2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารสกัดใบยางพารา

ในการทดลองนี้เก็บใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 จากแปลงทดลองศูนย์วิจัยยาง ตำบลหาดใหญ่ และใบยางพาราพันธุ์พื้นเมือง จากด้านหลังหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ตำบลหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลาแบบสุ่มต้นในแปลงเดิม นำมาล้างด้วยน้ำประปาตามด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้งด้วยผ้าสะอาด และหั่นใบยางให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักเป็นกรัมให้ทราบน้ำหนักแน่นอน เติมไนโตรเจนเหลวลงไป แล้วบดในครกเซรามิก เติมบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด (0.1 M Tris-HCl pH 7.5) ลงไปผสมในอัตราส่วน ใบยาง 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 4 มิลลิลิตร นำสารผสมนี้ไปกรองผ่านผ้ากอซ 4 ชั้น นำสารละลายที่กรองได้ ไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,636 X g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C เก็บส่วนใส (S_1) ด้านบนไว้ วัดปริมาตร S_1 ส่วนตะกอน (P_1) ทิ้งไป แล้วนำ S_1 ไปหาความว่องไวของ SOD และปริมาณโปรตีนในทันที

เนื่องจาก pH ของสารบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดอาจมีผลต่อการสกัด SOD จึงหา pH ที่เหมาะสมในการสกัด SOD จากใบยางพารา ได้โดยทำการสกัดเอนไซม์ SOD จากใบยาง 1 กรัมด้วย universal buffer ที่ pH ต่าง ๆ กันคือ ที่ pH 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11 และ 12 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น แล้วนำส่วนใส S_1 ที่ได้มาหาความว่องไว ตามวิธีในข้อ 2.2.1 เปรียบเทียบกับการสกัดด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5

2.2 การหาความว่องไวของ SOD ในสารสกัดใบยางพารา

2.2.1 NBT method

การหาความว่องไวของ SOD ใช้ NBT photochemical assay ตามวิธีของ Beyer and Fridovich, 1987 โดยทำให้เกิด O_2^- ในสารผสมที่ประกอบด้วย methionine, nitroblue tetrazolium (NBT) และใช้แสงจากหลอด fluorescence ทำให้ L-methionine (electron donor) รีดิวซ์ riboflavin เป็น semiquinone ซึ่งรีดิวซ์ O_2 ให้

เป็น O_2^- และ O_2^- ที่เกิดขึ้นจะรีดิวซ์ NBT ให้กลายเป็น formazan สีน้ำเงินเข้ม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร สารละลายซึ่งมี SOD จะลด reduction ของ NBT เป็น formazan ได้ โดย SOD ในสารสกัดใบยางจะลดปริมาณของ O_2^- ดังปฏิกิริยา $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ ถ้ามี SOD activity มากจะเหลือ O_2^- ที่จะไปรีดิวซ์ NBT ให้กลายเป็น formazan ได้น้อย สี formazan ที่ได้จึงจาง ในทางตรงกันข้าม ถ้ามี SOD activity น้อยก็จะ catalyze $O_2^- \rightarrow H_2O_2$ ได้น้อย ก็จะเหลือ O_2^- มากพอที่จะไปรีดิวซ์ NBT ให้กลายเป็น formazan ได้มาก สีที่ได้จึงเข้ม

การหาความว่องไวของ SOD ทำโดยนำสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย 0.05 M HEPES buffer pH 7.4 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร, L-methionine 300 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร, NBT.2HCl 14.1 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 1% (v/v) triton X-100 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง 3 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร และเติมสารสกัดตัวอย่าง (ซึ่งเจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสม) หลอดละ 20, 40 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบเป็น 80 ไมโครลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด โดยมีหลอดที่มีสารผสมและบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด 80 ไมโครลิตร เป็นหลอดควบคุม (control) ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เติม 4.4% (w/v) riboflavin 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองข้างต้น ผสมให้เข้ากัน สารละลายที่ได้มีสีเหลือง นำไปฉายแสง fluorescence บน light box นาน 7 นาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินม่วง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิห้อง นำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่มีตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ไม่มีตัวอย่างมาคำนวณหาความว่องไวของ SOD โดยความว่องไวของ SOD 1 หน่วย หมายถึง ความสามารถของ SOD ในการยับยั้งการเกิดสีให้ลดลงเหลือ 50% การหาความว่องไวของ SOD ในตัวอย่างทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ซ้ำ

2.2.2 cytochrome c method

การหาความว่องไวของ SOD โดย enzymatic assay ตามวิธีของ McCord and Fridovich, 1969a ประกอบด้วย xanthine, xanthine oxidase (XO), cytochrome c ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดย XO ไป catalyze xanthine ได้ O_2^- ไปรีดิวซ์ oxidized cytochrome c ได้เป็น reduced cytochrome c (สีแดงอ่อน) วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดย SOD ในสารสกัดใบยางจะลดปริมาณของ O_2^- ถ้ามี SOD activity มากจะทำให้เหลือ O_2^- ที่จะไปรีดิวซ์ cytochrome c ได้น้อย สีแดงที่ได้จึงจางกว่า ถ้ามี SOD activity น้อย catalyze $O_2^- \rightarrow H_2O_2$ ได้น้อยก็จะเหลือ O_2^- มากพอที่จะไปรีดิวซ์ cytochrome c สีที่ได้จึงเป็นสีแดงเข้ม

