บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Acrylamide	Merck
Ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_4$	Merck
Ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	BDH
Aquacide (Carboxymethyl cellulose, Na salt)	Sigma
Bromophenol blue	Merck
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka
3,5 –Dinitrosalicylic acid (DNS)	Fluka
Disodium hydrogen phosphate didecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	Merck
Enzyme : Alpha-amylase from human saliva (EC 3.2.1.1)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethyl acetate	Lab-scan
Glycerol	BDH
Glycine	Merck
Iodine	J.T.Baker
Isopropyl alcohol	Lab-scan
Methanol	Carlo Erba
N-(1-naphyl) ethylendiamine ($C_{12}H_{16}C_{l2}N_2$)	Panreae
N',N',N',N'-tetramethylene diamine (TEMED)	Sigma
Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma
Potassium iodide	J.T. Baker
Sephadex G-25, Sephadex G-75	Pharmacia
Sodium chloride (NaCl)	AJAX
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	Merck
Sodium potassium tartrate tetrahydrate ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$)	Carlo Erba
Standard molecular weight marker for electrophoresis	Sigma
Standard molecular weight marker for gel filtration chromatography	Pharmacia
Starch soluble	AJAX
Sulfuric acid	Lab-scan
Tris (hydroxymethyl) amino methane	Sigma

อุปกรณ์

อุปกรณ์	ยี่ห้อ/รุ่น	ประเทศที่ผลิต
เครื่องเก็บสารละลายอัตโนมัติ (Fraction collector)	Biorad / 2110	สหรัฐอเมริกา
เครื่องดูดปล่อยสารละลาย (Micropipette)	Merck / 4M 1522	เยอรมัน
เครื่องปั๊มแบบสายรีด (Peristaltic pump)	ATTO / SJ-121 1L	ญี่ปุ่น
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Shimadzu / UV 160 A	ญี่ปุ่น
เครื่องผสมสารละลาย (Vortex)	Sciencetific Industries/G-560 E	สหรัฐอเมริกา
เครื่องกวนสารละลายแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)	Bibby Sterilin / HB 502	อังกฤษ
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Radiometer / PHM G1	เดนมาร์ค
เครื่องจ่ายไฟ (Power supply)	Hoefer / SX 250-230V	สหรัฐอเมริกา
เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงยิ่งยวด (Ultracentrifuge)	Beckman /L8-70M	สหรัฐอเมริกา
เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Super speed centrifuge)	Beckman /JA-21	สหรัฐอเมริกา
เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (Bench-top refrigerated centrifuge)	National Labnet / C-1200	สหรัฐอเมริกา
ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis unit)	ATTO /AE-6450	ญี่ปุ่น
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert / WB22	เยอรมัน
เครื่องวิเคราะห์สารด้วยรังสีอินฟราเรด (FT-IR)	Perkin Elmer / Spectrum GX	สหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง	OHAUS / SE 2020	สหรัฐอเมริกา
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Sartorius / BP110 S	เยอรมัน
เครื่องทำแห้งด้วยความเย็นแข็ง (Freeze dryer)	Heto drywinner / DW6-85	เดนมาร์ค
เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator)	Buchi / R-314	เยอรมัน

วิธีการทดลอง

ส่วนที่ 1 น้ำยางกล้วย

1.1 การเก็บน้ำยางกล้วย

เก็บน้ำยางกล้วยจากส่วนเครือของกล้วย (*Musa sapientum* Linn.) สายพันธุ์น้ำว้า ปลูกที่อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา ดำเนินการในช่วงเช้าเวลา 6.00-10.00 โดยตัดส่วนเครือกล้วยด้วยมีดสแตนเลส รองน้ำยางด้วยถุงพลาสติกที่วางบนน้ำแข็ง ดังรูปที่ 1 ปล่อยให้น้ำยางไหลจนหมดประมาณ 10 นาที แล้วตัดเครือกล้วยใหม่ เก็บน้ำยางให้ได้ปริมาตรตามต้องการ

A. **B.** **C.**

รูปที่ 1 แสดงการเก็บตัวอย่างน้ำยางกล้วยเพื่อใช้ศึกษา

A. แสดงภาพเครือกล้วยที่ใช้เก็บน้ำยางเพื่อศึกษา

B. แสดงการรองน้ำยางกล้วยด้วยถุงพลาสติกหลังจากตัดเครือ

C. แสดงการรองน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพน้ำยาง

1.2 การเตรียมสารสกัดจากน้ำยางกล้วย

นำน้ำยางกล้วยที่เก็บตามข้อ 1.1 ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 50,000 x g ที่ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสที่ได้ (สารสกัดน้ำยางกล้วย) และแบ่งใส่หลอด หลอดละ 10 และ 1 มล. เก็บที่ 20 °ซ เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.3 การหาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลส

นำสารตัวอย่างได้แก่ ตัวอย่างสารสกัดจากน้ำยางกล้วยหรือ สารที่ผ่านขั้นตอนการ

ทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ บ่มกับเอนไซม์อะไมเลสที่ทราบค่ากิจกรรม (0.60 – 0.70 unit) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เพื่อให้สารยับยั้งอะไมเลสในตัวอย่างจับกับเอนไซม์อะไมเลส เป็นสารประกอบเชิงซ้อน จากนั้นตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่เหลือ ที่ 37 °ซ 3 นาที โดยใช้น้ำแป้งเป็นสับสเตรท ตามวิธีของ Bernfeld (1955) ด้วยสารละลาย 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) วัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้มอลโตส (1 มก./มล.) เป็นสารมาตรฐานตัวแทนน้ำตาลรีดิวซิ่งในการคำนวณค่ามิลลิกรัมมอลโตสของแต่ละตัวอย่าง

กำหนดให้กิจกรรมอะไมเลส 1 หน่วย (Unit) หมายถึง จำนวนเอนไซม์อะไมเลสที่ทำให้เกิดมอลโตส 1 มิลลิกรัม ใน 3 นาทีที่อุณหภูมิ 37°ซ และกำหนดให้กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส 1 หน่วย (AI Unit) เท่ากับปริมาณมอลโตสที่หายไป 1 มิลลิกรัม ใน 3 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °ซ หรือ นำไปคำนวณเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งดังนี้

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งอะไมเลส} = \frac{\text{กิจกรรมอะไมเลสตั้งต้น} - \text{กิจกรรมอะไมเลสที่เหลือ}}{\text{กิจกรรมอะไมเลสตั้งต้น}} \times 100$$

