3. ผลการทดลอง

3.1 SOD ในใบยาง

จากการศึกษาความว่องไวของ SOD ในใบยางพันธุ์ RRIM 600 พบว่าใบยาง 1 กรัม มี SOD อยู่ 1,125 ± 414 หน่วย (U) และมีโปรตีน 27.9 ± 8.7 มิลลิกรัม (mg) คิดเป็นความว่องไวจำเพาะ 46.9 ± 16.4 หน่วยต่อมิลลิกรัม (U/mg protein) ค่า SOD นี้ได้จากการทดลองซ้ำ จำนวน 44 ครั้ง

SOD ในใบยางอ่อน, ปานกลาง, แก่ และแก่จนเหลือง พบว่าปริมาณ SOD ในใบแก่มีความว่องไวสูงสุดเท่ากับ 1,354 ± 281 หน่วยต่อกรัม (U/g) ดังตารางที่ 5 แต่ความว่องไวของ SOD ในใบแต่ละระยะ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เนื่องจากค่า ± SD ของการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังพบว่าใบยางที่แก่ขึ้น นอกจากจะมี SOD เพิ่มขึ้นแล้ว โปรตีนยังสูงขึ้นตามอายุด้วย ทำให้ค่าความว่องไวจำเพาะของใบอ่อนมีค่าสูงสุดคือ 60.4 ± 3.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

นอกจากนี้ยังได้ศึกษา SOD และความว่องไวจำเพาะในใบและก้านใบทั้งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ RRIM 600 พบว่าปริมาณ SOD ต่อกรัม ในใบยางของทั้งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ RRIM 600 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และเมื่อพิจารณาในส่วนก้านใบนั้นพบว่ามีความว่องไวของ SOD ต่อกรัม ต่ำกว่าในใบยางทั้งในพันธุ์พื้นเมืองและยางพันธุ์ RRIM 600 (650 หน่วย เทียบกับ 1,230 หน่วย ในยางพันธุ์พื้นเมือง; 556 และ 1,275 หน่วย ในยางพันธุ์ RRIM 600) ดังตารางที่ 6 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนในก้านใบจะพบว่ามีโปรตีนน้อยกว่าในใบยางมาก จึงทำให้ค่าความว่องไวจำเพาะของ SOD ในก้านใบ สูงกว่าในใบยางทั้งในยางพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ RRIM 600 โดยในก้านใบยางพันธุ์พื้นเมืองมีความว่องไวจำเพาะค่อนข้างจะสูงกว่าในก้านใบของยางพันธุ์ RRIM 600 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

เนื่องจากว่าใบยางมี SOD ต่อกรัม สูงกว่าในก้านใบ ทั้งในยางพันธุ์ RRIM 600 และพื้นเมือง จึงเลือกใช้ยางพันธุ์ RRIM 600 เพื่อสกัด SOD มาศึกษาเพราะว่าใบยางพันธุ์ RRIM 600 หาได้ง่ายกว่าพันธุ์พื้นเมือง นอกจากนี้น้ำหนักของใบยางเทียบกับก้านใบแล้ว น้ำหนักใบ 1 ใบจะหนักมากกว่าก้านใบ

ตารางที่ 5 SOD ในใบยางพาราสายพันธุ์ RRIM 600 ระยะต่าง ๆ

ใบยาง	SOD activity (U/g)	ปริมาณโปรตีน (mg/g)	Specific activity (U/mg protein)
ใบอ่อน	1,280 ± 221	21.2 ± 3.6	60.4 ± 3.8
ใบแก่ปานกลาง	1,041 ± 422	27.2 ± 2.5	43.7 ± 21.2
ใบแก่	1,354 ± 281	35.4 ± 8.3	42.1 ± 21.6
ใบแก่จนเหลือง	1,197 ± 106	38.0 ± 5.9	32.7 ± 4.4

ค่าเฉลี่ยของ SOD และโปรตีนในใบยางระยะใบอ่อน, ใบปานกลาง, ใบแก่ และใบแก่จนเหลือง ค่า ± SD จากการทดลองโดยใช้ตัวอย่างชุดละ 9 ตัวอย่าง ยกเว้นในกรณีใบแก่จนเหลืองที่ใช้ 8 ตัวอย่าง

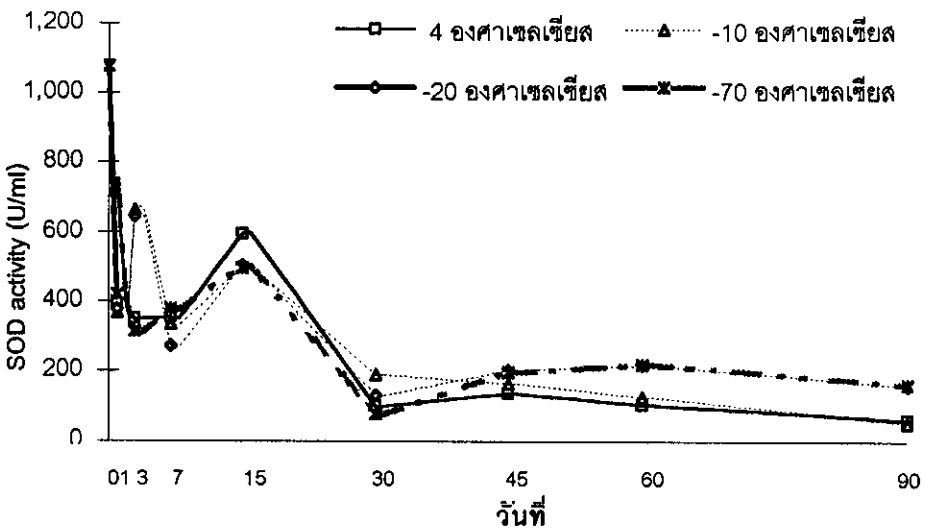
ตารางที่ 6 SOD ในใบยางและก้านใบยางพาราพื้นเมืองและพันธุ์ RRIM 600

ตัวอย่าง	SOD activity (U/g)	Protein (mg/g)	Specific activity (U/mg protein)
ใบยางพื้นเมือง (n=5)	1,230 ± 222	26.9 ± 4.8	46.7 ± 11.2
ก้านใบพื้นเมือง (n=5)	650 ± 492	3.9 ± 2.4	152.1 ± 40.1
ใบยาง RRIM600 (n=13)	1,275 ± 448	25.0 ± 6.9	51.5 ± 17.5
ก้านใบ RRIM600 (n=13)	556 ± 494	4.5 ± 1.8	117.4 ± 91.4

ค่าเฉลี่ยของ SOD และโปรตีนโดยคำนวณจากตัวอย่าง 1 กรัม ± SD

3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสารสกัดใบยาง

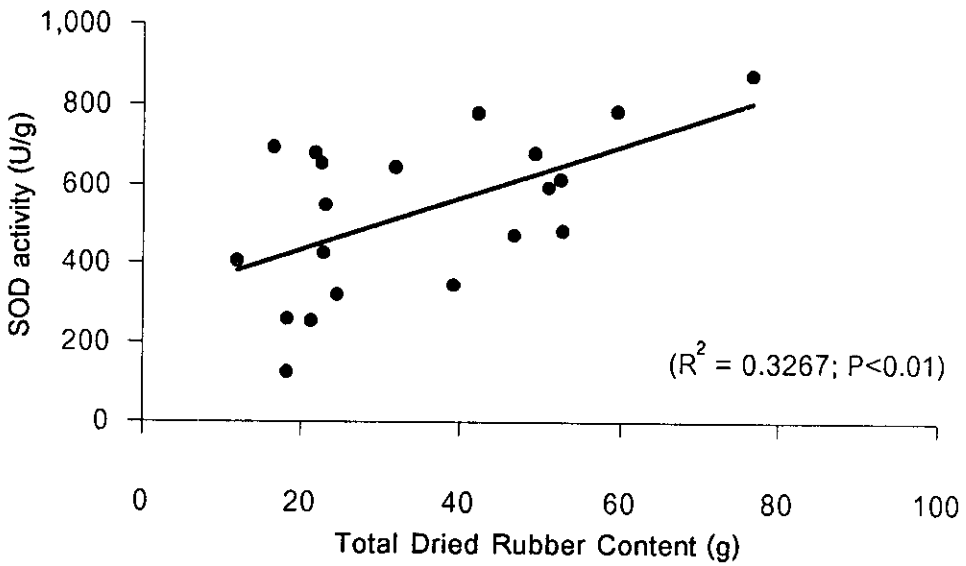
สารสกัดจากใบยางที่มี SOD เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าความว่องไวของ SOD ลดลงอย่างรวดเร็ว ดังรูปที่ 3 โดยความว่องไวของเอนไซม์ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 และ –70°C มีค่ามากกว่า 4 และ -10 °C โดยเฉพาะวันที่ 90 ดังรูปที่ 3