การหาความว่องไวของ SOD ทำได้โดยการนำสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย $1x10^{-5}$ M ferricytochrome c และ $5x10^{-5}$ M xanthine ใน 0.05 M. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.8 ซึ่งมี 10^{-4} M EDTA ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงใน cuvette กว้าง 1 เซนติเมตร และเติมสารสกัดตัวอย่าง (ซึ่งเจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสม) หลอดละ 20 ไมโครลิตร โดยมีหลอดฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทนตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เป็นหลอดควบคุม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เติม XO 30 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองข้างต้น ผสมให้เข้ากัน นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิห้อง ทุก 15 วินาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอ่อน นำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่มีตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ไม่มีตัวอย่างมาคำนวณหาความว่องไวของ SOD โดย ความว่องไวของ SOD 1 หน่วย หมายถึง ความสามารถของ SOD ในการยับยั้งการเกิดสีให้ลดลงเหลือ 50% การหาความว่องไวของ SOD ในตัวอย่างทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ซ้ำ

2.3 การหาปริมาณโปรตีน ใช้วิธีการวิเคราะห์ของ Lowry *et al.*, 1951

2.3.1 วิธีของ Lowry

ปิเปต สารละลาย alkaline copper (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH + 1% potassium sodium tartrate + 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ ในอัตราส่วน 100 : 1:1) ลงในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร เติมสารสกัดใบยาง (ซึ่งเจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว) 100 ไมโครลิตร, ใช้น้ำกลั่น 100 ไมโครลิตรเป็น blank และ bovine serum albumin (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นเป็นโปรตีนมาตรฐาน ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลาย folin ciocalteau's phenol reagent 300 ไมโครลิตร (เจือจางแล้วด้วยน้ำกลั่น 1:1) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที สารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าอ่อนเป็นสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดใบยางโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนในกราฟมาตรฐาน เนื่องจากสารสกัดใบยางมีสีจึงทำการทดลองโดยหักการดูดกลืนแสงเนื่องจากสีของสารสกัดใบยางที่มีผลทำให้การดูดกลืนแสงของสารสูงกว่าความเป็นจริงออกไป โดยเติมสารละลายใบยางสกัด 100 ไมโครลิตรลงใน alkaline copper 3 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นแทน folin ciocalteau's phenol reagent 300 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร นำไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ได้

2.4 การเลือกตัวอย่างใบยางที่มีความว่องไวสูงมาศึกษา SOD

ในการศึกษา SOD ในใบยางนั้นได้ทำการศึกษาหาตัวอย่างที่มีความว่องไวสูง โดยเลือกใบยางที่มีความว่องไวสูงมาสกัด SOD ใช้ยางพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 4 ระยะที่มีความอ่อนแก่ต่างกัน คือ ใบอ่อน, ใบกลาง, ใบแก่ และ ใบแก่จนเหลือง โดยใบอ่อนในการทดลองนี้จะเป็นใบสีแดงซึ่งแผ่นใบคลี่แล้ว อยู่ตรงปลายกิ่ง, ใบกลางเป็นใบซึ่งอยู่ถัดจากใบอ่อนลงมา มีสีเขียวอ่อนขนาดใหญ่กว่าใบอ่อนเล็กน้อย เนื้อใบนิ่ม, ใบแก่อยู่ถัดจากใบกลางลงมา 3-4 ฉัตร มีสีเขียวเข้ม ขนาดใหญ่กว่าใบกลาง เนื้อใบแข็ง และใบแก่จนเหลืองเป็นใบที่อยู่ฉัตรล่างสุด ถัดจากใบแก่ลงมา ใบมีสี เหลืองอมส้ม

หรือเหลืองอมน้ำตาล ใบมีขนาดใหญ่พอ ๆ กับใบแก่ เนื้อใบแข็ง นำมา สกัดตามวิธีในข้อ 2.1 และนำไปหาความว่องไวของ SOD ตามวิธีในข้อ 2.2.1

นอกจากนี้ยังได้ทำการสกัดก้านใบเพื่อเปรียบเทียบความว่องไวของ SOD โดยใช้ใบแก่พันธุ์ RRIM 600 และพันธุ์พื้นเมือง เก็บแบบสุ่ม ที่เวลาต่าง ๆ กันจำนวน 26 ตัวอย่างและ 10 ตัวอย่างตามลำดับ โดยมีวิธีเก็บดังนี้คือ ใบยางแก่ 1 ก้านประกอบด้วย 3 ใบย่อยสกัดเป็น 1 ตัวอย่าง และ 1 ก้านใบสกัดเป็น 1 ตัวอย่างก้านใบเช่นกัน ตามวิธีในข้อ 2.1 หาความว่องไวของ SOD และปริมาณโปรตีนในทันที คำนวณหาความว่องไวของ SOD ต่อ 1 กรัม และความว่องไวจำเพาะเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนด้วย