1.4 การหาความเข้มข้นของสารยับยั้งอะไมเลสที่ให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 (IC_{50})

หากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสตามข้อ 1.3 โดยเจือจางตัวอย่างหลาย ๆ ความเข้มข้น เพื่อให้ได้ค่าที่ครอบคลุมค่าร้อยละของการยับยั้งอะไมเลสที่ 50 นำค่าที่ได้สร้างกราฟระหว่างกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสกับค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง หรือ ค่าการเจือจาง (dilution factor) ตัวอย่างในแกน y และ x ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง หรือ ค่าการเจือจางที่ทำให้กิจกรรมอะไมเลสลดลงครึ่งหนึ่ง คือ ค่า IC_{50} ดังแสดงในรูปที่ 2A

1.5 การหาปริมาณโปรตีน

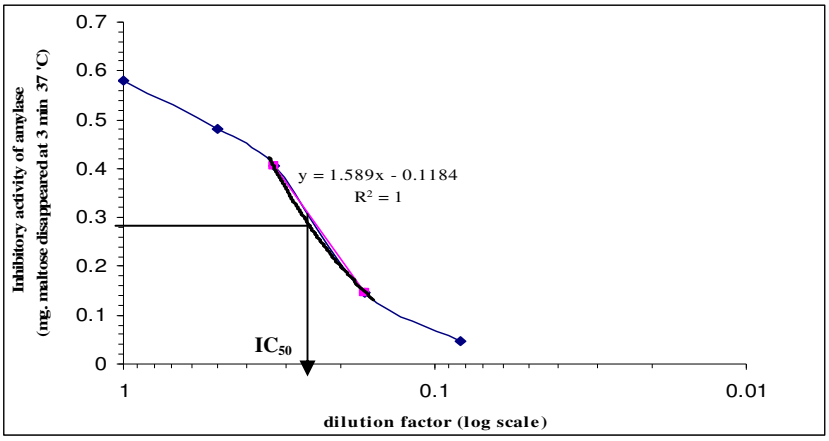
วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้สารละลายตัวอย่างผสมกับสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH : 2% $NaKC_4H_4O_6$: 1% $CuSO_4$) ในอัตราส่วน 98 : 1 : 1 v/v ให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายโฟลินฟีนอล (Folin – Ciocalteau's Phenol reagent) ความเข้มข้น 1 N ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)

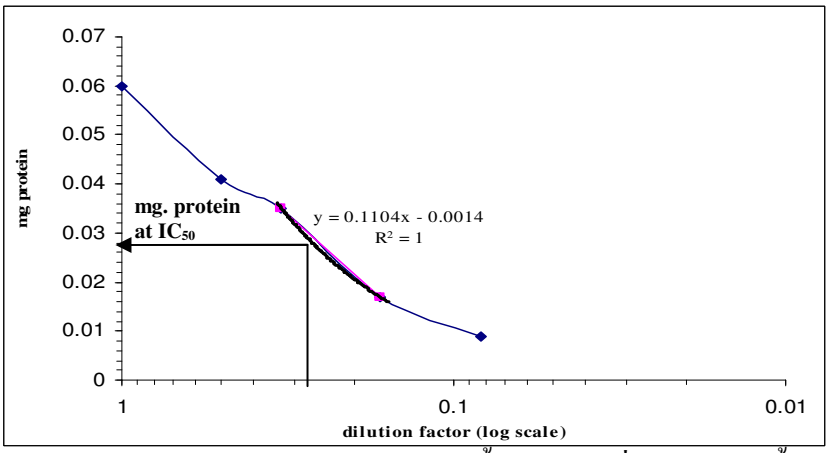
การหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างที่ให้ค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 โดยนำค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง หรือ ค่าการเจือจางตัวอย่างจากข้อ 1.4 มาหาค่าปริมาณโปรตีนบนกราฟที่เขียนระหว่าง มิลลิกรัมโปรตีน (แกน y) กับค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง หรือ ค่าการเจือจาง ดังแสดงในรูป 2B

1.6 การวิเคราะห์ผลข้อมูล

ใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS : one-way ANOVA ที่ค่า p-value น้อยกว่า 0.05



A.



B.

รูปที่ 2 กราฟแสดงการหาความเข้มข้นของสารยับยั้งอะไมเลสที่ให้ค่าการยับยั้ง 50% (IC_{50}) และปริมาณโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสที่ IC_{50}

A. IC_{50} ของสารยับยั้งอะไมเลส **B.** ปริมาณโปรตีนของสารยับยั้งอะไมเลสที่ IC_{50}

1.7 คัดเลือกวิธีการตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลสจากน้ำยางกล้วย

1.7.1 เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารสกัดที่ได้จากการเตรียมตามวิธีการทดลอง ข้อ 1.2 เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้นอิ่มตัวที่ร้อยละ 0, 40, 60 และ 80 นำตะกอนที่ได้ละลายคืนด้วย 0.02 M phosphate buffer pH 6.9-0.01 M NaCl (บัฟเฟอร์ A) นำสารละลายที่ได้มาหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสและปริมาณโปรตีน คำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส เปรียบเทียบและคัดเลือกวิธีที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงสุดเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.7.2 เอทธานอล

นำสารสกัดน้ำยางกล้วยมาเติมเอทธานอล ให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 20, 40, 60 และ 95 ปริมาตร 2 เท่าของสารตัวอย่าง และตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ นำสารละลายที่ได้เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 x g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แยกตะกอนและส่วนใส ล้างตะกอนด้วยเอทธานอลความเข้มข้นเดิมซ้ำอีก 3 ครั้ง ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ A ด้วยปริมาตรเท่าสารสกัดที่ใช้ (1 มล.) ส่วนใสนำไประเหยเอทธานอลออก จากนั้นทำให้แห้งด้วย freeze dryer ละลายคืนด้วย บัฟเฟอร์ A ปริมาตรเท่าสารสกัดที่เริ่มต้น (1 มล.) นำสารละลายของตะกอน และส่วนใสที่ได้ไปหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน และคำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส

1.8 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้นสารยับยั้งอะไมเลส

1.8.1 การเตรียมสารสกัดจากน้ำยางกล้วย

ดำเนินการเช่นข้อ 1.2 นำสารสกัดที่ได้มาตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณโปรตีน คำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ และนำไปตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลสด้วยเอทธานอลต่อไป

