2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade, AG หรือ analytical reagent, AR) หรือเทียบเท่า แบ่งเป็นประเภทต่างๆได้ดังนี้

สารที่ใช้ในการสกัดตัวอย่าง :

Calcium chloride ($CaCl_2$) และ 2-Mercaptoethanol ได้จากบริษัท Merck

Hexane และ Hydrochloric acid (HCl) ได้จากบริษัท Riedel-de-Haen

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ Tris(hydroxymethyl) aminomethane ได้จากบริษัท Sigma

Polyvinyl polypyrrolidone (PVP), Potassium chloride (KCl) และ Sodium chloride NaCl ได้จากบริษัท Carlo Erba

Sodium hydroxide (NaOH), Succinic acid และ Succinic acid disodium salt hexahydrate ได้จากบริษัท BDH

สารที่ใช้ในการตรวจกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส :

Alpha amylase และ Starch ได้จากบริษัท Sigma

3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ได้จากบริษัท Fluka

Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate ($Na_2HPO_4.12H_2O$) และ Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4.2H_2O$) ได้จากบริษัท Merck

D(+)-Glucose anhydrous และ Sodium potassium tartrate tetrahydrate ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$) ได้จากบริษัท Carlo Erba

Iodine ได้จากบริษัท J.T. Baker

สารที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ :

Acetic acid ได้จากบริษัท J.T. Baker

Ammonium sulphate (NH_4)$_2SO_4$ ได้จากบริษัท Merck

Aquacide (carboxymethyl cellulose, Na salt), Carboxymethyl Cellulose (CM-cellulose) และ Hydroxyapatite type I ได้จากบริษัท Sigma

Sephadex G-75 ได้จากบริษัท Pharmacia

Sodium acetate ($CH_3COONa.3H_2O$) ได้จากบริษัท Carlo Erba

สารมาตรฐานบอกขนาดโมเลกุลของวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี :

Blue dextran ได้จากบริษัท Merck, Bovine serum albumin (BSA), Chymotrypsinogen A, Ovalbumin, Potassium dichromate $K_2Cr_2O_7$ และ Ribonuclease A ได้จากบริษัท Sigma

สารที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส :

Acrylamide, Ammonium persulphate (NH_4)$_2S_2O_8$, Bromophenol blue และ Glycine เกรด AG, Ethanol ได้จากบริษัท Merck

Coomassie brilliant blue R 250, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ N,N'-methylene bisacrylamide ได้จากบริษัท Fluka

Fuchsin (basic) และ Glycerol ได้จากบริษัท BDH

Methanol และ Trichloroacetic acid (TCA) ได้จากบริษัท Carlo Erba

N,N,N',N'-tetramethylene diamine (TEMED) และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) ได้จากบริษัท Sigma

สารมาตรฐานบอกขนาดโมเลกุลของวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส :

Low molecular weight marker ได้จากบริษัท Sigma

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น UV160A ของ Shimadzu, Japan
2. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (superspeed refrigerated centrifuge) รุ่น JA-21 ของ Beckman, USA.
3. เครื่องเซนตริฟิวจ์แรงสูง (ultracentrifuge) รุ่น L8-70M ของ Beckman, USA.
4. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบตั้งโต๊ะ (refrigerated bench-top centrifuge) รุ่น C-1200 ของ National Labnet, NJ.
5. Micropipette รุ่น 4M1522 ของ Merck, Germany
6. ชุดทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis unit) รุ่น AE-6450 ของ Atto, Japan
7. เครื่องกำเนิดไฟฟ้าสำหรับเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Power supply) รุ่น SX250-230V ของ Hoefer, USA.
8. Automatic fraction collector รุ่น 2110 ของ Biorad, USA.
9. Peristaltic pump รุ่น MP-3 ของ Eyela, Japan
10. เครื่องวัด pH ของสารละลาย (pH-meter) รุ่น PHM61 ของ Radiometer, Denmark
11. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของ Scientific Industries, USA.
12. เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น HB502 ของ Bibby Sterilin, UK.
13. เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์แบบอ่านทศนิยมได้ 2 ตำแหน่ง รุ่น SE2020 ของ Qhaus, NJ.

14. เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์แบบอ่านทศนิยมได้ 4 ตำแหน่ง รุ่น BP110S ของ Sartorius AG Gottingen, Germany
15. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water-bath) รุ่น WB22 ของ Memmert, Germany

วิธีการ

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ซื้อเนียงนกจากตลาดจำหน่ายเพื่อการบริโภค ตามฤดูกาล 3 ครั้ง (รุ่น) ให้มากพอที่จะใช้ หลังการทำความสะอาดจำนวน 1,000 กรัม แบ่งย่อยตัวอย่าง (sub-sample) ใส่ถุงพลาสติกถุงละ 50 กรัม ปิดผนึกด้วยความร้อน บรรจุลงถุงดำกั้นแสง เก็บในที่เย็นจัด –20 °ซ

ตารางที่ 2 ข้อมูลการซื้อตัวอย่างเมล็ดเนียงนก

รุ่นที่ซื้อ	วัน เดือน ปี ที่ซื้อ	สถานที่ที่ซื้อ
1	28/12/2541	ตลาดสดพลาซ่า อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
2 2.1	15/3/2543	ตลาดสดพลาซ่า อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
2.2	21/3/2543	ตลาดสดหาดใหญ่ใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
2.3	26/3/2543	ตลาดสดปัตตานี อ.เมือง จ.ปัตตานี
3	15/1/2544	ตลาดสดพลาซ่า อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

2.2 การหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสและร้อยละการยับยั้งอะไมเลส

การหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลส เป็นการศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งต่ออะไมเลสของสารตัวอย่างที่อาจเป็นสารสกัดพืชตัวอย่าง หรือที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ โดยนำสารตัวอย่างมาบ่มรวมกับเอนไซม์อะไมเลสที่ทราบค่ากิจกรรม ในช่วงเวลาหนึ่งที่อุณหภูมิ 37 °ซ เพื่อให้สารยับยั้งอะไมเลสในตัวอย่างจับกับเอนไซม์อะไมเลสเกิดเป็นสารเชิงซ้อน (amylase-inhibitor complex) แล้วตรวจวัดกิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมเลสที่ลดลงหรือหมดไป ด้วยวิธีที่ดัดแปลงวิธีของ Bernfeld (1955) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขั้นตอนการหากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสของสารตัวอย่าง

สารที่ใช้ (ml)/ หลอดที่	อะไมเลส		สารตัวอย่าง			
	1 E	1' E_C	2 E+B	2' $(E+B)_C$	3 B	3' B_C
ขั้นตอนที่ 1 : ให้สารยับยั้งจับกับอะไมเลส						
-ตัวอย่างสารสกัด	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1
-บัฟเฟอร์ pH 6.8	0.1	0.1	-	-	0.1	0.1
-อะไมเลสทราบค่ากิจกรรม	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-
รวมปริมาตรหลอดละ 0.2 มล. ใช้มือเขย่าให้เข้ากันเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 นาที เขย่าในเครื่อง 100 rpm ขั้นตอนที่ 2 : หากิจกรรมอะไมเลสที่เหลือ						
-น้ำแป้ง 2% ในบัฟเฟอร์ pH 6.8	0.2	-	0.2	-	0.2	-
-บัฟเฟอร์ pH 6.8	0.6	0.8	0.6	0.8	0.6	0.8
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 3 นาที เขย่าในเครื่อง 100 rpm - ใส่สารละลาย DNS ใส่หลอดละ 0.5 มล. - ต้มในน้ำเดือด 100 °ซ นาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นหลอดละ 2 มล. วัด OD. ที่ 540 นาโนเมตร						