2.5 ความสัมพันธ์ระหว่าง SOD ในใบยางและปริมาณเนื้อยาง

จากข้อมูลที่ว่า SOD อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยางในยางพันธุ์ต่าง ๆ และผลิตผลของปฏิกิริยาคือ H_2O_2 จึงได้ศึกษาโดยเก็บน้ำยางและใบยางระยะใบแก่จากต้นเดียวกันจำนวน 20 ต้น โดยเก็บแบบสุ่มต้น นำใบยางมาหาความว่องไวของ SOD และ เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase; POx) เก็บน้ำยางทั้งหมดที่ได้แต่ละต้นมาวัดปริมาตรแล้วแบ่งน้ำยางมา 10 มิลลิลิตรใส่ภาชนะอบที่อุณหภูมิ 70°C จนได้เนื้อยางแห้งน้ำหนักคงที่ เทียบกับปริมาตรน้ำยางทั้งหมด นำมาคำนวณเป็นปริมาณเนื้อยางแห้งทั้งหมดต่อการกรีดหนึ่งครั้ง Total Dried Rubber Content (DRC) นำมาศึกษาความสัมพันธ์กับความว่องไวของเอนไซม์ในใบยางว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่

การหาความว่องไวของ POx ในใบยางสกัด ใช้ *o*-dianisidine เป็น substrate ตามวิธีของ Shanon *et al.*, 1966 โดยผสมสารตัวอย่างที่จะหาความว่องไวในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.05 M sodium acetate pH 5.4 ปริมาตร 2.79 มิลลิลิตร และ 0.25% *o*-dianisidine ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 0.1 M H_2O_2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันที ที่ความยาวคลื่น 460 นาโมเมตร โดยวัดทุก 15 วินาที จนครบ 3 นาที ที่ 30°C ความว่องไวของ POx 1 หน่วย คือ ความสามารถของ POx ที่ออกซิไดส์ 1 µmol ของ *o*-dianisidine ในเวลา 1 นาที

โดย *o*-dianisidine มีค่า extinction coefficient = 11.3 $mM^{-1}cm^{-1}$ (Saeki *et al.*, 1986)

2.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บสารสกัดใบยาง

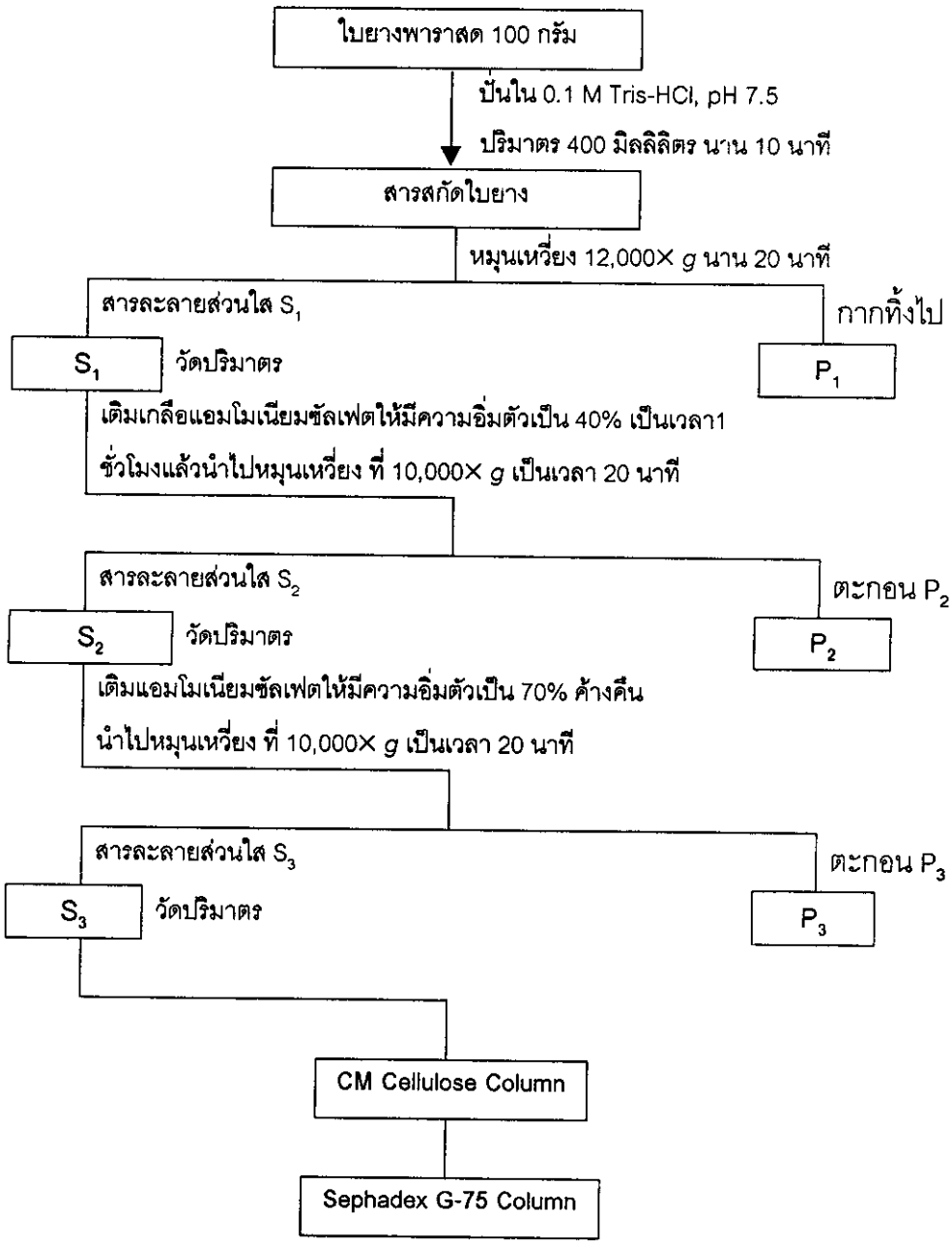
นำสารสกัดใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 (ซึ่งมีความว่องไว 363.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ที่ได้ตามวิธีในข้อ 2.1 แบ่งใส่หลอดเล็ก ๆ หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 32 หลอด เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 4, -10, -20 และ -70°C เป็นเวลาต่าง ๆ กันคือ 1, 3, 7, 15, 30, 45, 60 และ 90 วัน เมื่อถึงวันที่กำหนด จะทำการหาความว่องไวของเอนไซม์ SOD ตามวิธีในข้อ 2.2.1 หลังจากตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ติดตามความว่องไวของ SOD ตั้งแต่วันแรกที่ทำการสกัดว่าการเก็บเอนไซม์ไว้อุณหภูมิต่าง ๆ กันเป็นเวลาต่าง ๆ กันจะทำให้ความว่องไวของ SOD เปลี่ยนแปลงอย่างไร