1.8.2 ตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลสด้วยเอทธานอล

นำสารสกัดจากน้ำยางกล้วย 30 มล. มาตกตะกอนด้วยเอทธานอลที่ร้อยละความเข้มข้นที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงสุด จากข้อ 1.7.2 คนที่ 4°ซ และตั้งทิ้งไว้ 2 ชม. นำสารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ระเหยเอทธานอลออก ได้สารละลาย B_{95} (20 มล.) นำสารละลายนี้ไปตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณโปรตีน คำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ และนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

1.8.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสด้วยเจลฟิลเตรชั่นโครมาโทกราฟี

1.8.3.1 คอลัมน์ Sephadex G-75

นำผง Sephadex G-75 มาแช่ให้พองตัวในน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำกลั่นใหม่ 2-3 ครั้งเพื่อล้างเม็ดเจลให้สะอาด บรรจุลงคอลัมน์ (ขนาด 120 x 1.3 ซม.) ปริมาตร 120 มล. ได้ความสูงของเจล 110 ซม. ปรับสมดุลคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจลที่บรรจุ โดยใช้อัตราไหล 20 มล. ต่อ ชม. ที่ 4°ซ

นำ B_{95} มาเซนตริฟิวจ์ที่ 5,000 x g ที่ 4°ซ 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 3 มล. (มีปริมาณโปรตีน 64.35 มก.) มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A ด้วยอัตราการไหล 20 มล. ต่อ ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ชะออกมา ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมา สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เข้าใกล้ศูนย์ เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{280}) กับจำนวนหลอดทดลองและหากิจกรรมยับยั้งอะไมเลส เช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ข้อ 1.3 นำสารละลายที่ได้จากการรวมสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้งเข้าด้วยกันไปทำแห้งด้วย freeze dryer แล้วละลายกลับด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายได้ ด้วยบัฟเฟอร์A (สารละลายที่ได้เรียก B_{G-75}) นำไปหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน และคำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ

1.8.4 ทำตารางแสดงความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสขั้นตอนต่าง ๆ

ทำตารางแสดงความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย ค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสทั้งหมด (Total inhibitory activity) ปริมาณ

โปรตีนทั้งหมด (Total protein) ค่าการยับยั้งจำเพาะ (Specific inhibitory activity) ร้อยละของปริมาณผลผลิตที่ได้คืน (% Yield) และค่าความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลส (Purification fold) โดยค่าทั้งหมดได้จากกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสที่ร้อยละ 50 และปริมาณโปรตีนที่จุดนั้นคูณ dilution factor เป็นกิจกรรมการยับยั้งและปริมาณโปรตีนทั้งหมด

1.9 การหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสโดยเจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

หาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสโดยใช้คอลัมน์ซึ่งบรรจุ Sephadex G-75 ปริมาตร 120 มล. ขนาด 110 x 1.3 ซม. ใช้ บัฟเฟอร์ A ชะคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 20 มล. ต่อชั่วโมงที่ 4°ซ เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. วัดปริมาตรชะที่โปรตีนตัวยับยั้งอะไมเลสออกมา (elution volume, V_e) เปรียบเทียบกับปริมาตรชะของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA ขนาดโมเลกุล 67,000 ดาลตัน) โอวัลบูมิน (Ovalbumin ขนาดโมเลกุล 43,000 ดาลตัน) และ ไรโบนิวคลีเอส เอ (Ribonuclease A ขนาดโมเลกุล 13,700 ดาลตัน) ซึ่งผ่านคอลัมน์ทีละตัว โดยโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัวมีความเข้มข้น 5 มก. ต่อ มล. ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ อัตราการไหลและเก็บสารละลาย เช่นการชะสารยับยั้งอะไมเลส นำสารที่ได้จากการชะคอลัมน์วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

หาปริมาตรภายนอกเม็ดเจล หรือ ปริมาตรวอยด์ (Void volume, V_o) ด้วย บลูเด็กซ์-แทรน (Blue dextran ขนาดโมเลกุล 2,000,000 ดาลตัน) ความเข้มข้น 5 มก./มล. และหาปริมาตรรวมของคอลัมน์ (Total colume, V_t) โดยใช้โพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium dichromate ขนาดโมเลกุล 247 ดาลตัน) โดยผ่านคอลัมน์เดิม ชะคอลัมน์ ด้วยอัตราไหล และเก็บสารละลาย เช่นตัวอย่าง วัดค่าดูดกลืนแสงสารที่ถูกชะที่ 620 นาโนเมตรสำหรับบลูเด็กซ์แทรน และ 480 นาโนเมตรสำหรับโพแทสเซียมไดโครเมท คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution coefficient, K_{av}) ของโปรตีนแต่ละชนิดตามสมการ

$$K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_t - V_0)}$$

เมื่อ K_{av} แทน สัมประสิทธิ์การกระจายของโปรตีน V_0 แทน ปริมาตรภายนอกเม็ดเจล

V_t แทน ปริมาตรรวมของคอลัมน์ V_e แทน ปริมาตรชะของโปรตีน

หาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสโดยเปรียบเทียบค่า K_{av}กับ กราฟของโปรตีนมาตรฐานซึ่งเขียนระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุล กับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน

1.10 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ (Native polyacrylamide gel electrophoresis, Native-PAGE) เพื่อดูแบบแผนของโปรตีนองค์ประกอบ และทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสของตัวอย่างด้วยวิธี Starch –PAGE

1.10.1 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลส โดยนำตัวอย่างในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำบริสุทธิ์มาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่างโดยผสมสารละลายตัวอย่าง 3 ส่วน ผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) สำหรับ Native-PAGE 1 ส่วน ซึ่งมีองค์ประกอบดังตาราง A.1 (ภาคผนวก) เตรียมแผ่นเจล ตามวิธีดัดแปลงของ Davis (1964) ซึ่งมีโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 3% ใน 0.063 M Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน (stacking gel) โพลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้น 10% ใน 0.75 M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง (separating gel) โดยมีองค์ประกอบของเนื้อเจล ดังตาราง A.2 (ภาคผนวก) นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้และมีปริมาณโปรตีนประมาณ 7.5-10 ไมโครกรัม ใส่ลงในแต่ละช่องเจล แยกโปรตีนในแผ่นเจลด้วยบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, pH 8.3 กระแสไฟฟ้า 15 mA/เจล 1 แผ่น นานประมาณ 3 ชม. เมื่อสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนไปถึงขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟฟ้า นำเจลไปย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์ไนเตรท ตามวิธีของ Morrissey และคณะ (1981) ดังนี้