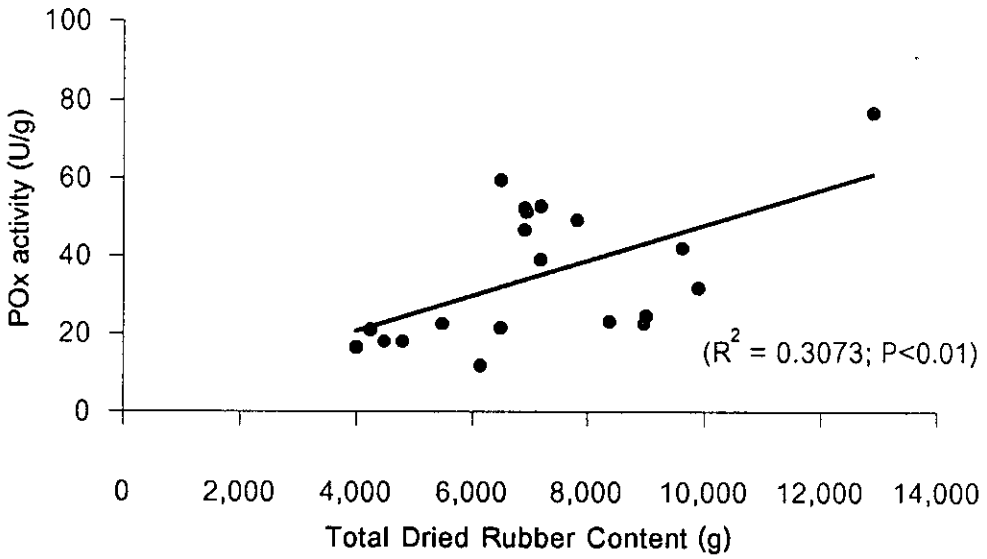
รูปที่ 3 ผลการเก็บสารสกัดใบยาง ซึ่งมีความว่องไวเริ่มต้น 1,075 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีน 10.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4, -10, -20และ –70°C เป็นเวลาต่าง ๆ กันจนถึง 3 เดือน

3.3 สัมพันธ์ระหว่าง SOD, POx ในใบยางและปริมาณเนื้อยาง (DRC)

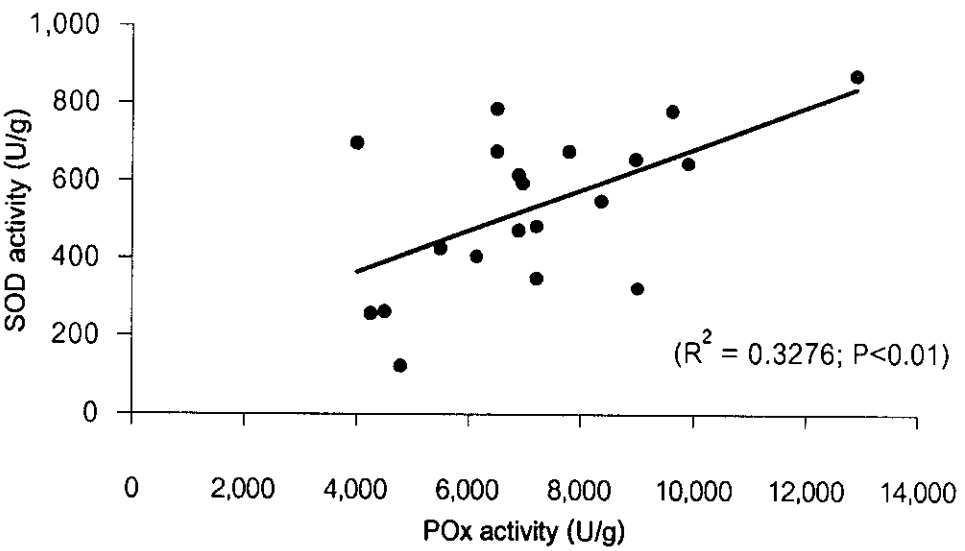
การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SOD และ POx ในใบยางและปริมาณเนื้อยางที่กรีดได้จากต้นยางที่เก็บใบมาศึกษาในวันเวลาเดียวกันจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่า SOD ในใบยางมีความสัมพันธ์กับปริมาณเนื้อยางแห้งที่กรีดได้ เพียงเล็กน้อยด้วยค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เท่ากับ 0.57 ดังรูปที่ 4 และถ้าศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง POx ในใบยางกับเนื้อยางแห้งที่กรีดได้ ก็พบว่ามีความสัมพันธ์กันต่ำด้วยค่าสหสัมพันธ์เพียง 0.55 ดังรูปที่ 5 และเมื่อนำปริมาณ SOD และ POx ในใบยางที่เก็บจากต้นเดียวกันในเวลาเดียวกันมาศึกษาหาความสัมพันธ์พบว่าปริมาณเอนไซม์ทั้งสองนี้ก็มีความสัมพันธ์กันน้อยด้วยค่าสหสัมพันธ์ 0.57 ดังรูปที่ 6



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง SOD activity ในใบยางพาราน้ำหนัก 1 กรัมและปริมาณเนื้อยางแห้งในน้ำยาง (total Dried Rubber Content; DRC) จำนวน 20 ตัวอย่าง



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง POx activity ในใบยางพาราน้ำหนัก 1 กรัมและปริมาณเนื้อยางแห้งในน้ำยาง (DRC) จำนวน 20 ตัวอย่าง



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์ SOD และ POx ในใบยางพาราหนัก 1 กรัม จำนวน 20 ตัวอย่าง

3.4 การทำให้ SOD จากใบยางสกัดมีความบริสุทธิ์ขึ้น

3.4.1 การทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้น โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย 40-70% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตตามด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

จากการสกัดใบยางพารา 100 กรัม พบว่าสารสกัดใบยางมีความว่องไวเริ่มต้น 153,900 หน่วย มีปริมาณโปรตีน 1,939 มิลลิกรัม และความว่องไวจำเพาะ 79.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังทำการตกตะกอนโปรตีนอื่นออกด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความอิ่มตัวเป็น 40% พบว่า SOD ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนสารละลายส่วนใส S_2 ความว่องไวลดลงเหลือ 118,900 หน่วย มีปริมาณโปรตีน 861 มิลลิกรัม และค่าความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 138.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเมื่อนำ S_2 มาตกตะกอน SOD ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความอิ่มตัวเป็น 70% พบว่ามี SOD ทั้งในสารละลายส่วนใส S_3 และตะกอน P_3 ด้วย (ดังตารางที่ 7)

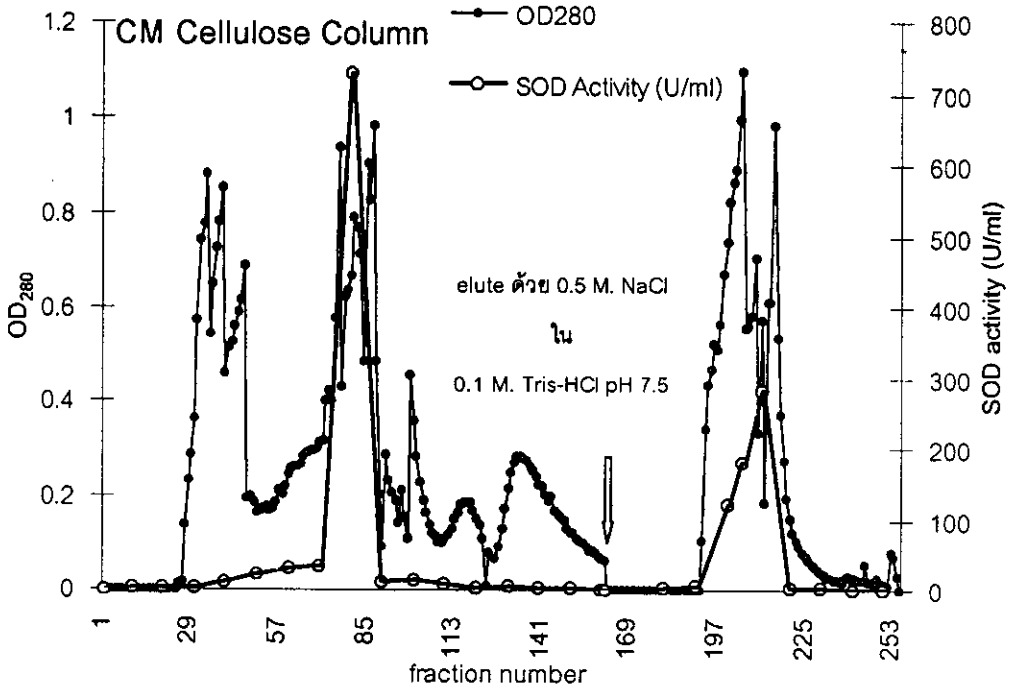
ค่าความว่องไวใน S_3 มีค่าสูงกว่า P_3 มาก (95,325 ต่อ 13,066 หน่วย) แต่ปริมาณโปรตีนใน P_3 มีค่ามากกว่า S_3 เพียงเล็กน้อย 447 และ 512 มิลลิกรัมตามลำดับ ค่าความว่องไวจำเพาะของ SOD ใน S_3 มากกว่า P_3 มาก (186.2 และ 29.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ) จึงเลือก S_3 มาทำให้ SOD บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้คอลัมน์ CM-Cellulose ต่อไป

เมื่อนำ SOD ที่ได้ใน S_3 ไปทำการแยกเอาโปรตีนอื่น ๆ ออกโดยใช้คอลัมน์ พบว่า SOD จะถูกชะออกมาเป็นสองพีคคือช่วงแรกก่อนชะด้วยเกลือและหลังชะด้วยเกลือ ดังรูปที่ 7 เมื่อนำหลอดที่มีความว่องไวของเอนไซม์ SOD สูงในช่วงแรกมารวมกัน พบว่าความว่องไวลดลงเหลือ 26,775 หน่วย ปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 132 มิลลิกรัม และค่าความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 203 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน SOD มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 2.6 เท่า จากความว่องไวจำเพาะในตอนเริ่มต้น ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการแยก SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ

ส่วน	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity	% Yield	Purification fold	U/g
S_1	153,900	1,938	79.4	100	1	1,539
S_2	118,900	861	138.1	77.0	1.7	1,189
P_2	2,900	545	5.3	1.9	0.07	29
S_3	95,325	512	186.2	62.0	2.3	953
S_4	13,066	447	29.2	8.5	0.4	131
CM	26,775	132	203.0	17.4	2.6	268
G-75	380	16	23.8	0.2	0.3	3.8
CM	86	0.6	143.3	0.06	1.8	0.86

จากการทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์โดยวิธีที่ 1 นี้ เมื่อดูค่าความว่องไวจำเพาะเริ่มต้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีค่าเป็น 79.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากผ่านขั้นตอนต่าง ๆ มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 143.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.8 เท่า ได้ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส 0.06% จากการสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้น 100 กรัม

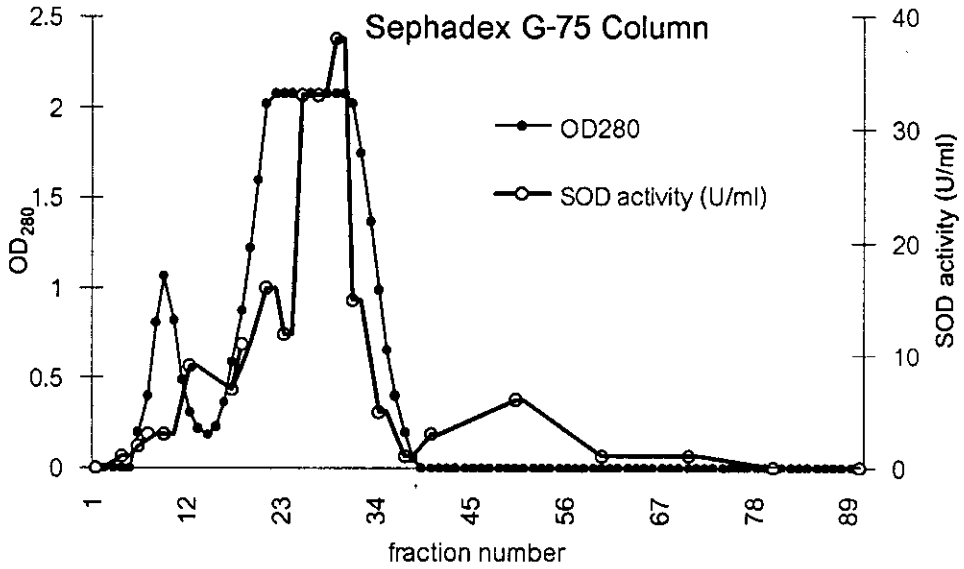


รูปที่ 7 การแยกเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจากสารสกัดใบยางที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัว 40-70% โดยคอลัมน์ CM-Cellulose ตามวิธีที่ 1

สารสกัดซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 47 มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 447 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ CM-Cellulose (2.6 X 29 เซนติเมตร) ที่ $4^{o}C$ ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า OD_{280} เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะต่อด้วย 0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดิม เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร หาความว่องไวของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ CM-Cellulose ซึ่งมีความว่องไวของ SOD สูงมาแยก SOD โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 พบว่าโปรตีนถูกชะออกมาเป็น 2 พีค คือพีคเล็กและพีคใหญ่ตามลำดับ ดังรูปที่ 8 โดยในพีคแรกซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่น้อยพบว่ามีความว่องไวของ SOD น้อยด้วย ส่วนในพีคหลังซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงพบว่ามีความว่องไวของ SOD มากตามไปด้วยดังรูปที่ 8 และพบว่ามีความว่องไวของ SOD 380 หน่วย มีปริมาณโปรตีน 16 มิลลิกรัม ความว่องไวจำเพาะลดลงเหลือเพียง 23.8 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ลดลงเหลือ 0.3 เท่า ดังตารางที่ 7

เมื่อนำ SOD ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 ซึ่งมีความว่องไวของ SOD สูง เมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ CM-Cellulose อีกครั้ง พบว่าโปรตีนถูกชะออกมา ซึ่งความว่องไวของ SOD มีค่าเท่ากับ 86 หน่วย ปริมาณโปรตีน 0.6 มิลลิกรัม และค่าความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 143.3 หน่วยต่อมิลลิกรัม ซึ่งมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.8 เท่า ดังตารางที่ 7



รูปที่ 8 การแยกเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่ได้จากคอลัมน์ CM-Cellulose โดยคอลัมน์ Sephadex G-75 ตามวิธีที่ 1

สารละลายพีคที่มีซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจากคอลัมน์ CM-Cellulose มีปริมาณโปรตีน 132 มิลลิกรัม ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 (0.8 X 35 เซนติเมตร) ที่ 4°C ชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{280} และความว่องไวของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสแต่ละหลอด

ในการปรับปรุงเพื่อที่จะให้การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้น ได้เปลี่ยนแปลงการทดลองโดยนำ S_3 ในขั้นของสารละลายหลังตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70% (S_3) มากำจัดเกลือออกด้วยการ dialyse โดยใช้ถุง dialysis (MWCF 12,000) พบว่าความว่องไวของ SOD ลดลงจาก 666 เป็น 443.2 หน่วยต่อกรัม แต่ค่าความว่องไวจำเพาะสูงขึ้นจาก 29.4 เป็น 59.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เนื่องจากปริมาตรของ S_3 เพิ่มขึ้นหลังจากการ dialyze จึงต้องนำ S_3 ที่ได้มา ทำให้เข้มข้นขึ้นก่อนนำไปลงคอลัมน์ โดยใช้ CM-Cellulose ดูดน้ำ พบว่าการใช้ CM-Cellulose ดูดน้ำเป็นระยะเวลาประมาณ 5 วัน ทำให้ค่าความว่องไวลดลงมากจาก 443 เหลือเพียง 64 หน่วยต่อกรัม เท่านั้น และค่าความว่องไวจำเพาะลดลงครึ่งหนึ่งจาก 59.3 เหลือ 30.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเมื่อพิจารณาค่าความบริสุทธิ์ 0.9 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าในส่วนสารสกัดใบยางที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการทำให้ SOD บริสุทธิ์ ซึ่งเท่ากับ 1 ในตารางที่ 8

เมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ CM-Cellulose และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Amicon centriflo membrane cone แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยคอลัมน์ Sephadex G-50 พบว่าค่าความว่องไวจำเพาะสูงขึ้นกว่าตอนเริ่มต้นเพียง 2.2 เท่าและมี SOD เหลืออยู่เพียง 0.33% ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการแยก SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ

ส่วน	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity	% Yield	Purification fold	U/g
S_1	73,800	2,160	34.2	100	1	1,476
S_2	61,600	1,500	41.1	83.5	1.2	1,232
P_2	4,325	800	5.4	5.9	0.2	86.5
S_3	33,300	1,132	29.4	45.1	0.9	666
S_4	3,165	108	29.3	4.3	0.9	63.3
S_5	150	1.2	125	0.2	3.7	3.0
$S_{3\ dialyze}$	22,161	374	59.3	30.0	1.7	443.2
$S_{3\ conc.}$	3,200	106	30.2	4.3	0.9	64
CM	320	11.2	28.6	0.4	0.8	6.4
centriflo	189	4	47.3	0.26	1.4	3.8
G-50	240	3.2	75	0.33	2.2	4.8

จากการทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์โดยวิธีที่ 1 นี้ เมื่อดูค่าความว่องไวจำเพาะเริ่มต้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีค่าเป็น 34.2 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากผ่านขั้นตอนต่าง ๆ มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 75 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.2 เท่า ได้ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส 0.33% จากการสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้น 50 กรัม

นอกจากนี้ ยังได้พยายามปรับเปลี่ยนการทดลองโดยนำ S_3 มาลดปริมาตรโดยใช้ CM-Cellulose ดูดน้ำ ก่อนนำมาผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose พบว่าการดูดน้ำออกโดยใช้ CM-Cellulose ทำให้ความว่องลดลงจาก 844 เหลือเพียง 363 หน่วยต่อกรัม และค่าความว่องไวจำเพาะลดลงจาก 51.5 เป็น 34.5 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อนำไปทำให้ SOD บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยนำมาผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose 2 ครั้ง แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมโดยในครั้งแรก ทำให้ค่าความว่องไวลดลงจาก 363 เป็น 217 หน่วยต่อกรัม และค่าความว่องไวจำเพาะลดลงจาก 34.5 เป็น 23.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ดังตารางที่ 9

จากการนำ S_3 มาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ กัน เช่น เอาเกลือออกและลดปริมาตรเพื่อให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นก่อนทำการแยก SOD ต่อไปโดยคอลัมน์ CM-Cellulose จะเห็นว่าทำให้ความว่องไวลดลงอย่างมากและไม่สามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้ดีกว่าการแยกโดยใช้สารละลาย S_3 ผ่านคอลัมน์ CM-Cellulose โดยตรงและเนื่องจาก S_3 เป็นส่วนของสารละลายซึ่งมีปริมาตรมาก จึงได้ปรับปรุงโดยพยายามตกตะกอน SOD โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80% เพื่อทำให้ SOD ตกตะกอนอยู่ในส่วนตะกอน P_3 แล้วจึงละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์เดิมด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุดแล้วจึงนำสารละลายที่ได้ (S_4) ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีต่อไป ดังวิธีที่ 2