2.7 การทำให้ SOD จากสารสกัดใบยางให้บริสุทธิ์ขึ้น

2.7.1 การทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้น โดยตกตะกอน SOD ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 40 และ 70% (วิธีที่ 1)

นำ S_1 ที่ได้จากการสกัดในข้อ 2.1 มาตกตะกอนโปรตีนอื่นออกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความอิ่มตัวเป็น 40% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,636 X *g* เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใส S_2 และตะกอน P_2 ออกจากกัน ละลายตะกอน P_2 ด้วยบัฟเฟอร์จนตะกอนละลายหมด ได้สารละลายใสไม่มีตะกอน นำมาหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 5,000 x *g* เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาตรสารละลายที่ได้ ส่วนใส S_2 มาตกตะกอนโปรตีนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความอิ่มตัว 70% ค้างคืนเพื่อให้โปรตีนอื่นตกตะกอนมากที่สุด นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,636X*g* เป็นเวลา 15 นาที ได้ส่วนใส S_3 และตะกอน P_3 ละลายตะกอน P_3 ด้วยบัฟเฟอร์จนตะกอนละลายหมดนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 X *g* เป็นเวลา 10 นาที ได้เป็นสารละลาย P_3 การแยก SOD ทุกขั้นตอนทำที่ 4°C วัดปริมาตร, หาความว่องไวและปริมาณโปรตีนของ

สารสกัดใบยางทุกขั้นตอนเพื่อที่จะได้ทราบว่าส่วนใดมีความว่องไวของเอนไซม์มากที่สุดไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ไดอะแกรมการทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-70% ตามวิธีที่ 1

2.7.2 การทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นโดยการดูดน้ำออกด้วย CM cellulose

การหาความว่องไวของ SOD จากส่วนต่าง ๆ ซึ่งทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-70% พบว่า SOD ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนใส S_3 ซึ่งมีปริมาตรมาก จึงจำเป็นต้องลดปริมาตรโดยใช้ CM cellulose ดูดน้ำ (ซึ่งเป็นคนละชนิดกับคอลัมน์ CM cellulose) ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ โดยบรรจุ S_3ในถุง dialysis ซึ่งยอมให้สารน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 13,000 ผ่านออก (MWCF 13,000) ผูก dialysis bag แล้วนำมาคลุกกับผง CM cellulose ดูดน้ำจน CM cellulose มีสีขาวใส นำ CM cellulose ที่เปียกออกแล้วเติม CM cellulose ลงไปใหม่ จนปริมาตรลดลงตามต้องการ หาความว่องไว, ปริมาณโปรตีน และความว่องไวจำเพาะของ S_3 ที่เข้มข้นแล้ว นำมาแยก S_3 ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ CM cellulose และ Sephadex G-75 ตามลำดับ

2.7.3 การทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ CM-Cellulose

นำ S_3 มาแยก SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ CM cellulose ที่เตรียมโดยชั่ง CM cellulose 15 กรัม แช่ในน้ำกลั่นค้างคืนจนพอง และแช่ใน 0.5 M HCl 4 ชั่วโมง แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นจน pH เท่ากับ 7 จึงแช่ใน 0.5 M NaOH 4 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เท่ากับ 7 แล้วนำมาแช่ใน 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 แล้วนำ CM cellulose ที่ได้มาบรรจุในคอลัมน์ขนาด 2.6 X 29 เซนติเมตร มีปริมาตร เรซิน 154 มิลลิลิตร ชะคอลัมน์ให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตร 1 เท่าของคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อ 3 นาที จากนั้นใส่ S_3 ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 3.2 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ ทิ้งไว้นาน 30 นาที เพื่อให้โปรตีนที่จะจับกับคอลัมน์จับได้มาก แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ด้วยอัตราการไหลเดิม เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 2 มิลลิลิตร ชะจนไม่มีโปรตีนออกมาอีกโดยสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มีเกลือ NaCl 0.5 M ด้วยอัตราการไหลเดิมและเก็บหลอดละ 2 มิลลิลิตร ชะจน OD_{280} เข้าใกล้ศูนย์ หาความว่องไวของเอนไซม์ทุกหลอดในช่วงที่ค่า OD_{280} มีค่ามาก และหาความว่องไวของเอนไซม์ทุก 5-10