นำแผ่นเจลลงแช่ใน 40% เมทธานอล-10% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที เพื่อตรึงโปรตีนในแผ่นเจล จากนั้นนำเจลลงแช่ในสารละลาย 5% เมทานอล-7.5% กรดน้ำส้ม นาน 30 นาที นำแผ่นเจลแช่น้ำกลั่น 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำเจลแช่ในสารละลาย DTT (dithiothreitol) ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มล. นาน 30 นาที จากนั้นนำเจลแช่สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 % นาน 20 นาที แล้วนำเจลล้างน้ำกลั่นเพื่อกำจัดซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก นำไปแช่สารที่ทำให้เกิดสี (3% sodiumcarbonate-37% formaldehyde) เขย่าจนปรากฏแถบโปรตีน หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดน้ำส้ม 50%

1.10.2 การตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยอิเล็กโทร-โฟรีซีสแบบ Starch-PAGE

เพื่อพิสูจน์ให้ชัดเจนขึ้นว่าแถบโปรตีนขนาดเท่าใดเป็นสารยับยั้งอะไมเลส นำตัวอย่างทดสอบ ด้วยวิธี Starch-PAGE ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Giri และ Kachole (1996) ซึ่งมีหลักการดังนี้

แยกโปรตีนสภาพธรรมชาติในแผ่นโพลีอะครีลาไมด์เจล 10 % ที่มีน้ำแป้งผสมอยู่ 0.1% เพื่อเป็นสับสเตรทของเอนไซม์อะไมเลส ภายหลังการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส นำแผ่นเจลแช่ในสารละลายเอนไซม์อะไมเลสที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์ย่อยแป้งในเนื้อเจล ส่วนบริเวณเนื้อเจลที่มีสารยับยั้งอะไมเลสอยู่จะจับกันกับเอนไซม์อะไมเลส ส่งผลให้อะไมเลสย่อยแป้งบริเวณนั้นไม่ได้ เมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนจึงปรากฏแถบสีน้ำเงินตรงแถบของสารยับยั้งอะไมเลส

ดำเนินการทดลองโดยเตรียมแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 3% สำหรับเจลชั้นบน และเจลชั้นล่างที่มีความเข้มข้น 10% ซึ่งผสมน้ำแป้งที่มีความเข้มข้นเป็น 0.1% ต่อ 1 แผ่นเจล ส่วนผสมของเจลแสดงในตาราง A.3 (ภาคผนวก) ทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ตามวิธีการในข้อ 1.10.1 หลังทำอิเล็กโทรโฟรีซีส นำแผ่นเจลที่ได้แช่ในบัฟเฟอร์ A เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อปรับสมดุลในเจล จากนั้นนำลงแช่สารละลายอะไมเลส ที่มีกิจกรรม 0.6 หน่วย บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างอะไมเลสส่วนเกินบนแผ่นเจลออกด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่เจลในสารละลายไอโอดีน 0.3 % ที่เตรียมใหม่ ๆ เขย่าจนเกิดแถบสีน้ำเงินของแถบโปรตีนสารยับยั้งอะไมเลส เปรียบเทียบแถบโปรตีนยับยั้งอะไมเลสกับแถบโปรตีนที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ (ข้อ 1.10.1) เพื่อดูว่าแถบโปรตีนใดเป็นแถบของสารยับยั้งอะไมเลส

1.11 การหาขนาดโมเลกุลด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพระบบไตรซีน (Tricine sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine SDS-PAGE)

ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมี SDS ดัดแปลงตามวิธีของ Shagger และ Von Jagow (1987) โดยเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 3% เป็นเจลส่วนบน และโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 14-17 % เป็นเจลชั้นล่าง โดยส่วนผสมของเจลและบัฟเฟอร์ตัวอย่างแสดงรายละเอียดในตาราง A.4 และ A5 ตามลำดับ (ภาคผนวก)

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (B_{G-75}) และทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย Native-PAGE และ Starch-PAGE แล้ว 3 ส่วนผสมกับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE 1 ส่วน (บัฟเฟอร์ตัวอย่างมี 2 แบบคือแบบที่ผสมและไม่ผสม β-mercaptoethanol) ต้มตัวอย่างที่ได้ที่ 100°ซ นาน 5 นาที แยกโปรตีนในแผ่นเจลด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS, pH 8.25 (บัฟเฟอร์ขั้วลบ) และ 0.21M Tris, pH 8.9 (บัฟเฟอร์ขั้วบวก) ใช้กระแสไฟฟ้า 20 mA/เจล 1 แผ่น นานประมาณ 3 ชม. เมื่อสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนไปถึงขอบล่างของแผ่นเจลปิดกระแสไฟฟ้า เก็บและนำเจลไปย้อมแถบโปรตีนด้วยซิลเวอร์ ตามวิธีที่กล่าวแล้วในหัวข้อที่ 1.10.1

คำนวนระยะทางการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของแถบโปรตีนตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานจากความสัมพันธ์ดังนี้

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

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุล กับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรีเลส บี (phosphorelase b, ขนาดโมเลกุล 97,000 ดาลตัน), โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, ขนาดโมเลกุล 67,000 ดาลตัน), โอวัลบูมิน (ovalbumin, ขนาดโมเลกุล 45,000 ดาลตัน), คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, ขนาดโมเลกุล 30,000 ดาลตัน), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor, ขนาดโมเลกุล 20,000 ดาลตัน) และ แอลฟา-แลคทัลบูมิน (α-lactalbumin, ขนาดโมเลกุล 14,000 ดาลตัน) นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวนหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยและรวมของสารยับยั้งอะไมเลส

1.12 การจำแนกชนิดของสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีน

การตรวจเอกสารพบว่า สารประกอบพวกฟีนอลเป็นสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนได้ (McCue และคณะ 2004; Correia และคณะ 2004) งานวิจัยนี้จึงออกแบบการจำแนกชนิดของสารยับยั้งอะไมเลสที่ไม่เป็นโปรตีนว่าเป็นสารกลุ่มฟีนอลหรือไม่ด้วยวิธีดังนี้

1.12.1 ทำปฏิกิริยากับ ferric chloride ($FeCl_3$)

สารละลาย $FeCl_3$ สามารถเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอล ให้สารละลายสีน้ำเงิน-ดำ หรือ เขียวอมน้ำตาล

การทดสอบทำโดยหยดสารละลาย $FeCl_3$ ที่มีความเข้มข้น 0.1% w/v 2-3 หยดในสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มล. สังเกตุการเปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ gallic acid และ tannin

