่วนในกรณีของบลูเด็กซ์แตรน (blue dextran, M_r 2,000,000 ดาลตัน) ที่ใช้ในการหาปริมาตรนอกเม็ดเจลหรือปริมาตรวอยด์ (void volume, V_o) ของคอลัมน์ทำโดยการนำบลูเด็กซ์แตรนผ่านคอลัมน์และชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ด้วยอัตราเร็วเดียวกัน วัดค่าการดูดกลืนแสงของบลูเด็กซ์แตรนที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ส่วนปริมาตรทั้งหมด (total volume, V_t) ของคอลัมน์หาได้จากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงของคอลัมน์ นำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (distribution coefficient, K_{av}) ของโปรตีนแต่ละชนิด ได้จากสมการ

$$\text{สัมประสิทธิ์การกระจาย } (K_{av}) = \frac{\text{ปริมาตรชะของเอนไซม์-ปริมาตรนอกเม็ดเจล}}{\text{ปริมาตรทั้งหมด-ปริมาตรนอกเม็ดเจล}}$$

แล้วนำมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วได้ โดยนำค่า K_{av} เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน การศึกษานี้จะใช้คอลัมน์เดียวกันตลอดการทดลอง โดยนำสารผ่านคอลัมน์ทีละชนิดและปรับอัตราการไหลให้คงที่เพื่อไม่ให้ความหนาแน่นของ Sephadex ในคอลัมน์มีการเปลี่ยนแปลง

2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส (Electrophoresis)

2.5.1 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE: Nondenatured polyacrylamide gel - electrophoresis)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากแต่ละขั้นตอนมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน โดยใช้วิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) ตามวิธีการของ Davis (1964) (ภาคผนวก ก6) โดยใช้ stacking gel เท่ากับ ร้อยละ 4 และ separating gel เท่ากับ ร้อยละ 10 และทำการย้อมแถบโปรตีนที่ได้บนแผ่นวุ้นด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250

2.5.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE: SDS – polyacrylamide gel electrophoresis)

นำสารละลายของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากแต่ละขั้นตอนมาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) ตามวิธีการของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก ก5) ใช้ stacking gel เท่ากับ ร้อยละ 4 และ separating gel เท่ากับ ร้อยละ 10 ย้อมสีแถบโปรตีนที่ได้บนแผ่นวุ้นด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้อิเล็กโทรฟอรีซิสชนิด SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานชุด Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit ของบริษัท Bio-rad ซึ่งใช้สำหรับโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 14,400-94,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด คือ ฟอสฟอรีเลส บี(phosphorylase b) โบวินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) โอวัลบูมิน (ovalbumin) คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor) และไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 97,400, 66,200, 45,000, 31,000, 21,500 และ 14,400 ดาลตัน ตามลำดับ และหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารละลายตัวอย่างหรือโปรตีนมาตรฐานต่อระยะทางของสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วนำมาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) จากนั้นจึงนำมาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับ ค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด นำค่า R_f ของโปรตีนตัวอย่างที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟ มาตรฐานเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

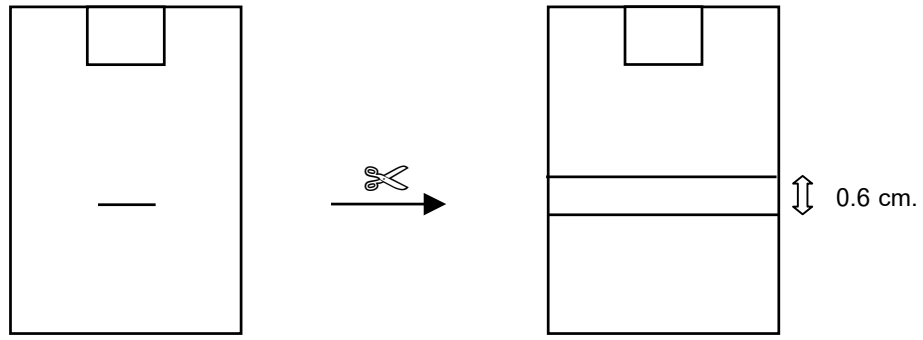
$$\text{การเคลื่อนที่สัมพันธ์ } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

2.6 การหาแถบของกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

นำตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 มาทำการแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ โดยใส่ตัวอย่างเอนไซม์ลงไปในช่องที่ 1, 3, 5, 6 และ 7 ส่วนในช่องที่ 8 เป็นสารละลายบัฟเฟอร์แทนตัวอย่าง (ชุดควบคุม) เมื่อทำการแยกโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพเรียบร้อยแล้ว จึงทำการตัดเจลในช่องที่ 1 ไปย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ส่วนช่องที่ 3, 5, 6, 7 และ 8 จะไม่ย้อมแถบโปรตีน เปรียบเทียบตำแหน่งแถบโปรตีนในเจลของช่องที่ 5, 6, 7 และ 8 กับแถบโปรตีนที่ย้อมได้ในช่องที่ 1 แล้วทำการตัดเจลของช่องที่ 5, 6, 7 และ 8 ซึ่งตรงกับแถบโปรตีนที่ย้อมได้ในช่องที่ 1 (Figure 3) นำเจลที่ตัดได้ไปบดให้ละเอียดในหลอดทดลองที่มีสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 นำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000x*g* นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดเจลแต่ละชิ้นไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (แคทาเลส) ที่ทำบริสุทธิ์ ส่วนช่องที่ 3 เมื่อทำการเปรียบเทียบตำแหน่งกับแผ่นเจลที่ย้อมแถบโปรตีนแล้วจึงหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงตรงตำแหน่งที่ตรงกับแถบโปรตีน หากปรากฏฟองฟูขึ้นก็แสดงว่าแถบโปรตีนตรงนั้นน่าจะเป็นเอนไซม์ (แคทาเลส) ที่ทำบริสุทธิ์