หลอดในช่วงที่ค่า OD_{280} ต่ำหรือเข้าใกล้ ศูนย์ รวมหลอดที่มีค่าความว่องไวสูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตร, หาความว่องไวของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

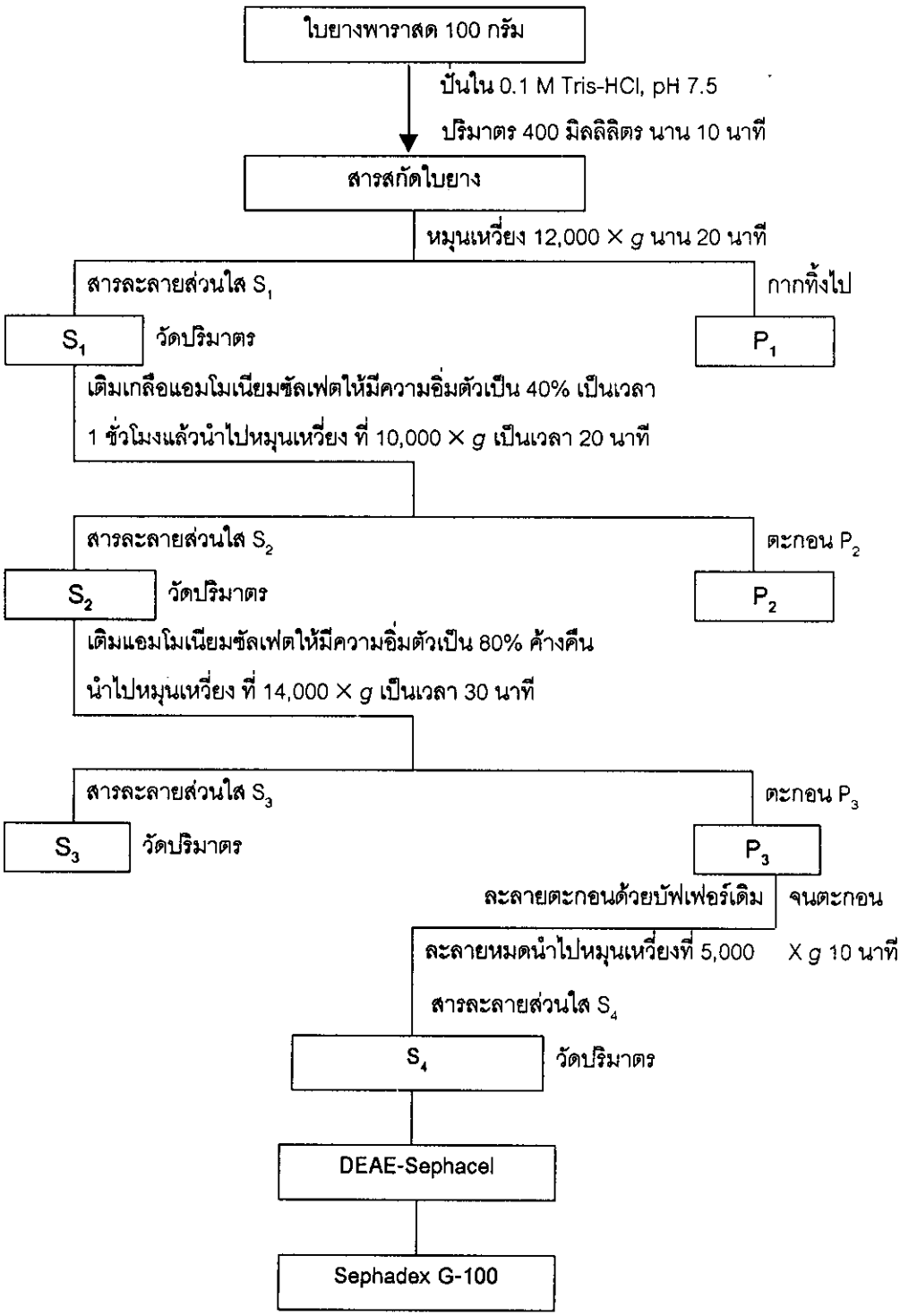
2.7.4 การทำให้ SOD บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75