1.12.2 ทำปฏิกิริยากับสารละลาย sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) อิ่มตัว

สารละลาย $NaHCO_3$ เมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีหมู่ –COOH จะเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ปรากฏเป็นฟองอากาศผุดขึ้นชัดเจนในสารละลาย

การทดสอบทำโดยหยดสารละลาย $NaHCO_3$ อิ่มตัว 2-3 หยดลงในสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มล. สังเกตุการเปลี่ยนแปลง โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ gallic acid และ tannin โดยใช้ acetic acid เป็น positive control การดูฟองก๊าซ

1.12.3 การหาปริมาณฟีโนลิคโดยปฏิกิริยากับสารละลายโฟลิน (Folin's reagent)

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ของตัวอย่างตามวิธีของ Slinkard และ Singleton (1977) โดยใช้สารละลายตัวอย่างผสมกับสารละลายโฟลิน ความเข้มข้น 1 N ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 20% (w/v) โซเดียมคาร์บอเนตผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 ชม. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลในสารละลายโดยนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid

หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิคของสารตัวอย่างที่ให้ค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 โดยนำค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง หรือ ค่าการเจือจางตัวอย่างจากข้อ 1.4 มาหาค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลบนกราฟที่เขียนระหว่างมิลลิกรัม gallic acid (แกน y) กับค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง หรือ ค่าการเจือจาง เช่นเดียวกับการหาปริมาณโปรตีนที่ให้ค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 ในวิธีการทดลอง ข้อ 1.5

1.12.4 ศึกษารูปแบบ bathochromic shift ของสเปคตรัมช่วง UV-Vis ของตัวอย่าง

สารประกอบฟีโนลิคมีคุณสมบัติของวงแหวน aromatic สามารถดูดกลืนแสงช่วง UV ได้ดี และเมื่อเติมด่างลงไปในสารละลายฟีโนลิค จะเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ bathochromic shifts ของสเปคตรัมซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสาร

นำตัวอย่างจากน้ำยางกล้วยที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ หรือตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ มาดำเนินการทดลอง ดังนี้

นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 0.1 มล. มาเติมน้ำกลั่นจนครบ 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200 – 500 นาโนเมตร เติม 6 M NaOH จำนวน 2 หยด ลงในหลอดตัวอย่างเพิ่ม เขย่าให้เข้ากัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นเดิม

เปรียบเทียบรูปแบบการดูดกลืนแสงของตัวอย่างกับสารมาตรฐาน gallic acid และ tannin ซึ่งดำเนินการทดลองเช่นเดียวกันกับตัวอย่าง

1.12.5 ศึกษาหมู่ฟังก์ชันนัลด้วยรังสีอินฟราเรด

(Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR spectrometer)

IR-spectroscopy เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้จำแนก (identify) สารประกอบได้บนพื้นฐานของการตรวจหาหมู่ที่มีสมบัติเฉพาะตัวที่เรียกว่าหมู่ฟังค์ชันนัล (functional group) ของสารนั้นๆ คุณสมบัติสำคัญของ IR-spectroscopy ที่จะบอกหมู่ของฟีโนลิค ได้แก่ ค่าย่านจำนวนคลื่น (cm^{-1}) C=C, C=O และ O-H stretching และ C-H bending

เตรียมสารตัวอย่างที่ใช้บันทึก IR-spectrum โดยนำสารตัวอย่างที่สนใจไปทำให้แห้งเป็นผงมาบดผสมกับผงโปแตสเซียมโบรไมด์ (KBr) ในสัดส่วน ตัวอย่าง ต่อ KBr 1:4 (w/w) ในโกร่งหยก แล้วนำไปอัดที่แรงอัด 5 ตัน ให้ได้แผ่นตัวอย่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 ซม. นำแผ่นกลมที่ได้บรรจุในอุปกรณ์ใส่ตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FT-IR ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Spectrum GX โดยใช้ความยาวคลื่นอินฟราเรดในช่วง 400 – 4000 ซม$^{-1}$

นำ IR spectrum ที่ได้ไปอ่านผล ตรวจหมู่ฟังค์ชั่นนัลของสารประกอบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และ tannin และข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงรูปแบบ IR spectrum

1.12.6 การจำแนกสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

(Thin layer chromatography, TLC)

นำสารละลายตัวอย่างที่สนใจศึกษา มาย่อยด้วยกรด HCl ความเข้มข้น 2 M ด้วยสัดส่วนระหว่างตัวอย่างและกรด 1:1 (v/v) เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ 5,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกส่วนใสสกัดสารประกอบฟีนอลด้วยอีเทอร์ (ether) ด้วยสัดส่วนตัวอย่างและอีเทอร์ 1:1 (v/v) ล้างชั้นอีเทอร์ด้วยน้ำกลั่นจนหมดความเป็นกรด (ทดสอบกับกระดาษลิตมัส) จากนั้นระเหยอีเทอร์จนแห้งและละลายกลับด้วยอีเทอร์ (ether hydrolysate) เพื่อนำไปจำแนกสารองค์ประกอบด้วย TLC เทียบกับสารมาตรฐาน 5 ชนิด ได้แก่ hydroxybenzoic acid, gallic acid, hydroquinone, 2,5-dihydroxy benzoic acid และ salicylic acid ความเข้มข้น 1 มก. / มล. ในเอทธานอล

ทำความสะอาดพื้นผิวแผ่นกระจกขนาด 7x 7 ซม. ด้วย acetone เคลือบแผ่นกระจกด้วยซิลิกาเจล ชนิด 60 จีเอฟ (silica gel 60 GF) ซึ่งผสมกับน้ำกลั่นในสัดส่วน ผงซิลิกา 10 กรัมในน้ำ 25 มล. ที่มีความหนืดเหมาะสม ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วอบที่อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 24 ชม. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

นำตัวอย่างในอีเทอร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร spot บนแผ่น TLC ด้วยหลอดแก้วขนาดเล็ก (capillary) ห่างจากขอบ 1 ซม. ตั้งทิ้งไว้ให้จุดตัวอย่างแห้งสนิท แล้วจึงนำไปแยกด้วยระบบ TLC แบบ 2 ทิศทาง (2-dimensional TLC) โดยระบบที่ 1 ใช้ acetic acid : chloroform ในสัดส่วน 1 : 9 (v/v) และระบบที่ 2 ใช้ ethyl acetate : benzene ในสัดส่วน 9 : 11 (v/v)

ตรวจหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารบนแผ่น TLC หลังการพ่นด้วยสารละลายโฟ-ลินฟีนอล ความเข้มข้น 1 N และหลังการอังไอแอมโมเนีย