ตารางที่ 9 ผลการแยก SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ

ส่วน	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity	% Yield	Purification fold	U/g
S_1	45,864	1,110	41.3	100	1	1,835
S_2	23,086	572	40.4	50.3	0.98	923
P_2	5,400	126	42.9	11.8	1.04	216
S_3	21,105	410	51.5	46.0	1.25	844
S_4	2,976	122	24.4	6.5	0.59	119
$S_{3\ conc.}$	9,075	263	34.5	19.8	0.84	363
CM	5,434	231	23.5	11.8	0.57	217

จากการทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์โดยวิธีที่ 1 นี้ เมื่อดูค่าความว่องไวจำเพาะเริ่มต้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีค่าเป็น 41.3 หน่วย ต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากผ่านขั้นตอนต่าง ๆ มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 23.5 หน่วย ต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 0.57 เท่า ได้ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส 11.8% จากการสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้น 25 กรัม

3.4.2 ผลการทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามวิธีที่ 2

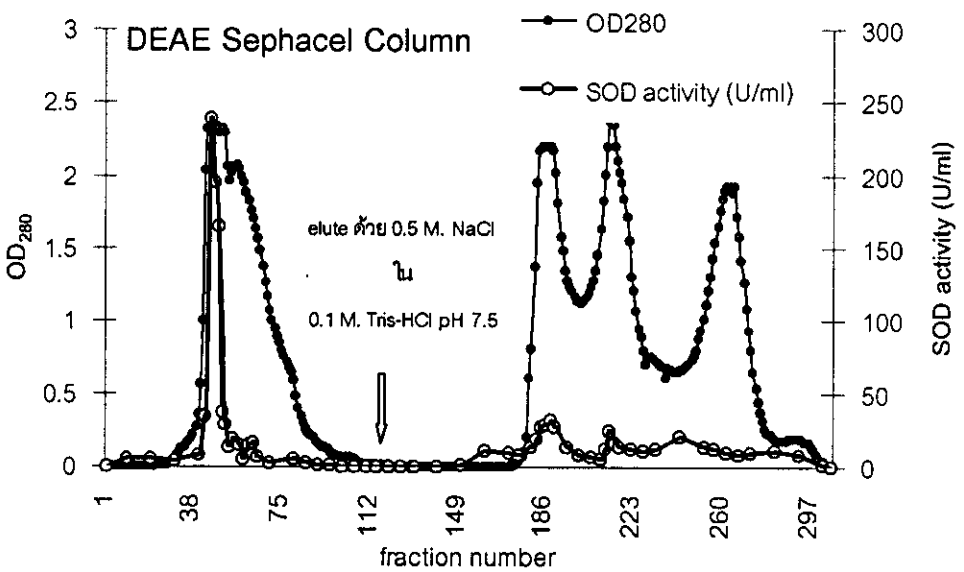
ความว่องไวเริ่มต้นของสารสกัดใบยางเท่ากับ 1,253 หน่วยต่อกรัม เมื่อทำการตะกอน SOD ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความอิ่มตัวเป็น 40% พบว่าในส่วน S_2 มีความว่องไวของ SOD สูงถึง 63% (783 หน่วยต่อกรัม) มีปริมาณโปรตีนซึ่งละลายอยู่ 30.9% (114 มิลลิกรัม) และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 2 เท่า เมื่อทำการตกตะกอน SOD ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 80% พบว่าความว่องไวของ SOD กระจายอยู่ทั้งในส่วน S_3 และตะกอน P_3 (ที่เมื่อนำไปละลายแล้วเรียก S_4) เท่ากับ 488 และ 284 หน่วยต่อกรัม ตามลำดับ ความว่องไวจำเพาะในส่วน S_3 มีค่าสูงกว่าในส่วน S_4 ถึง 14 เท่า คือ 1,209 และ 73.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนของทั้ง S_3 และ S_4 พบว่ามีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 10.1 และ 96.6 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ในการทดลองนี้เลือก S_4 มาแยก SOD ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นแทนที่จะเป็น S_3 เพราะจากการทดลองเบื้องต้นทำให้ทราบว่าค่าความว่องไวสูงใน S_3 นั้น อาจเนื่องมาจาก สารน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ไม่ได้ถูกกำจัดออก ทำให้ดูเสมือนมีความว่องไวสูงเกินความเป็นจริง จึงเลือกนำส่วน S_4 มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel ชะด้วยบัฟเฟอร์เดิม พบว่าโปรตีนถูกชะออกมาเป็น 2 ช่วง ที่มีขนาดไม่เท่ากัน โดยช่วงแรกมีขนาดเล็กและช่วงหลังมีขนาดใหญ่ พบว่าความว่องไวส่วนใหญ่อยู่ในช่วงแรกซึ่งมีค่าเท่ากับ 30 หน่วยต่อกรัม และมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 0.2 เท่า เมื่อชะด้วย 0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดิม พบว่าโปรตีนถูกชะออกมาเป็น 3 พีคที่มีขนาดเท่า ๆ กัน ซึ่งมีความว่องไวน้อยมาก รูปที่ 9 จึงนำหลอดที่มีความว่องไวสูงจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าโปรตีนถูกชะออกมาเป็น 2 พีคที่มีขนาดไม่เท่ากัน ประกอบด้วย 1 พีคใหญ่และ 1 พีคเล็กตามลำดับ รูปที่ 10 ความว่องไวในพีคแรกเท่ากับ 8.8 หน่วยต่อกรัม และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 1.6 เท่า ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการแยก SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ

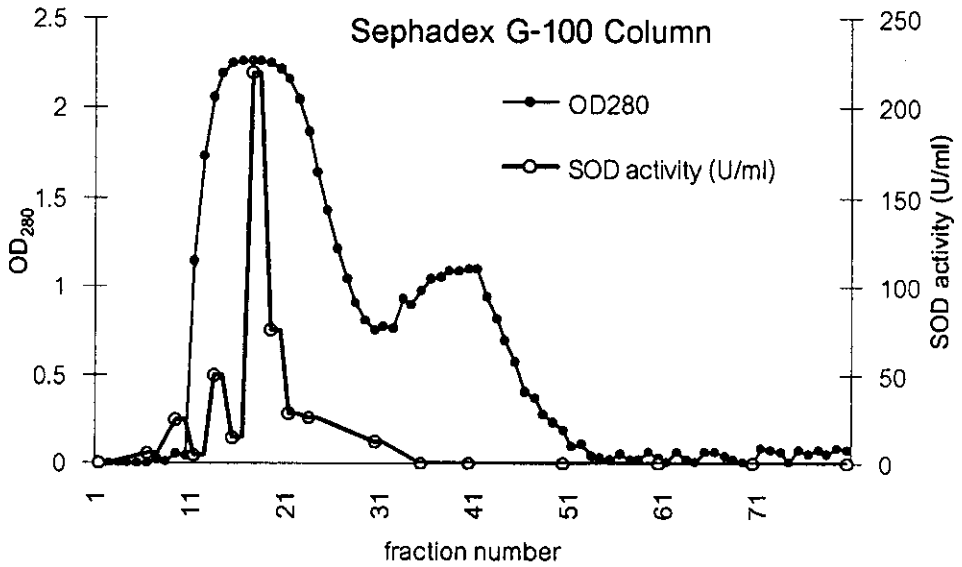
ส่วน	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity	% Yield	Purification fold	U/g
S_1	31,320	369	84.9	100	1	1,253
S_2	19,570	114	171.7	62.5	2.0	783
P_2	3,600	212	17.0	11.5	0.2	144
S_3	12,208	10.1	1,209	39.0	14.2	488
S_4	7,112	96.9	73.4	22.7	0.9	284
DEAE	750	44	17.0	2.4	0.2	30
G-100	220	1.6	137.5	0.7	1.6	8.8

จากการทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์โดยวิธีที่ 2 นี้ เมื่อดูค่าความว่องไวจำเพาะเริ่มต้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีค่าเป็น 84.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากผ่านขั้นตอนต่าง ๆ มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 137.5 หน่วย ต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.6 เท่า ได้ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส 0.7% จากการสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้น 25 กรัม



รูปที่ 9 การแยกเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจากสารสกัดใบยาง ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัว 40-80% โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ตามวิธีที่ 2 (น้ำหนักใบยางสด 25 กรัม)

สารสกัดซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 14 มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีน 96.6 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2 X 29 เซนติเมตร) ที่ 4°C ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า OD_{280} มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะต่อด้วย 0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดิม เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร หาความว่องไวของซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในแต่ละหลอด



รูปที่ 10 การแยกเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจากสารละลายโปรตีนพีคที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยคอลัมน์ Sephadex G-100 (น้ำหนักใบยางสด 25 กรัม)

ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel มีปริมาณโปรตีน 44 มิลลิกรัม ผ่านลงคอลัมน์ Sephadex G-100 (0.8 X 44 เซนติเมตร) ที่ 4°C ชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดตามการดูดกลืนแสงที่ OD_{280} และความว่องไวของเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสแต่ละหลอด