นำหลอดที่มีความว่องไวสูงจากคอลัมน์ CM cellulose มารวมกัน (โปรตีน 34.5 ± 0.5 มิลลิกรัม ปริมาตร 6 มิลลิลิตร) มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-75 ซึ่งเตรียมโดยแช่ Sephadex ในน้ำกลั่นค้างคืน แล้วเปลี่ยนมาแช่ใน 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ค้างคืน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 0.5 X 35 เซนติเมตร ปริมาตร 17.5 มิลลิลิตร ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม 1 เท่าของปริมาตรเจล ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อ 6 นาที หลังจากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ CM cellulose ที่มีความว่องไวสูงผ่านลงในคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดตามดูการแยกโปรตีนโดยวัด OD_{280} จน OD_{280} เข้าใกล้ศูนย์ หาความว่องไวของเอนไซม์ SOD ทุกหลอดในช่วงที่ OD_{280} มีค่าสูง และหาความว่องไวของเอนไซม์ 5-10 หลอดในช่วงที่ OD_{280} มีค่าต่ำหรือเข้าใกล้ศูนย์ รวมหลอดที่มีความว่องไวสูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตร, หาความว่องไวของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

2.7.5 การทำให้ SOD บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยตกตะกอนSODด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80% โดยวิธีที่ 2

การทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้นตามวิธีที่ 1 ซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 40-70% พบว่า SOD ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนสารละลายส่วนใส S_3 มีปริมาตรมาก จึงทำการตกตะกอน SOD ด้วยวิธีที่ 2 โดยทำการทดลองเหมือนวิธีที่ 1 แต่ตกตะกอน SOD ในส่วนใส S_2 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80% แทน 70% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ SOD ส่วนใหญ่อยู่ในตะกอน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,636 X *g* เป็นเวลา 15 นาที ได้เป็นสารละลายส่วนใส S_3 และส่วนตะกอน P_3 ละลายตะกอน P_3 เหมือนวิธีที่ 1 ได้เป็นสารละลายส่วนใส S_4 การแยก SOD ทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4^0C ทำการวัดปริมาตร, หาความว่องไวของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของสารสกัดใบยางทุกขั้นตอน เพื่อให้ทราบว่า SOD อยู่ในส่วนขั้นตอนไหนของการทำ SOD ให้บริสุทธิ์ขึ้น เพื่อที่จะได้นำ

SOD ในส่วนนั้นมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นต่อไป พบว่า SOD ส่วนใหญ่อยู่ในสารละลายส่วนใส S_4 ซึ่งมีเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตปนอยู่ จึงจำเป็นต้องเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 2 ไดอะแกรมการทำให้เอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสบริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-80% ตามวิธีที่ 2

2.7.6 การเอาเกลือออก

นำ S_4 ใส่ในถุง dialysis ที่มี MWCF 3,000 แล้วมัดหัวท้ายแช่ให้จมในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยมีแท่งแม่เหล็กคนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4^{0}C จนบัฟเฟอร์เปลี่ยนจากไม่มีสีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน ใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมงแล้วเปลี่ยนบัฟเฟอร์โดยใช้บัฟเฟอร์เดิมอีก 2 ครั้ง เพื่อกำจัดสารที่มีขนาดต่ำกว่า 3,000 ดาลตันออก วัดปริมาตรสารละลายส่วนใส S_4 ที่ได้พร้อมทั้งหาความว่องไวของเอนไซม์, ปริมาณโปรตีน และความว่องไวจำเพาะ แล้วทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้นต่อไปด้วยคอลัมน์ CM-Cellulose และ Sephadex G-100 ต่อไป

ในบางการทดลองเมื่อได้สารละลายส่วนใส S_4 นำมาผ่านลงคอลัมน์ CM-Cellulose และ Sephadex G-100 โดยไม่ได้เอาเกลือออก และนำสารละลายส่วนใส S_4 มาผ่านลงคอลัมน์โดยไม่ได้เอาเกลือออกเหมือนเดิมแต่เปลี่ยนจากคอลัมน์ CM-Cellulose ซึ่งเป็น cation exchanger เป็น DEAE-Sephacel ซึ่งเป็น anion exchanger แทน แล้วทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100

2.7.7 การทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้นด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เตรียมคอลัมน์ DEAE-Sephacel โดยเอา DEAE-Sephacel ซึ่ง แช่อยู่ในสารละลาย ethanol 20% มาล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมด ethanol แล้วนำมาล้างต่อด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 อีก 2-3 ครั้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำ DEAE-Sephacel ที่ได้มาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.0 X 28.9 เซนติเมตร ปริมาตรเรซิน 90.8 มิลลิลิตร แล้วปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์เดิม ปริมาตรคอลัมน์ 1 เท่า จากนั้นนำ S_4 ที่เตรียมได้จากวิธีที่ 2 ปริมาตร 14 มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีน 6.9 $\pm$ 0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านลงในคอลัมน์ทิ้งไว้นาน 30 นาที เพื่อให้สารสกัดจับกับ DEAE-Sephacel ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อ 3 นาที ติดตามการแยกโปรตีนด้วย OD_{280} จน OD_{280} เข้าใกล้ศูนย์ แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมซึ่งมีเกลือ NaCl 0.5 M ติดตามการแยกโปรตีนและหาความว่องไว รวมหลอดที่มีความว่องไวสูงจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel เข้าไว้ด้วยกัน ทำการวัดปริมาตร, หาความว่องไวของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนจากนั้นนำมาผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 ต่อไป