ภายหลังการพ่นด้วยสารละลายโฟลินฟีนอล สารประกอบฟีนอลพวก gallic acid, hydroquinone และ 2,5-dihydroxybenzoic acid จะเกิดปฏิกิริยากลายเป็นสีน้ำเงิน หลังจากไปอังไอแอมโมเนีย สารประกอบฟีนอลพวก hydroxybenzoic acid และ salicylic acid จะเกิดสีน้ำเงิน เปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานเปรียบเทียบตำแหน่งการเคลื่อนที่กับสารมาตรฐานที่แยกด้วยระบบทิศทางเดียว ในระบบตัวทำละลายที่ 1 และ 2 ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์หาได้จากสูตรข้างล่าง

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ } (R_f) = \frac{\text{ระยะการเคลื่อนที่ของตัวอย่าง}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย}}$$

ส่วนที่ 2 น้ำยางมะละกอ

2.1 การเก็บน้ำยางมะละกอ

เก็บน้ำยางจากผลมะละกอ (*Carica papaya*) สายพันธุ์ แขกดำ ปลูกที่อำเภอ นาหม่อม จังหวัดสงขลา ดำเนินการในช่วงเช้าเวลา 6.00-10.00 โดยกรีดผลดิบด้วยมีดโกน สแตนเลส ลึกประมาณ 0.1 ซม. รองน้ำยางด้วยหลอดพลาสติกที่วางบนน้ำแข็ง ดังรูปที่ 3 ปล่อยให้น้ำยางไหลจนหมด ประมาณ 5 นาที แล้วกรีดรอยใหม่ เก็บน้ำยางให้ได้ปริมาตรตามต้องการ

A **B** **C**

รูปที่ 3 แสดงการเก็บน้ำยางมะละกอเพื่อนำน้ำยางไปศึกษา

A แสดงลักษณะของต้นมะละกอ

B แสดงการเก็บน้ำยางมะละกอโดยการกรีดผลตามแนวตั้ง

C แสดงการกรีดผลซ้ำเมื่อรอยเดิมไม่มีน้ำยางไหล

2.2 การเตรียมสารสกัดจากน้ำยางมะละกอ

สกัดน้ำยางมะละกอที่เก็บตามวิธีทดลองข้อ 2.1 ตามวิธีดัดแปลงของ Grant และคณะ (1995) โดยผสมน้ำยางมะละกอ กับบัฟเฟอร์ 0.02 M Phosphate buffer pH 6.9 – 0.15 M NaCl ด้วยสัดส่วนน้ำยางมะละกอ ต่อ บัฟเฟอร์ 1:1 (w/v) ใช้แท่งแม่เหล็กคนเป็นเวลา 16 ชม. ที่ 4°ซ หลังจากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบ 10,000 x g ที่ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ก่อนที่จะละลายคืนด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรลดลงครึ่งหนึ่งจากปริมาตรเริ่มต้น แบ่งย่อยใส่หลอดที่มีฝาปิด หลอดละ 10 และ 1 มล. เก็บไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.3 การหาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลส

หาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสในตัวอย่างสารสกัดจากน้ำยางมะละกอ หรือ สารที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.3

2.4 การหาความเข้มข้นของสารยับยั้งอะไมเลสที่ให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 (IC_{50})

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.4

2.5 การหาปริมาณโปรตีน

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.5

2.6 การวิเคราะห์ผลข้อมูล

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.6

2.7 เปรียบเทียบการเก็บน้ำยางมะละกอในสภาพต่าง ๆ

ในน้ำยางมะละกอมีโปรตีนอยู่จำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกเอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งอาจย่อยโปรตีนที่สนใจเสียหายได้ เพื่อรักษาสภาพของน้ำยางมะละกอให้มีความคงตัวมากที่สุดได้มีการศึกษาวิจัยเติมสารบางตัวลงไปผสมกับน้ำยางมะละกอขณะเก็บน้ำยาง

การทดลอง : ทำการเก็บน้ำยาง 3 แบบดังนี้

(1) เก็บน้ำยางมะละกอผสมน้ำกลั่นในสัดส่วน 1:1 v/v

(2) เก็บน้ำยางมะละกอผสมสารละลาย MMTS ที่มีความเข้มข้น 5 mM ขณะเก็บในสัดส่วน 1:1 v/v

(3) เก็บนำยางมะละกอผสมบัฟเฟอร์ A

นำน้ำยางทั้ง 3 แบบเก็บใส่หลอดพลาสติกและแช่น้ำแข็งไว้ระหว่างการขนส่งสู่ห้องทดลอง เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบโดยการเซนตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 40,000 x g ที่ 4°ซ เป็นเวลา 30 นาที ตามวิธีของ Akarzarn และคณะ (2004) แยกส่วนใสที่ได้จากการเตรียมทั้ง 3 แบบใช้เป็นสารสกัดหยาบเพื่อใช้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.3)

2.8 ผลของความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลส จากน้ำยางมะละกอ

คัดเลือกร้อยละความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของตะกอนสูงที่สุดโดย นำสารสกัดที่ได้จากการเตรียมตามวิธีการทดลอง ข้อ 2.2 เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0, 40, 60 และ 80 ของความอิ่มตัว นำตะกอนที่ละลายคืนด้วยบัฟเฟอร์ A และไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่นที่ 4 °ซ เป็นเวลา 16 ชม. (Azarkan และคณะ 2004) ทำเข้มข้นโดยการดูดน้ำด้วย CM cellulose นำสารละลายที่ได้มาหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส และปริมาณโปรตีน คำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส คัดเลือกร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงสุดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.9 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้นสารยับยั้งอะไมเลส

2.9.1 การเตรียมสารสกัดจากน้ำยางมะละกอ

ดำเนินการเช่นข้อ 2.2 นำสารสกัดที่ได้มาตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณโปรตีน และคำนวนค่าการยับยั้งจำเพาะ และนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตต่อไป

2.9.2 ตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารสกัดจากน้ำยางมะละกอ 100 มล. มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงสุด จากข้อ 2.8 คนที่ 4°ซ และตั้งทิ้งไว้ 2 ชม. นำสารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 15 นาที เก็บตะกอนละลายในบัฟเฟอร์ A ด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ตะกอนละลายได้หมด นำไปไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่นที่ 4 °ซ จากนั้นทำเข้มข้นโดยการดูดน้ำด้วย CM cellulose สารละลายที่ได้เรียก P_{80} (25 มล.) นำสารที่ได้ไปตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณโปรตีน คำนวนค่าการยับยั้งจำเพาะ และนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