3.9.3 การหาความว่องไวของเอนไซม์โดยใช้ cytochrome c

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีที่ 1 และ 2 พบว่าแม้จะมีการกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้มากพอสมควร แต่ความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ไม่ได้สูงขึ้นมากนัก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์เสียสภาพทางธรรมชาติระหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยเฉพาะเมื่อใช้ใบยางเริ่มต้นน้อยเพียง 25 กรัม จึงได้ทำการทดลองตามวิธีที่ 2 ซ้ำ โดยเพิ่มปริมาณใบยางเป็น 100 กรัม และเลือกเก็บเฉพาะหลอดที่มีความว่องไวสูงมาทำให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไป ซึ่งพบว่าเมื่อผ่าน SOD ลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel การแยกโปรตีน แยกได้ไม่ดีเท่ากับเมื่อใช้ใบยางเพียง 25 กรัม ดังรูปที่ 11 และเมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 การแยกเอนไซม์ก็ยังไม่ดี ดังรูปที่ 12 เมื่อเทียบกับการทดลองที่ใช้ใบยาง 25 กรัมในรูปที่ 10 แต่เมื่อพิจารณาผลการแยกใน ตารางที่ 11 จะพบว่า ความบริสุทธิ์ของ SOD ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephadex G-100 จะสูงขึ้นเมื่อเทียบกับตารางที่ 10 โดยเอนไซม์ในขั้นตอนคอลัมน์ Sephadex G-100 คอลัมน์ มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็น 2 เท่า

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีที่ 2 พบว่า ความว่องไวของเอนไซม์อยู่ใน S_3 มากกว่าใน S_4 ทั้ง ๆ ที่มีโปรตีนน้อยกว่า S_4 ดังตารางที่ 10 และการที่พบว่าเมื่อต้มสารสกัดที่ $100^{\circ}C$ เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แต่ยังคงมีความว่องไวของเอนไซม์อยู่สูงถึง 45% ทำให้คิดว่าความว่องไวที่หาจากการใช้วิธี NBT อาจให้ผลที่สูงเกินจริง อาจมีสารน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งมีผลต่อการวิเคราะห์ปนอยู่ด้วย จึงได้เปลี่ยนมาใช้วิธี cytochrome c จากตารางที่ 12 การหาความว่องไวของ SOD โดยใช้วิธีที่ 2 (cytochrome c method) นี้ จะให้ค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 58 เท่า ซึ่งสูงกว่าวิธี NBT ถึง 20 เท่า

ตารางที่ 11 ผลการแยก SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ (NBT method)

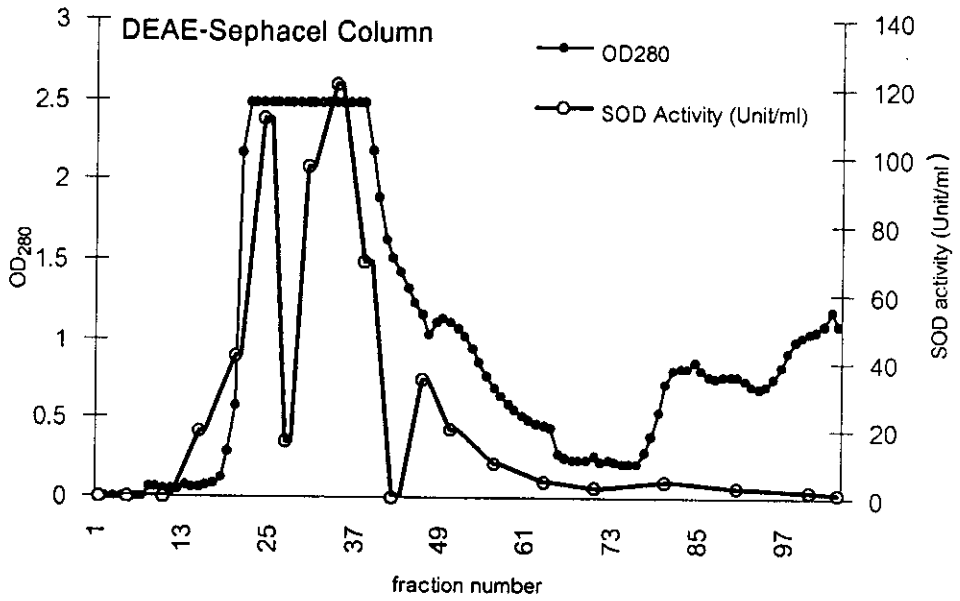
ส่วน	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity	% Yield	Purification fold	U/g
S_1	37,030	2,024	18.3	100	1	370.3
S_4	11,106	405	27.4	30	1.5	111.1
DEAE	106	3.3	32	0.3	1.7	106.0
G-100	16	0.28	57.1	0.04	3.1	1.6

จากการทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์โดยวิธีที่ 2 นี้ เมื่อดูค่าความว่องไวจำเพาะเริ่มต้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีค่าเป็น 18.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากผ่านขั้นตอนต่าง ๆ มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 57.1 หน่วย ต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.1 เท่า ได้ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเพียง 0.04% จากการสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้น 100 กรัม

ตารางที่ 12 ผลการแยก SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนต่าง ๆ (cytochrome c method)

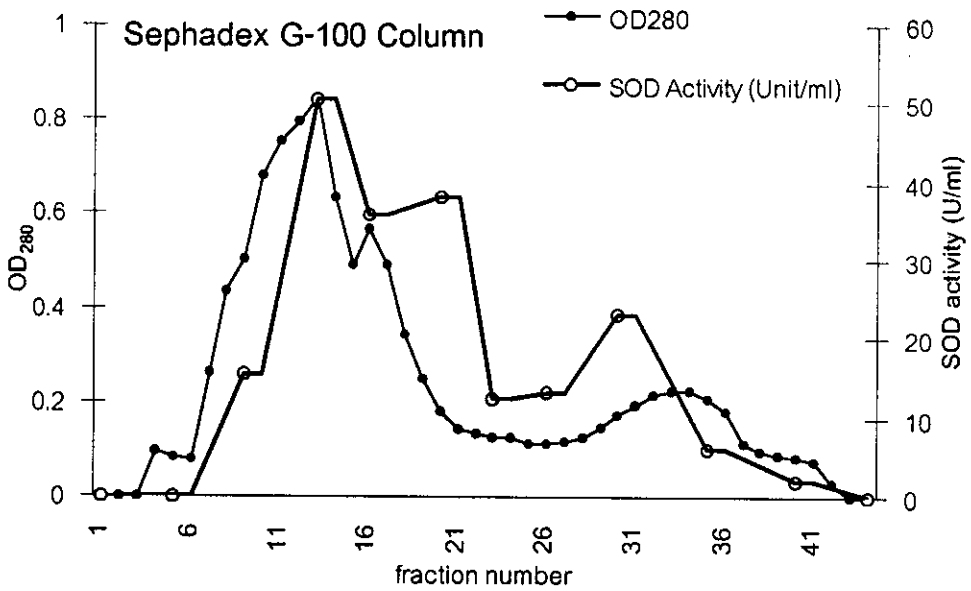
ส่วน	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity	% Yield	Purification fold	U/g
S_1	9,660	2,024	4.7	100	1	96.6
S_4	3,063	405	7.6	31.7	1.6	30.6
DEAE	266	3.3	80.0	2.8	17.0	26.6
G-100	77	0.28	275.0	0.8	58.0	0.77

จากการทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์โดยวิธีที่ 2 นี้ เมื่อดูค่าความว่องไวจำเพาะเริ่มต้นก่อนการทำให้บริสุทธิ์มีค่าเป็น 4.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากผ่านขั้นตอนต่าง ๆ มีความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 275.0 หน่วย ต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 58.0 เท่า ได้ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสเพียง 0.8% จากการสกัดใบยางพาราในตอนเริ่มต้น 100 กรัม



รูปที่ 11 การแยกเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจากสารสกัดใบยาง ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความอิ่มตัว 40-80% โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ตามวิธีที่ 2

สารสกัดซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีน ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 14 มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีน 96.6 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2 X 29 เซนติเมตร) ที่ 4°C ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จนค่า OD_{280} มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะต่อด้วย 0.5 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดิม เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร หาความว่องไวของซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในแต่ละหลอด



รูปที่ 12 การแยกเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจากสารละลายโปรตีนพีคที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยคอลัมน์ Sephadex G-100

ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel มีปริมาณโปรตีน 3.3 มิลลิกรัม ผ่านลงคอลัมน์ Sephadex G-100 (0.8 X 44 เซนติเมตร) ที่ 4°C ชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดตามการดูดกลืนแสงที่ OD_{280} และความว่องไวของเอนไซม์ ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในแต่ละหลอด