โดยมีความหมายของแต่ละหลอดดังนี้

หลอด E เป็นหลอดวัดกิจกรรมอะไมเลสเริ่มต้น

หลอด E_C เป็นหลอดควบคุมของหลอด E

หลอด E+B เป็นหลอดวัด (1) กิจกรรมอะไมเลสที่เหลือหลังการจับกับสารยับยั้ง (2) กิจกรรมอะไมเลสภายในพืช (endogenous amylase) (3) สารรีดิวซ์อื่นๆ ภายในพืช และ (4) สารรบกวนอื่นภายในพืช ส่วนหลอดควบคุม $(E+B)_C$ เป็นหลอดวัด (1) สารรีดิวซ์อื่นๆ ภายในพืช และ (2) สารรบกวนอื่นภายในพืช

หลอด B เป็นหลอดวัด (1) กิจกรรมอะไมเลสภายในพืช (2) สารรีดิวซ์อื่นๆ ภายในพืช และ (3) สารรบกวนอื่นๆ ภายในพืช ส่วนหลอดควบคุม B_C เป็นหลอดวัด (1) สารรีดิวซ์อื่นๆ ภายในพืช และ (2) สารรบกวนอื่นๆ ภายในพืช

ทำกราฟกลูโคสมาตรฐาน โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 มก./มล. ตามลำดับ ผสมกับบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate, pH 6.8 ที่มี NaCl 0.9 ก./ลิตร จนมีปริมาตรสุทธิ 1 มล. เติม 0.5 มล. DNS ต้มในน้ำเดือด 5 นาที เติมน้ำกลั่น 2 มล. จากกราฟมาตรฐานกลูโคสคำนวณค่ามิลลิกรัมกลูโคสของแต่ละตัวอย่าง เทียบเป็นค่ากิจกรรมอะไมเลส โดยกำหนดให้กิจกรรมอะไมเลส 1 หน่วย หมายถึง จำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 มก.ของกลูโคสใน 3 นาทีที่อุณหภูมิ 37°ซ กำหนดให้กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส 1 หน่วย เท่ากับปริมาณกลูโคสที่หายไป 1 มก. ใน 3 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °ซ หรือนำไปคำนวณเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสดังนี้

ร้อยละการยับยั้ง

$$= \frac{\text{จำนวนของกิจกรรมอะไมเลสตั้งต้น – กิจกรรมอะไมเลสที่เหลือหลังจากการยับยั้ง} \times 100}{\text{จำนวนของกิจกรรมอะไมเลสตั้งต้น}}$$