2.9.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสด้วยเจลฟิลเตรชั่นโครมาโทกราฟี

2.9.3.1 คอลัมน์ Sephadex G-75

เตรียมคอลัมน์ (ขนาด 120 x 1.3 ซม.) เพื่อบรรจุ Sephadex G-75 เช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.8.3.1 ใช้อัตราไหล 10 มล. ต่อ ชม. ที่ 4°ซ

นำ P_{80} มาเซนตริฟิวจ์ที่ 5,000 x g ที่ 4°ซ 10 นาที แยกส่วนใสปริมาตร 4 มล. (มีปริมาณโปรตีน 75 มก.) มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A ด้วยอัตราการไหล 10 มล. ต่อ ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ติดตามการแยกโปรตีนและหากิจกรรมยับยั้งอะไมเลส เช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.8.3.1 หลังจากรวมสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้ง และทำแห้งด้วย freeze dryer แล้วละลายกลับด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายได้ ด้วยบัฟเฟอร์A (สารละลายที่ได้เรียก P_{G-75}) นำไปหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน และคำนวนค่าการยับยั้งจำเพาะ

2.9.4 ทำตารางแสดงความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสขั้นตอนต่าง ๆ

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.8.4

2.10 การหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสโดยเจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

หาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสโดยใช้คอลัมน์ซึ่งบรรจุ Sephadex G-75 ปริมาตร 120 มล. ขนาด 110 x 1.3 ซม. ใช้ บัฟเฟอร์ A ชะคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 10 มล. ต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ดำเนินการหาขนาดโมเลกุลเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.9

2.11 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์

2.11.1 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.10.1

2.11.2 การตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยอิเล็กโทร-โฟรีซีสแบบ Starch-PAGE

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.10.2

2.12 การหาขนาดโมเลกุลด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพระบบไตรซีน (Tricine sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine SDS-PAGE)

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.11 โดยใช้ตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (P_{G-75}) มาทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย Native-PAGE และ Starch-PAGE ก่อน แล้วจึงนำตัวอย่างมาวิเคราะห์

ส่วนที่ 3 น้ำยางพารา

3.1 การเก็บน้ำยางพารา

เก็บน้ำยางพาราจากต้นยาง (*Hevea brasiliensis*) สายพันธุ์ RRIM 600 ปลูกที่อำเภอ นาหม่อม จังหวัดสงขลา ดำเนินการในช่วงเช้าเวลา 3.00-7.00โดยกรีดลำต้นด้วยมีดกรีดยาง ลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร รองน้ำยางด้วยถ้วยกระเบื้องที่วางบนน้ำแข็ง ดังรูปที่ 4 ปล่อยให้น้ำยางไหลประมาณ 4-5 ชั่วโมง เก็บน้ำยางให้ได้ปริมาตรตามที่ต้องการ

A **B**

รูปที่ 4 แสดงการเก็บตัวอย่างน้ำยางพาราเพื่อใช้ศึกษา

A แสดงภาพสวนยางพาราที่ใช้ศึกษา

B แสดงภาพการเก็บน้ำยางพาราโดยแช่ในน้ำแข็งเพื่อรักษาสภาพน้ำยาง

3.2 การเตรียม C-serum จากน้ำยางพารา

นำน้ำยางพาราที่เก็บตามข้อ 3.1 ไปเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 50,000 x g ที่ 4°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แยกส่วนใส (C-serum)โดยนำพาสเจอร์ปิเปตสอดผ่านชั้นเนื้อยางลงไป นำ C-serum ที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วรอบเดิมอีกครั้ง แบ่ง C-serum ใส่หลอดที่มีฝาปิด หลอดละ 1 มล. เก็บไว้ที่ -20 °ซ เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3 การหาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลส

หาปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสใน C-serum หรือ สารที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.3

3.4 การหาความเข้มข้นของสารยับยั้งอะไมเลสที่ให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 (IC_{50})

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.4

3.5 การหาปริมาณโปรตีน

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.5

3.6 การวิเคราะห์ผลข้อมูล

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.6

3.7 เปรียบเทียบการเก็บน้ำยางพาราในสภาพต่าง ๆ

ในน้ำยางพารามีสารต่าง ๆ ปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งอนุภาคเนื้อยาง ของเหลวต่าง ๆ และโปรตีนจำนวนมาก แต่โปรตีนดังกล่าวจะเกิดการสลายตัว ซึ่งอาจเกิดจากเอนไซม์ที่ปะปนอยู่ ดังนั้นเพื่อเป็นการรักษาสภาพของน้ำยางพาราให้มีความคงตัวมากที่สุดจึงทำการเติมสารบางตัวลงไปผสมกับน้ำยางพาราขณะเก็บน้ำยาง เช่น glycerinated buffer ซึ่งประกอบด้วย sodium bicarbonated 0.1 โมล ต่อ ลิตร glycerol 50% w/v และ cysteine 5 มิลลิโมล ต่อ ลิตร (Akasawa และคณะ 1995)

การทดลอง : ทำการเก็บน้ำยาง 2 แบบดังนี้

(1) เก็บน้ำยางตามปกติ ตามวิธีข้อ 3.1

(2) เก็บน้ำยางผสม glycerinated buffer โดยทันทีที่เก็บน้ำยางได้ ตามวิธีข้อ 3.1 มาเติม glycerinated buffer ในสัดส่วน 1:2 v/v

นำน้ำยางที่ได้ทั้ง 2 แบบใส่ถุงพลาสติก แช่น้ำแข็ง เพื่อนำไปห้องทดลองเพื่อเตรียม C-serum (ตามวิธีข้อ 3.2) เมื่อได้ C-serum แล้ว เติม glycerol ลงใน C-serum ที่ได้จากน้ำยางผสม glycerinate buffer ในสัดส่วน 1:1 v/v จากนั้นนำตัวอย่าง C-serum ที่ได้ทั้ง 3 ชนิด ไปตรวจวัดค่ากิจกรรมอะไมเลส เช่นเดียวกับวิธีการทดลองในส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.3

3.8 ผลของร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลส จาก C-serum

คัดเลือกร้อยละความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของตะกอนสูงที่สุด ดังนี้

นำ C-serum มาเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0, 20, 40, 60 และ 80 ของความอิ่มตัว คนให้เกลือละลาย และตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่ 4 °ซ นำสารละลายที่ได้ไป

เซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 x g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายในบัฟเฟอร์ 0.02 M Phosphate buffer pH 6.9- 0.01 M NaCl (บัฟเฟอร์A) คืนปริมาตรเดิมของ C-serum นำสารละลายที่ได้มาหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส และปริมาณโปรตีน คำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส คัดเลือกร้อยละความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงสุดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.9 การทำบริสุทธิ์เบื้องต้นสารยับยั้งอะไมเลส

3.9.1 การเตรียม C-serum

ดำเนินการเช่นข้อ 3.2 นำ C-serum ที่ได้มาตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะ-ไมเลส ปริมาณโปรตีน คำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ และนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่คัดเลือกแล้วต่อไป

3.9.2 ตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำ C-serum 100 มล. มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละความอิ่มตัวที่ให้ค่าการยับยั้งจำเพาะสูงสุด จากข้อ 3.8 คนที่ 4°ซ และตั้งทิ้งไว้ 2 ชม. นำสารละลายที่ได้ไปเซนตริฟิวจ์ที่ 10,000 x g ที่ 4 °ซ นาน 15 นาที เก็บตะกอนละลายในบัฟเฟอร์ A ด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ตะกอนละลายได้หมด (25 มล.) สารละลายที่ได้เรียก C_{80} นำสารที่ได้ไปหากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณโปรตีน คำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ และนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75

3.9.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสด้วยเจลฟิลเตรชั่นโครมาโทกราฟี

3.9.3.1 คอลัมน์ Sephadex G-75

เตรียมคอลัมน์ (ขนาด 120 x 1.3 ซม.) เพื่อบรรจุ Sephadex G-75 เช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.8.3.1 ปรับสมดุลย์ของคอลัมน์ใช้อัตราไหล 20 มล. ต่อ ชม. ที่ 4°ซ

นำ C_{80} มาเซนตริฟิวจ์ที่ 5,000 x g ที่ 4°ซ 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 5 มล.(มีปริมาณโปรตีน 94 มก.) มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A ด้วยอัตราการไหล 20 มล. ต่อ ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 1 มล. ติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ชะออกมา ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมา สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่เข้าใกล้ศูนย์ เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร(A_{280}) กับจำนวนหลอดทดลอง

นำสารละลายที่เก็บทุก 5 หลอดไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส เขียนกราฟระหว่างค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสและจำนวนหลอด รวมสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงเข้าด้วยกัน นำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ละลายกลับด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายได้ด้วยบัฟเฟอร์ A (สารละลายที่ได้เรียก C_{G-75}) นำไปหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีน คำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ และนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25

3.9.3.2 คอลัมน์ Sephadex G-25

นำผง Sephadex G-25 มาแช่ให้พองตัวในน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำกลั่นใหม่ 2-3 ครั้งเพื่อล้างเม็ดเจลให้สะอาด บรรจุลงคอลัมน์ (ขนาด 120 x 1.3 ซม.) ปริมาตร 120 มล. ได้ความสูงของเจล 110 ซม. ปรับสมดุลคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจลที่บรรจุ โดยใช้อัตราไหล 20 มล. ต่อ ชม. ที่ 4°ซ

นำตัวอย่าง C_{G-75} ปริมาตร 5 มล. (มีปริมาณโปรตีน 5 มก.) มาผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A ด้วยอัตราการไหล 20 มล. ต่อ ชม. เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ชะออกมา ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่เข้าใกล้ศูนย์ เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรกับจำนวนหลอดทดลอง

นำสารละลายที่เก็บทุก 5 หลอดไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส เขียนกราฟระหว่างค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสกับจำนวนหลอด รวมสารละลายที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงเข้าด้วยกัน นำไปทำแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ละลายกลับด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ละลายได้ ด้วยบัฟเฟอร์ A (สารละลายที่ได้เรียก C_{G-25}) นำไปหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ปริมาณโปรตีนและคำนวณค่าการยับยั้งจำเพาะ

3.9.4 ทำตารางแสดงความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสขั้นตอนต่าง ๆ

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.8.4

3.10 การหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสโดยเจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

หาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสโดยใช้คอลัมน์ซึ่งบรรจุ Sephadex G-75 ปริมาตร 120 มล. ขนาด 110 x 1.3 ซม. ใช้ บัฟเฟอร์ A ชะคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 20 มล. ต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 2 มล. ดำเนินการหาขนาดโมเลกุลเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.9

3.11 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์

3.11.1 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วย ข้อ 1.10.1

3.11.2 ตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ Starch-PAGE

ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วยข้อ 1.10.2

3.12 การหาขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลส ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพระบบไตรซีน (Tricine sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis, Tricine SDS-PAGE)

บ่มสารละลาย C_{G-25} ที่มีปริมาณโปรตีน 160 ไมโครกรัม ปริมาตร 1 มล. กับสารละลายอะไมเลสที่มีโปรตีน 160 ไมโครกรัม ปริมาตร 1 มล. ที่ 37°ซ นาน 30 นาที แยกสารประกอบอะไมเลสกับสารยับยั้ง ออกจากโปรตีนอื่นๆใน C_{G-25} ด้วย Sephadex G-25 (ขนาด 25 x 1.0 ซม.) ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A อัตราไหล 15 มล. ต่อ ชม. ที่ 4°ซ นำตัวอย่างที่ปริมาตรวอยด์ (Vo) ไปแยกแถบโปรตีนด้วย Native-PAGE ตามวิธีข้อ 3.11.1 จำนวน 2 แผ่น แผ่นแรกย้อมด้วย ซิลเวอร์ แผ่นที่สองย้อมด้วยสารละลายของ Bradford (1976) (ส่วนผสมแสดงในตาราง A6 ในภาคผนวก) นำแผ่นที่ย้อมด้วยสารละลาย Bradford มาตัดแถบเจลของสารยับยั้ง บดละเอียดใน

บัฟเฟอร์ A เซนตริฟิวจ์ เก็บส่วนใส ทำแห้งด้วย freeze dryer ละลายกลับด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนสารยับยั้ง (15 ไมโครลิตร) อีกครั้งด้วย Native-PAGE 10 % เจล (เช่นข้อ 3.11.1) จากนั้น นำไปหาขนาดโมเลกุลด้วย เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแปลงสภาพระบบไตรซีน ตามวิธีการทดลอง ส่วนที่ 1 ของน้ำยางกล้วยข้อ 1.11 ทั้งที่มี และไม่มี β-mercaptoethanol