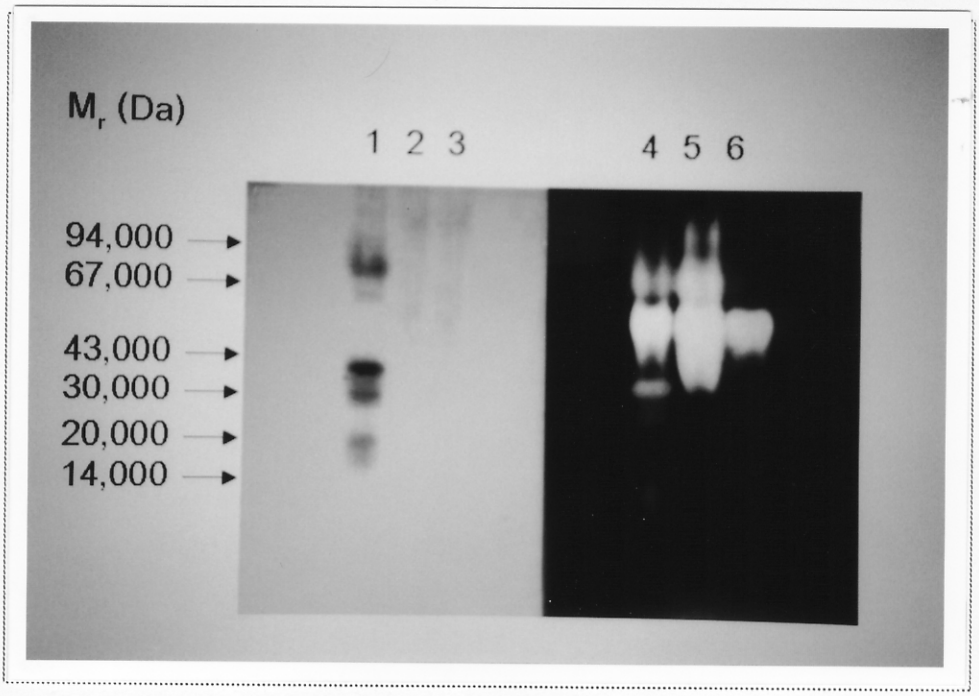
3.5 ความบริสุทธิ์ของ SOD ที่แยกได้

แม้ว่า SOD ที่แยกได้จะมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นถึง 58 เท่า โดยวิธี cytochrome c แต่เมื่อนำ SOD ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ ND-PAGE และ SDS-PAGE แล้วทำการย้อมโปรตีนและความว่องไวของเอนไซม์ SOD ตามหัวข้อ 2.10.3 จะพบว่าเอนไซม์ที่แยกได้ยังมีโปรตีนปนอยู่หลายแถบ ดังรูปที่ 13 และ14

3.6 น้ำหนักโมเลกุลของ SOD ที่แยกได้จากใบยางพารา

ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของ SOD ที่แยกได้จากใบยางพาราใน 3.4.2 โดยการใช้ ND-PAGE และ SDS-PAGE และมีโปรตีนมาตรฐานขนาดต่าง ๆ อยู่ด้วย พบว่า SOD ที่แยกได้ มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 137,088, 88,920 และ 56,104 ดาลตันจากการใช้ ND-PAGE และเมื่อใช้ SDS-PAGE น้ำหนักโมเลกุลของ SOD ที่ได้คือ 71,614, 47,643 และ 16,069 ดาลตัน ตามลำดับ ดังรูปที่ 13, 14, 15 และ 16

นอกจากนี้พบว่า SOD ที่สกัดได้จากใบยางเมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับ KCN ความเข้มข้น 266 mM ค้างคืนที่ 4^{o}C ก่อนนำไปแยกโดย ND-PAGE และย้อมด้วย NBT พบว่า SOD มีความทนต่อ KCN สูงมาก ดังรูปที่ 17 และ SOD ที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี G-100 เมื่อนำไปทำ SDS-PAGE โดยมีและไม่มี β-mercaptoethanol ใน Sample buffer พบว่า β-mercaptoethanol ทำให้แถบของ SOD มีขนาดเล็กลงกว่า เมื่อไม่มี β-mercaptoethanol และ SOD ที่ผสมกับกับ 8 M Urea ในอัตราส่วน 1 : 1 นั้น ไม่ทำให้แถบของ SOD ขนาดเล็กลง



รูปที่ 13 โปรตีน และ SOD ในโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ ND-PAGE ของ SOD ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-100 ตามวิธีที่ 2

แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW

แถวที่ 2,3 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีโปรตีน 10 μg

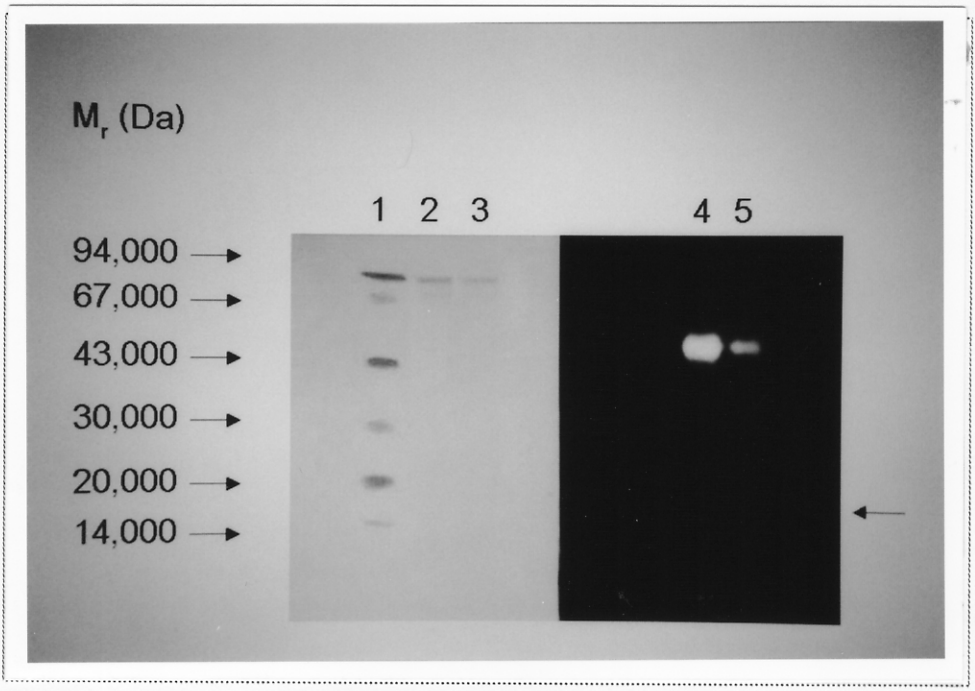
แถวที่ 4 สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW

แถวที่ 5 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีโปรตีน 3 μg

แถวที่ 6 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 ซึ่งเจือจาง 10 เท่ามีโปรตีน 0.3 μg

แถวที่ 1-3 ย้อมโปรตีนแบบคูแมซีบลู

แถวที่ 4-6 ย้อม SOD โดยใช้ NBT



รูปที่ 14 โปรตีน และ SOD ในโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ SDS-PAGE ของ SOD ที่ผ่านทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-100 ตามวิธีที่ 2

แถวที่ 1 สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด LMW

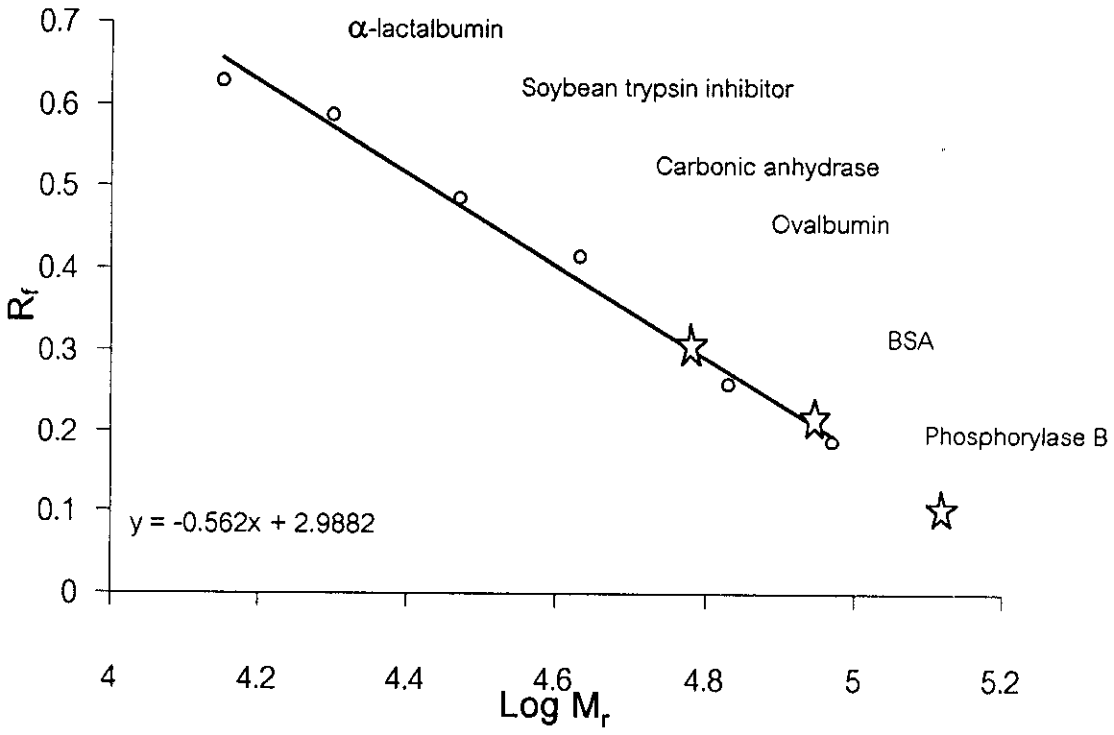
แถวที่ 2,3 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีโปรตีน 10 μg

