ภาคผนวก ข

สารเคมี วิธีการตรวจสอบกิจกรรมของไลเปส วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และตารางปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และเปอร์เซ็นต์ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส ตามวิธีของ Hoshino และคณะ(1992)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A : ละลาย *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) 30 มิลลิกรัม ใน 2-propanol ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. สารละลาย B : ละลาย sodium deoxycholate (NaDOC) 207 มิลลิกรัม กัมอราบิค 100 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ให้ได้ปริมาตรเป็น 90 มิลลิลิตร
3. สารละลาย C : ละลาย sodium carbonate 211.8 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย D (สารละลาย D เตรียมโดย ผสมสารละลาย A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 90 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ extinction coefficient เท่ากับ 15 $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$

วิธีการคำนวณกิจกรรมของไลเปส

คำนวณความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Winkler and Stuckmann, 1979)

จาก Beer's law $C = \frac{A}{Eb}$

C = ความเข้มข้น

A = ค่าการดูดกลืนแสง

E = extinction coefficient

b = ระยะทางที่แสงผ่าน cuvette

เมื่อ E = 15 $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$

b = 1 cm

คำนวณความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol (C) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรจากสมการ

$$C = \frac{A_{410}}{E_{410}b}$$

$$= \frac{A_{410}}{(15\ L.mmol^{-1}.cm^{-1})(1\ cm)}$$

$$= \frac{A_{410}\ mmol}{15\ L}$$

$$= \frac{A_{410}\ \mu mol.ml^{-1}}{15}$$

การคำนวณกิจกรรมของไลเปสเมื่อ เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา 0.1 มิลลิลิตร

ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 5.0 มิลลิลิตร

ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม 15.0 นาที

กิจกรรมของไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) $= \frac{A_{410} \times 5 \times 10 \times 1}{15 \qquad 15}$

$= 0.222\ A_{410}$

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้กรดพลามิติกอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

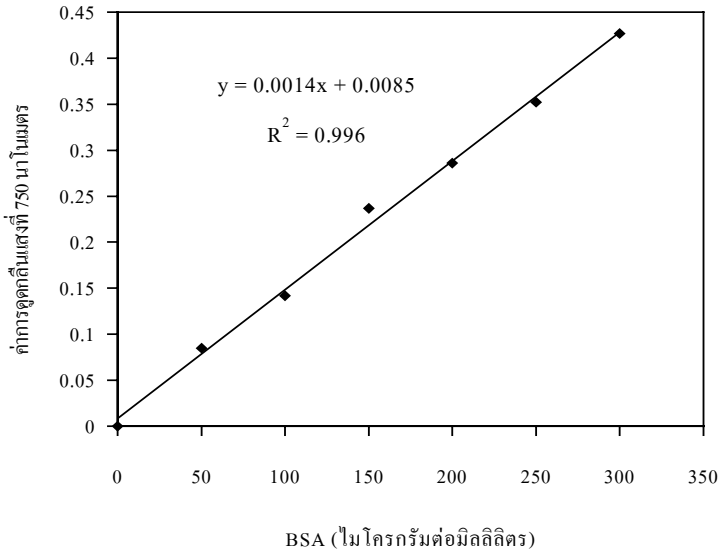
สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A : 1% (w/v) คอปเปอร์ ซัลเฟต ($CuSO_4\ 5H_2O$)
2. สารละลาย B : 2% (w/v) โซเดียม โปแตสเซียม ทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)
3. สารละลาย C : 0.2 M โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
4. สารละลาย D : 4% (w/v) โซเดียม คาร์บอเนต (Sodium carbonate)
5. Folin-Ciocalteu's phenol reagent

วิธีการวิเคราะห์

2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมโบวีนซีรั่มอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) ให้ได้ความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายโปรตีนแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) (โดยผสมสารละลาย C ปริมาตร 49 มิลลิลิตร กับสารละลาย D ปริมาตร 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารโฟลิน-ฟีนอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) (โดยเจือจาง Folin-Ciocalteu's phenol reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่น) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยให้น้ำกลั่นเป็น แบล็งค์ นำค่าที่ได้มาพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของโบวีนซีรัมอัลบูมิน



รูปภาคผนวก ข1 กราฟมาตรฐานโปรตีนโบวีนซีรัมอัลบูมิน

2.2 การหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำมาทดลองตามวิธีเดียวกับข้อ 4.1 นำมาวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และนำมาหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน

ตารางภาคผนวก ข1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวต่างๆ

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	687
		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			30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
						35			30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
							40			31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
								45			31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
									50			32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
										55			33	66	101	138	175	215	256	298	343
											60			33	67	103	140	179	219	261	305
												65			34	69	105	143	183	224	266
													70			34	70	107	146	186	228
														75			35	72	110	149	190
															80			36	73	112	152
																85			37	75	114
																	90			37	76
																		95			38

ที่มา : Scopes (1978)