2.7.8 การทำให้ SOD บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100

การเตรียมคอลัมน์ Sephadex G-100 ขนาด 0.8 X 44 เซนติเมตร ปริมาตรเรซิน 22 มิลลิลิตร นำ S_4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 4.4 ± 0.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิม ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อ 6 นาที (10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง) เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 1 มิลลิลิตร ติดตามดูการแยกโปรตีนโดยวัด OD_{280} จน OD_{280} เข้าใกล้ศูนย์ หาความว่องไวของเอนไซม์ SOD ทุกหลอดในช่วงที่ OD_{280} มีค่าสูง และหาความว่องไวของเอนไซม์ทุก 5-10 หลอดในช่วงที่ OD_{280} มีค่าน้อยหรือเข้าใกล้ ศูนย์ รวมหลอดที่มีความว่องไวสูงเข้าด้วยกัน ทำการวัดปริมาตร, หาความว่องไวของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

2.8 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ SOD ในขั้นตอนต่าง ๆ

2.8.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ SOD ที่แยกได้ในขั้นตอนต่าง ๆ โดยใช้โพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซีสแบบไม่แปลงสภาพ (Native polyacrylamide gel electrophoresis; ND-PAGE) ตามวิธีของ Davis (1964)

ตัวอย่างที่ใช้ได้จาก S_1 และคอลัมน์ Sephadex G-100 โดยใช้ เจลแบบแผ่นขนาด 10 X 12 เซนติเมตร หนา 1 มิลลิเมตร เจลชั้นบน (stacking gel) ประกอบด้วย 3% polyacrylamide ใน 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 และ เจลชั้นล่าง (separating gel) สูง 7 เซนติเมตร ทำหน้าที่แยกสาร ประกอบด้วย 7-15% polyacrylamide ใน 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 นำตัวอย่างมาผสมกับ sample buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.06 M Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol และ 2% bromophenol blue (โบรโมฟีนอลบลู) ในอัตราส่วน 3 : 1 หลังจากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นโปรตีนประมาณ 0.1-10 ไมโครกรัมต่อ 1 ช่องเจล และนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ใช้บัฟเฟอร์ (electrode buffer) ที่ประกอบด้วย 0.025 M Tris และ 0.192 M glycine pH 8.3 ใช้กระแสไฟฟ้า 18 mA ต่อเจล 1 แผ่น จนโบรโมฟีนอลบลู เคลื่อนที่สุดขอบล่างของแผ่นเจล ใช้เวลาประมาณ 1.5-2 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมโปรตีนด้วยคูมาซีบริลเลียนบลู (coomassie brilliant blue R-250) ซึ่งประกอบด้วย คูมาซีบริลเลียนบลู

0.1% ใน 40% methanol และ 10% acetic acid ค้างคืน แล้วล้างสีที่ไม่จับกับโปรตีนออกโดยใช้ destaining solution ซึ่งประกอบด้วย 40% methanol และ 10% glacial acetic acid จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน (Davis, 1964)

2.8.2 การทำโพลีอิคลิลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟริซีสแบบมี SDS ในเจลความเข้มข้นต่างๆ (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE gradient)

นำตัวอย่าง SOD จากคอลัมน์ Sephadex G-100 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนและหาน้ำหนักโมเลกุล หรือหน่วยย่อย (sub unit) โดยการทำ SDS-PAGE ดัดแปลงมาจากวิธีของ Laemmli, 1970 โดยใช้ 3% polyacrylamide ใน 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 เป็น stacking gel และ 7-15% polyacrylamide ใน 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 เป็น separating gel โดยนำตัวอย่างมาผสมกับ SDS sample buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.06 M Tris-HCl pH 6.8, 8 mM EDTA, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β-mercaptoethanol และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู ในอัตราส่วน 1 : 1 หลังจากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นโปรตีนประมาณ 0.1-10 ไมโครกรัมต่อ 1 ช่องเจล ใช้ electrode buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.025 M Tris, 0.192 M glycine และ 1% SDS pH 8.3 ผ่านกระแสไฟฟ้า 18 mA ต่อเจล 1 แผ่น ประมาณ 1.5-2 ชั่วโมง จน โบรโมฟีนอลบลู เคลื่อนที่จนถึงขอบเจลด้านล่าง ปิดกระแสไฟฟ้า นำไปย้อมด้วย staining solution และ destaining solution เหมือนใน ND-PAGE

2.8.3 การย้อมความว่องไวของเอนไซม์ SOD ในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยอิเล็กโทรฟอรีซิส

ในกรณีที่เป็นการแยกโดย SDS-PAGE จะต้องนำแผ่นเจลไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 เพื่อขจัด SDS ออกแล้ว จึงนำไปย้อมความว่องไวของ SOD ตามวิธีที่ปรับปรุงจาก Beauchamp and Fridovich, 1971 โดยแช่แผ่นเจลในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร, 0.5 M $MgCl_2$ 0.2 มิลลิลิตร, 1% NBT 1 มิลลิลิตร และ 1% PMSF 1 มิลลิลิตร แล้วใช้แสงฟลูออเรสเซนส์ส่องแผ่นเจลจนเปลี่ยนจากไม่มีสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินม่วงเข้ม เนื่องจาก NBT ถูก