แถวที่ 4 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีโปรตีน 1 μg

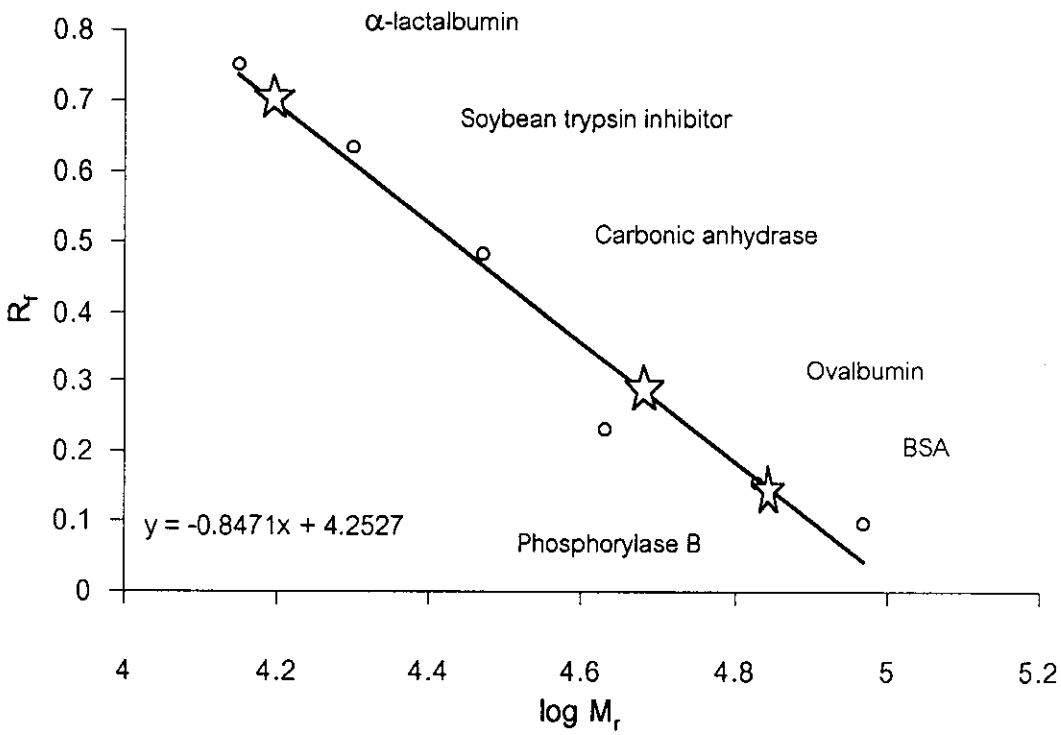
แถวที่ 5 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีโปรตีน 0.5 μg

แถวที่ 1-3 ย้อมโปรตีนแบบคูมาซีบลู

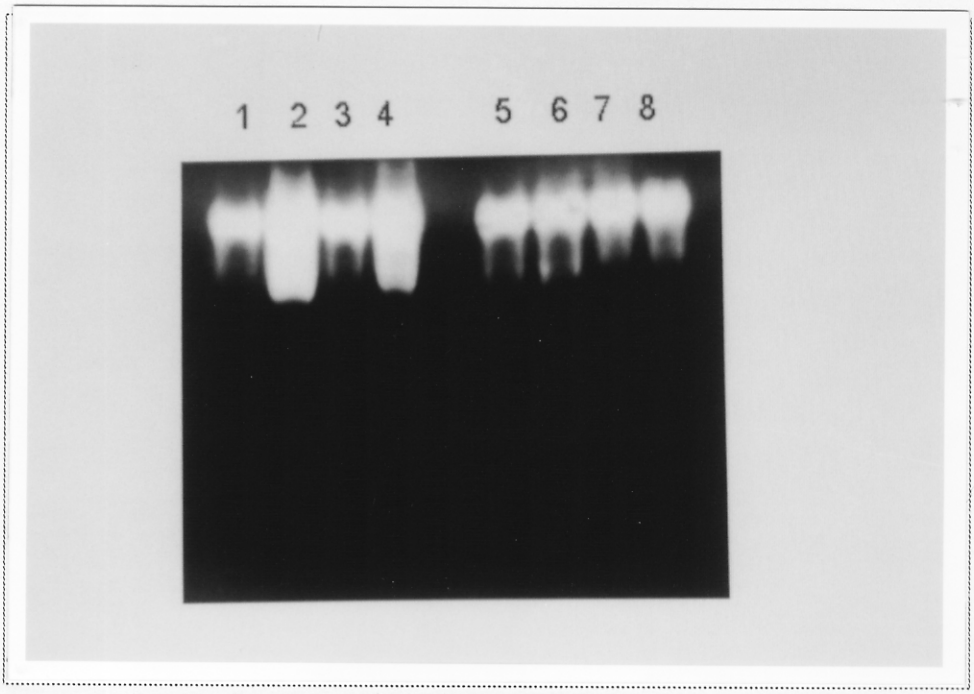
แถวที่ 4-5 ย้อม SOD โดยใช้ NBT



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลของ SOD ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Sephadex G-100 โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ ND-PAGE โดย plot ระหว่าง Log M_r ของโปรตีนมาตรฐานและ R_f ซึ่งเป็นค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด; โดย☆ แทนน้ำหนักโมเลกุลของ SOD เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลของ SOD ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Sephadex G-100 โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS โดย plot ระหว่าง Log M_r ของโปรตีนมาตรฐานและ R_f ซึ่งเป็นค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด; โดย☆ แทนน้ำหนักโมเลกุลของ SOD เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 17 SOD ในโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ ND-PAGE ซึ่งมี KCNของ S_1 และ SOD ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G-100 ตามวิธีที่ 2 โดยผสม SOD 10 µl + Sample buffer 10 µl และ KCN 800 mM 10µl ตั้งค้างคืน ก่อนนำมาแยกโดย ND-PAGE เปรียบเทียบกับ SOD 10 µl + Sample buffer 20 µl แล้วย้อม SOD ด้วย NBT

แถวที่ 1 สารสกัด SOD จากใบยางพาราซึ่งเจือจาง 10 เท่ามีปริมาณโปรตีน 1 µg

แถวที่ 2 สารสกัด SOD จากใบยางพารา มีโปรตีน 10 µg

แถวที่ 3 สารสกัด SOD จากใบยางพาราเจือจาง 10 เท่าซึ่งมี KCN

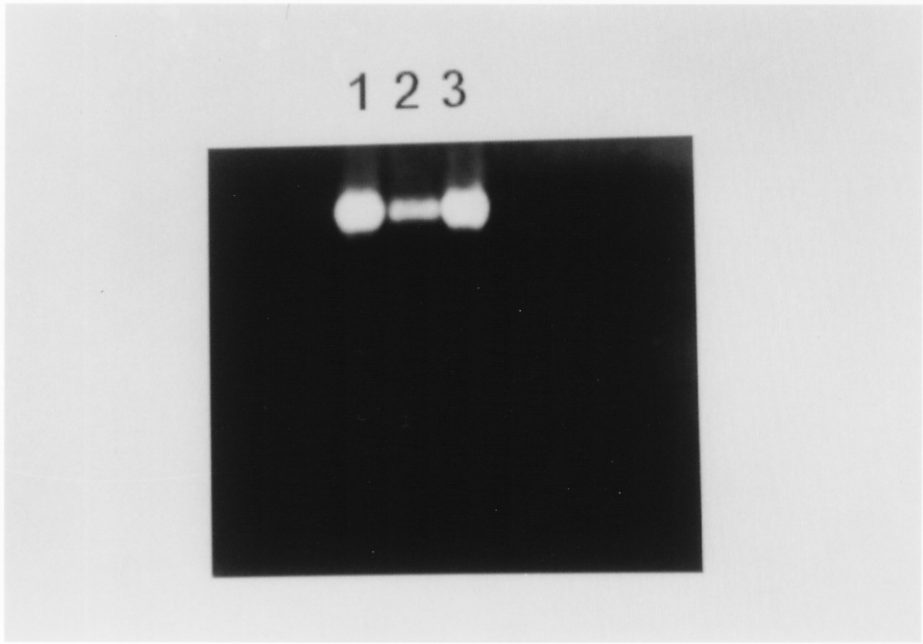
แถวที่ 4 สารสกัด SOD จากใบยางพาราซึ่งมี KCN

แถวที่ 5 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 เจือจาง 10 เท่ามีโปรตีน 0.1 µg

แถวที่ 6 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มีโปรตีน 1 µg

แถวที่ 7 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 ซึ่งมี KCN

แถวที่ 8 สารละลาย SOD พีคที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 เจือจาง 10 เท่าซึ่งมี KCN



รูปที่ 18 SOD ในโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ SDS-PAGE ซึ่งมี β-mercaptoethanol ของ SOD ที่ผ่านทำให้บริสุทธิ์ โดยคอลัมน์ Sephadex G-100 วิธีที่ 2 ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 0.6 μg โดยผสม SOD กับ Sample buffer ที่มีและไม่มี β-mercaptoethanolส่วนกรณีของ 4 M Urea นั้นใช้ SOD ผสมกับ 8 M Urea ในอัตราส่วน 1 : 1

แถวที่ 1 ไม่มี β-mercaptoethanol

แถวที่ 2 มี β-mercaptoethanol

แถวที่ 3 มี 4 M Urea

แถวที่ 1-3 ย้อม SOD โดยใช้ NBT

3.7 ผลการศึกษาสมบัติของ SOD

3.7.1 ผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของ SOD

เมื่อนำ SOD ในสารสกัดใบยางหลังจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยคอลัมน์ Sephadex G-100 (partially purified enzyme, PPE) มาอุ่นให้ร้อนถึงอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนทำการวิเคราะห์ มีผลทำให้ความว่องไวของ SOD ลดลงจาก 363 ± 82 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็น 343 ± 28 หน่วยต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 94% ของความว่องไวเริ่มต้น ณ อุณหภูมิ 30°C เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้น พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ก็ยิ่งลดลง เช่นที่ 40 °C ความว่องไวลดลงเหลือ 308 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 85% ของความว่องไวเริ่มต้น และความว่องไวลดลงอีกหากอุ่นที่ 60, 80°C และเมื่อต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือด 100 °C พบว่าความว่องไวลดลงเหลือ 72, 69 และ 62% ของความว่องไวเริ่มต้น ตามลำดับ ดังตารางที่ 13

