

ภาคผนวก ค

การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

1. การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography)

1.1 การใช้เรซิน DEAE-Toyopearl 650M (Ion-exchange column chromatography)

เตรียมโดยนำ DEAE-Toyopearl 650M มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาล้างต่อด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยแช่ทิ้งค้างคืนไว้ แล้วล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์เดิมอีกประมาณ 2-3 ครั้ง ก่อนจะนำไปบรรจุลงคอลัมน์ เก็บเรซินที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 การใช้เรซิน Sephadex G-100 (Gel-filtration chromatography)

เตรียมโดยการดัดแปลงวิธีการของ Cooper (1977 อ้างโดย สมรภัทร์ พันธุ์ผล, 2537) โดยใช้เจลชนิด Sephadex G-100 โดยนำมาแช่น้ำกลั่นนาน 30 นาที ดูดเอาอนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยในน้ำออก แล้วทำการล้างต่อด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยแช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วนำมาล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์เดิมอีก 2-3 ครั้ง ก่อนนำไปบรรจุลงคอลัมน์ เก็บเรซินที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

คำนวณการใช้ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและเปอร์เซ็นต์ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน จากตารางภาคผนวก ค1

ตารางภาคผนวก ค1 ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต : เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว

AMMONIUM SULPHATE, GRAMS TO BE ADDED TO 1 LITRE

From %	To %	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
0		27	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761	
	5	27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723		
	10		28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685		
	15			28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647		
	20				29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609		
						25	29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571	
							30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533		
								30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495		
									35	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457		
										40	74	107	141	176	214	254	295	338	383	430		
											45	79	111	144	181	221	262	305	350	397		
												50	84	115	147	184	224	267	312	359		
													55	89	120	155	194	237	282	329		
														60	94	125	160	203	248	295		
															65	99	130	173	218	265		
																70	104	147	192	239		
																	75	110	153	199		
																		80	116	161		
																			85	122		
																				90		
																					95	
																						100

ที่มา : Scopes (1978)