รีดิวซ์ ยกเว้นบริเวณที่มีแถบของ SOD จะไม่มีสี ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นจนสะอาดขึ้น บันทึกภาพของแถบ SOD ไว้

2.9 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ SOD

2.9.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของ SOD

น้ำหนักโมเลกุลย่อยของ SOD หาได้จากการทำ SDS PAGE ซึ่งใช้ slab gel โดยการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 7-15% เป็นเจลชั้นล่าง และ 3% สำหรับเจลชั้นบน ตามวิธีในข้อ 2.8.2 ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่แยกได้ และโปรตีนมาตรฐาน

แบ่งเจลเป็นสองส่วน เจลส่วนหนึ่งย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบริลเลียนบลู เพื่อติดตามแถบโปรตีนบนแผ่นเจล เจลอีกส่วนย้อมความว่องไวของ SOD วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน หรือแถบความว่องไวของ SOD ในสารตัวอย่าง แถบโปรตีนมาตรฐานและแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรีเลสบี (phosphorylase b, M_r 94,000 ดาลตัน), โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA, M_r 67,000 ดาลตัน), โอวัลบูมิน (ovalbumin, M_r 43,000 ดาลตัน), คาร์โบนิคแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, M_r 30,000 ดาลตัน), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor, M_r 20,000 ดาลตัน) และแอลฟาแลคตัลบูมิน (α-lactalbumin, M_r 14,000 ดาลตัน) นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแต่ละแถบและแถบความว่องไวของ SOD เทียบกับกราฟมาตรฐาน จะสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของสารละลาย SOD ได้ นอกจากนี้จะหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของ SOD แบบ SDS PAGE แล้ว

อาจหาน้ำหนักโมเลกุลของ SOD โดย ND PAGE ซึ่งจะใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลรวมได้อีกด้วย

2.9.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของ SOD โดยการใช้วิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native polyacrylamide gel electrophoresis, ND-PAGE)

การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของ SOD โดยการทำ ND PAGE โดยการเตรียมโพลิอะคลิลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 4-8% เป็นเจลชั้นล่าง และ 3% สำหรับเจลชั้นบน เช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่แยกได้และโปรตีนมาตรฐานในแผ่นเจลโดยแบ่งเจลเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบริลเลียนบลู เจลอีกส่วนย้อมความว่องไวของ SOD วัดระยะทางของแถบโปรตีนหรือแถบความว่องไวของ SOD ในสารตัวอย่าง แถบโปรตีนมาตรฐาน และแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนจากสารสกัดตัวอย่างจากความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิดเช่นเดียวกับ SDS PAGE นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแต่ละแถบความว่องไวของ SOD เทียบกับกราฟมาตรฐาน จะสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของสารละลาย SOD ได้

2.10 การศึกษาสมบัติของ SOD ในส่วนสารสกัดใบยาง (partially purified enzyme, PPE) **ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกโดยคอลัมน์** Sephadex G-100

2.10.1 ผลของอุณหภูมิต่อความว่องไวของ SOD

อุณหภูมิอาจมีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ SOD ได้ จึงศึกษาผลของอุณหภูมิโดยนำสารสกัดจากใบยางที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนของ Sephadex G-100 (PPE) (ซึ่งเจือจางแล้วในความเข้มข้นที่เหมาะสมมีความว่องไว 363 ± 82 หน่วยต่อมิลลิลิตร) อุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิห้อง (30°C), 40, 60,

80 และ 100°C เป็นเวลา 30 นาทีแล้วตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง หาความว่องไวของ SOD ด้วยวิธี NBT ตามวิธีในข้อ 2.2.1 เปรียบเทียบกับสารสกัดที่ไม่ได้อุ่น

2.10.2 การศึกษาผลของเวลาในการต้มเอนไซม์ SOD

นำสารสกัดใบยางที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-100 ที่มีความว่องไว 380 ± 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งอยู่ใน 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 ใส่หลอดนำไป แช่ในน้ำร้อน 100°C เป็นเวลาต่าง ๆ กันคือ 30, 40, 60 และ 120นาที แล้วทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องนำแต่ละหลอดมาหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 X *g* เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนที่แขวนลอยออกไป นำส่วนใสมาหาความว่องไวของ SOD ตามวิธีในข้อ 2.2.1 เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ต้ม

2.10.3 การศึกษาผลของสารที่มีผลต่อความว่องไวของ SOD ในส่วนสารสกัดใบยาง

การทดลองนี้เพื่อศึกษาผลของสารต่าง ๆ เช่น NaCN, KCN, H_2O_2, β-mercaptoethanol และ SDS ต่อความว่องไวของ SOD ในช่วงความเข้มข้น 0-14 mM และผลของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 0, 5, 10, 15, 20 และ 25% ของความอิ่มตัวต่อความว่องไวของเอนไซม์ โดยใช้ SOD ที่ทำบริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนของคอลัมน์ Sephadex G-100 ซึ่งมีความว่องไว 150-410 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสมสารที่ต้องการทดสอบกับเอนไซม์ในสารละลายที่ใช้หาความว่องไว ผสมให้เข้ากัน แล้วหาความว่องไวของ SOD ตามวิธีในข้อ 2.2.1 เปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่เติมสารที่ต้องการทดสอบลงไป