3.7.2 ผลการต้มเอนไซม์ SOD

เมื่อต้ม SOD จากสารสกัดใบยางที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 นาน 30 นาที พบว่าค่าความว่องไวของ SOD ลดลงเพียง 38% (ตารางที่ 13) จึงอยากทราบว่าต้องต้มนานเท่าใด จึงจะทำลาย SOD ได้ จึงนำ SOD จากสารสกัดใบยางที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ซึ่งมีความว่องไว 380 ± 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร มาต้มในน้ำเดือดในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน จนถึง 2 ชั่วโมง พบว่า ความว่องไวของ SOD ที่ต้มนาน 2 ชั่วโมง ลดลงเกินครึ่งเหลือเพียง 45% ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อ SOD activity ในส่วนสารสกัด

อุณหภูมิ (^{o}C)	SOD activity (U/ml)	%
Control	363 ± 82	100
อุณหภูมิห้อง (30^{o}C)	343 ± 28	94
40	308 ± 38	85
60	263 ± 80	72
80	249 ± 56	69
100	226 ± 45	62

ค่าเฉลี่ยความว่องไว ± SD ของ SOD ที่อุ่น ณ อุณหภูมิต่าง ๆ กันเป็นเวลา 30 นาที จากการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 14 ผลของการต้ม SOD ในน้ำเดือด (100 ^{o}C) เป็นเวลาต่าง ๆ

เวลา (นาที) ที่ 100 ^{o}C	SOD activity (U/ml)	%
0 (Control)	380 ± 10	100
30	218 ± 54	57
40	200 ± 47	53
60	189 ± 56	50
120	171 ± 40	45

ค่าเฉลี่ยความว่องไว ± SD ของ SOD ที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C เป็นเวลาต่าง ๆ กันจากการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

3.8 ผลของสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อความว่องไวของ SOD

3.8.1 ผลของ NaCN และ KCN

การศึกษาผลของ CN^- ต่อความว่องไวของ SOD ในช่วงความเข้มข้น 0-4 mM ผสมกับสารสกัดที่มีค่าความว่องไว 150 ± 7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอน Sephadex G-100 พบว่า ในช่วง 1-3 mM NaCN ความว่องไวของ SOD ลดลง 13-17% ของ SOD ที่ไม่มี CN^- เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 4 mM NaCN พบว่าเหลือ SOD 42 % ดังตารางที่ 15

เมื่อทดลองใช้ KCN แทน NaCN พบว่าให้ผลคล้ายกันคือ 1 mM KCN ยับยั้งความว่องไวของ SOD เหลือเพียง 69% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ KCN ความว่องไวของ SOD จะยิ่งลดลงและเมื่อเพิ่ม KCN จนถึง 14 mM KCN จะเหลือ SOD เพียง 5% (ดังตารางที่ 16)

3.8.2 ผลของ H_2O_2

ผลของ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 0-3 mM ต่อ SODในการสกัดใบยาง ที่มีความว่องไว 150 ± 7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ H_2O_2 สูงขึ้น ความว่องไวของ SOD จะลดลงดัง ตารางที่ 17 จะเห็นได้ว่าที่ H_2O_2 1 mM SOD เหลือ 93% ของหลอดที่ไม่มี H_2O_2 ส่วนที่ความเข้มข้นของ H_2O_2 2 และ 3 mM เหลือ SOD ใกล้เคียงกัน คือ 87 และ 84% ตามลำดับ

3.8.3 ผลของ SDS

การศึกษาผลของ SDS ที่ความเข้มข้น 0-3 mM ต่อความว่องไวของ SOD ในส่วนสารสกัดใบยางที่มีค่าความว่องไว 405 ± 57 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ผ่านการแยกโปรตีนออกในขั้นตอนคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่า 1 mM SDS ยับยั้ง SOD ได้ประมาณครึ่งหนึ่งเหลือ SOD 210 ± 20 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 52% ของหลอดที่ไม่มี SDS และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 2 และ 3 mM SDS ยับยั้ง SOD จนเหลือเพียง 9.8 และ 7.4 % ตามลำดับ ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 15 ผลของ NaCN ต่อความว่องไวของเอนไซม์ SOD ในสารสกัดใบยาง

NaCN (mM)	SOD activity (U/ml)	%
0 (Control)	150 ± 7	100
1	130 ± 30	87
2	124 ± 13	83
3	131 ± 11	87
4	63 ± 29	42

ค่าเฉลี่ยความว่องไว ± SD ของ SOD จากการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 16 ผลของ KCN ต่อความว่องไวของ SOD ในสารสกัดใบยาง

KCN (mM)	SOD activity (U/ml)	%
0 (Control)	189 ± 31	100
1	131 ± 4	69
2	89 ± 9	47
3	85 ± 27	45
4	64 ± 31	34
10	43 ± 3	23
14	10 ± 7	5

ค่าเฉลี่ยความว่องไว ± SD ของ SOD จากการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 17 ผลของ H_2O_2 ต่อความว่องไวของ SOD ในสารสกัดใบยาง

H_2O_2 (mM)	SOD activity (U/ml)	%
0 (Control)	150 ± 7	100
1	139 ± 18	93
2	131 ± 32	87
3	126 ± 42	84

ค่าเฉลี่ยความว่องไว ± SD ของ SOD จากการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 18 ผลของ SDS ต่อความว่องไวของ SOD ในสารสกัดใบยาง

SDS (mM)	SOD activity (U/ml)	%
0 (Control)	405 ± 57	100
1	210 ± 20	52
2	40 ± 0	9.8
3	30 ± 10	7.4

ค่าเฉลี่ยความว่องไว ± SD ของ SOD จากการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

3.8.5 **ผลของ** β-mercaptoethanol

การศึกษาผลของ β-mercaptoethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0-5 mM ต่อความว่องไว SOD ในสารสกัดใบยางที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ β-mercaptoethanol เพิ่มขึ้น ความว่องไวของ SOD จะลดลง พบว่าที่ 5 mM β-mercaptoethanol เหลือ SOD เพียง 8 ± 3 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือ 5% เท่านั้น ดังตารางที่ 19

3.9 ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อความว่องไวของ SOD

ในการเตรียมเอนไซม์ SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้นนั้น ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นตัวตกตะกอนโปรตีนอื่นออกจาก SOD จึงศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อความว่องไวของ SOD หรือไม่ โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0 - 25% (w/v) พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้นความว่องไวของ SOD จะลดลงดังตารางที่ 20 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้นเป็น 25% ความว่องไวของ SOD ลดลงเป็น 93 ± 11 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 26% (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 19 ผลของ β-mercaptoethanol ต่อความว่องไวของ SOD ในสารสกัดใบยาง

β-mercaptoethanol (mM)	SOD activity (U/ml)	%
0 (Control)	150 ± 7	100
1	115 ± 25	77
2	74 ± 17	49
3	16 ± 11	11
5	8 ± 3	5

ค่าเฉลี่ยความว่องไว ± SD ของ SOD จากการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 20 ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อความว่องไวของ SOD ในสารสกัดใบยาง

แอมโมเนียมซัลเฟต % (w/v)	SOD activity (U/ml)	%
0 (Control)	361 ± 55	100
5	402 ± 83	111
10	342 ± 81	95
15	239 ± 9	66
20	115 ± 21	32
25	93 ± 11	26

ค่าเฉลี่ยความว่องไว ± SD ของ SOD จากการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ

3.10 pH ของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัด SOD

การสกัดใบยางแก่พันธุ์ RRIM600 ด้วย Universal buffer ในช่วง pH 2-12 แล้วนำส่วนใสมาหาความว่องไวของ SOD เปรียบเทียบกับใบยางที่สกัดด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 พบว่าความว่องไวของ SOD สูงที่ pH 5.5 และช่วง pH 7.5-11 โดยที่การสกัดโดยใช้บัฟเฟอร์ที่ pH 10.5 พบว่าความว่องไวของ SOD สูงสุด 1,236 หน่วยต่อกรัม มีค่ามากกว่าที่สกัดด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ซึ่งมีค่าเพียง 885 หน่วยต่อกรัม เท่านั้น และเมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนพบว่า ถ้า pH สูงขึ้นปริมาณโปรตีนจะสูงขึ้นด้วย ทำให้ค่าความว่องไวจำเพาะของ SOD ใบยางจะสูงเมื่อสกัดที่ pH ต่ำ เช่น ที่ pH 2 พบว่าค่าความว่องไวจำเพาะสูงถึง 23,571 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เนื่องจากมีโปรตีนเพียง 0.042 มิลลิกรัม ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 SOD และปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดใบยาง 1 กรัม ด้วย universal buffer ช่วง pH 2-12 เปรียบเทียบกับใบยางที่สกัดด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5

Extraction buffer	SOD activity (U/g)	Total protein (mg.)	Specific activity (U/mg protein)
universal buffer pH 2	990	0.042	23,571
3	991	0.07	14,157
4	927	0.042	20,071
5	921	0.042	21,928
5.5	1,064	0.16	6,650
6	910	0.20	4,450
6.5	921	0.46	2,002
7	984	0.20	4,920
7.5	1,169	5.99	195
8	1,096	6.8	161
8.5	991	14.5	68
9	1,033	16.7	62
9.5	994	18.1	55
10	1,096	17.9	61
10.5	1,236	17.9	69
11	1,220	18.4	66
12	964	17.3	56
0.1 M Tris-HCl pH 7.5	885	2.7	328