2.7 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE

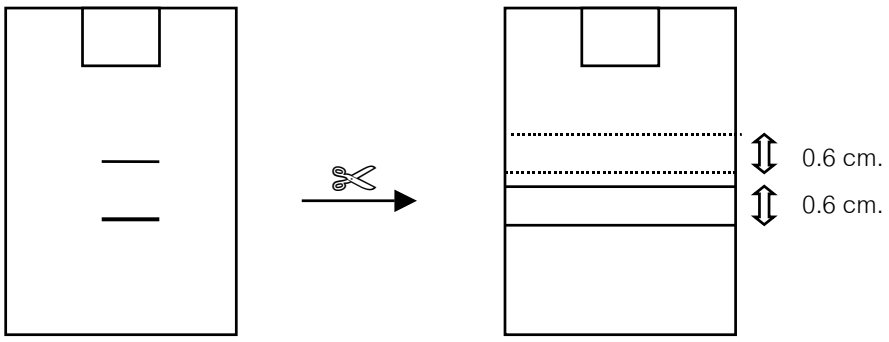
นำตัวอย่างเอนไซม์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการทดสอบในข้อ 2.6 มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์บนเจลแบบ SDS-PAGE โดยใส่ตัวอย่างเอนไซม์ลงไปในช่องที่ 1, 3, 5, 6 และ 7 ส่วนในช่องที่ 8 เป็นสารละลายบัฟเฟอร์แทนตัวอย่าง เมื่อทำการแยกโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพเรียบร้อยแล้ว จึงทำการตัดเจลในช่องที่ 1 ไปย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ส่วนช่องที่ 3, 5, 6, 7 และ 8 จะไม่ย้อมแถบโปรตีน เปรียบเทียบตำแหน่ง



แถบโปรตีนที่ย้อมด้วย

Coomassie brilliant blue R-250

Figure 3 Study plan for evaluation of enzyme activity using Native-PAGE



แถบโปรตีนที่ย้อมด้วย

Coomassie brilliant blue R-250

Figure 4 Study plan for evaluation of enzyme activity using SDS-PAGE

แถบโปรตีนในเจลของช่องที่ 3, 5, 6, 7 และ 8 กับแถบโปรตีนที่ย้อมได้ในช่องที่ 1 แล้วทำการตัดเจลของช่องที่ 3, 5, 6, 7 และ 8 ซึ่งตรงกับแถบโปรตีนที่ย้อมได้ในช่องที่ 1 (Figure 4) หลังจากนั้นทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (แคทาเลส) ที่ทำบริสุทธิ์ โดยการหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ลงไปตรงแถบที่ตัดเจลไว้ หากปรากฏฟองฟู่ที่แถบโปรตีนก็แสดงว่าแถบโปรตีนบริเวณนั้นน่าจะเป็นเอนไซม์ (แคทาเลส) ที่ทำบริสุทธิ์

3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

3.1 พีเอชที่เหมาะสม (Optimum pH)

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์สกัดเริ่มต้นและเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) โดยนำสารละลายเอนไซม์ใส่ลงในสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 และสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 9.0, 10.0 และ 11.0 แล้วตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.2 ความคงตัวต่อพีเอช (pH stability)

ศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ โดยการผสมสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้นและเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) ในสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 และสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 9.0, 10.0 และ 11.0 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที แล้วนำมาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimum temperature)

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการนำสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้นและเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) เติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.1) ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

3.4 **ความคงตัวต่ออุณหภูมิ** (Temperature stability)

ศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้นและเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) ทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับแล้วนำมาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.5 **ผลของอิออนโลหะและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์**

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอิออนของโลหะต่างๆ ละลายอยู่ในอัตราส่วนสารละลายเอนไซม์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:1) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่าที่ต้องการ (Table 3) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที แล้วจึงตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.6 **การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์แคทาเลส**

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) บ่มในสารละลายสับเสตรต เพื่อทดสอบหาค่า K_m ของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 10, 15, 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิโมลาร์ นำมาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม (ผลการทดลองจากข้อ 3.1 และข้อ 3.3) ค่า K_m และค่า V_{max} หาได้จากการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk โดยเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ส่วนกลับของกิจกรรมหรือความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ [1/V] กับ ส่วนกลับของความเข้มข้นของสับเสตรต [1/S]

Table 3 Ions and some chemicals at various concentration

Ions and chemicals	Concentration
KCl	10^{-2} M
NaCl	10^{-2} M
$CaCl_2$	10^{-2} M
$MgCl_2$	10^{-2} M
$ZnSO_4$	10^{-2} M
$CuSO_4$	10^{-2} M
EDTA	10^{-2} M
NaN_3	10^{-6} M
Ethanol	2.0 %
Methanol	2.0 %
SDS	0.5 %

SDS = Sodium dodecyl sulfate

EDTA = Ethylenediaminetetra acetic acid