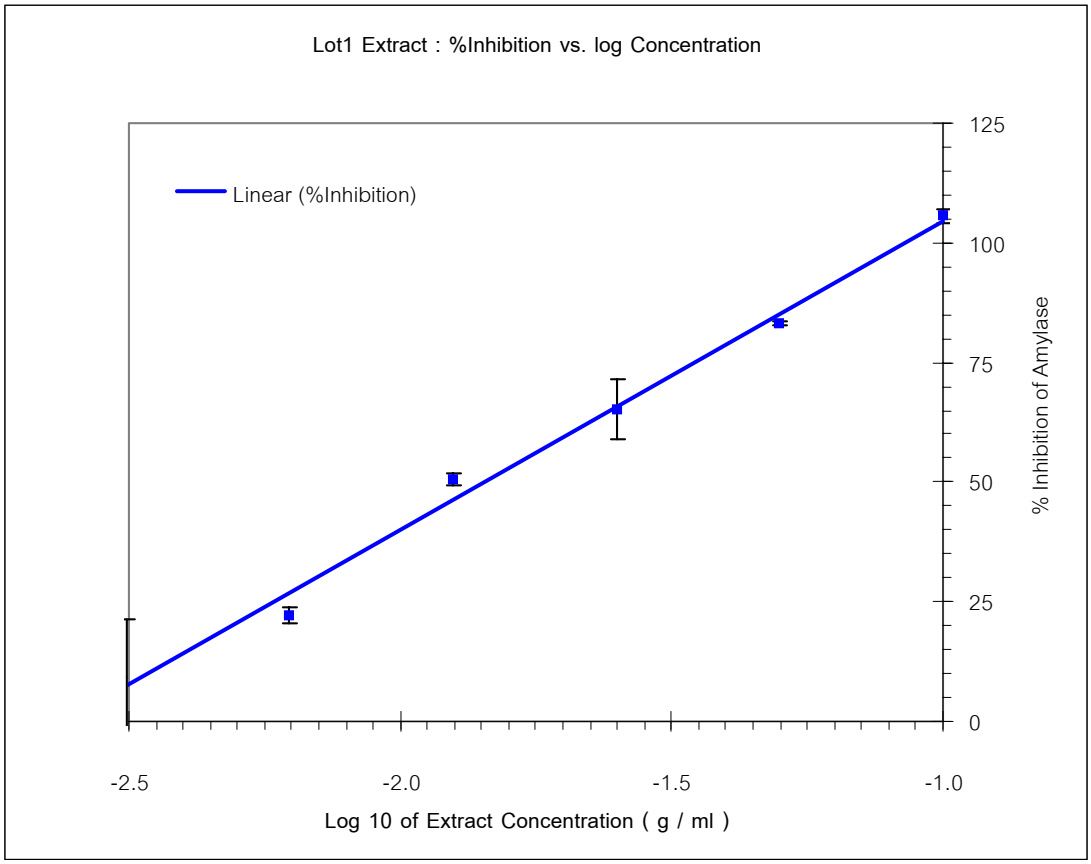
$$= \frac{(E - E_C) - \{ [(E+B) - (E+B)_C] - (B - B_C) \} \times 100}{(E - E_C)}$$

2.3 การหาค่ามิลลิกรัมตัวอย่าง และการหาค่าหน่วยกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส / มิลลิกรัมตัวอย่าง ที่ค่าการยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50

นำสารสกัดตัวอย่างตรวจหาระดับการยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดพืชเช่นข้อ 2.2 นำค่าร้อยละของการยับยั้งที่ได้ แล้วนำค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสและค่าเจือจางสารตัวอย่างแบบ serial dilution เปลี่ยนเป็น ค่า log 10 ของค่าการเจือจางสารสกัดไปหาหน่วยกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่าง ที่ทำให้กิจกรรมอะไมเลสลดลงครึ่งหนึ่งตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) เขียนกราฟระหว่าง log 10 ค่าความเข้มข้นของสารสกัด กับร้อยละการยับยั้งอะไมเลส (รูปที่ 2)
2) หาค่าความเข้มข้นตัวอย่างที่ค่าการยับยั้งอะไมเลสร้อยละ 50 (ED_{50}) จากรูปที่ 2 โดยโปรแกรมการหา Regression Line ของโปรแกรม Anova
3) หาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่างโดยสูตรดังนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส/มิลลิกรัมตัวอย่าง} = \frac{50 \times \text{ค่ากิจกรรมอะไมเลส}}{100 \times ED_{50} \times 1000}$$



รูปที่ 2 กราฟระหว่าง log ความเข้มข้นสารตัวอย่าง กับร้อยละการยับยั้งอะไมเลส

2.4 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างตามวิธีของ Lowry *et al*. (1951) โดยใช้สารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH : 2% $NaKC_4H_4O_6.H_2O$: 1% $CuSO_4$ ในอัตราส่วนโดยปริมาตร 100:1:1) ปริมาตร 3 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลายโฟลิน (Folin – Ciocalteau's phenol reagent, ใช้ Folin : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 0.3 มล. ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารตัวอย่างโดยนำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ

2.5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสกัด 4 วิธี

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสกัดมีจุดประสงค์เพื่อหาวิธีการสกัดที่สามารถสกัดเมล็ดเนียงนกให้ได้ปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสมากที่สุด ซึ่งตรวจวัดด้วยค่าการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส (inhibitory activity of amylase) สูงที่สุด และสามารถคงค่าการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสไว้ได้ในระยะเวลานาน วิธีสกัด 4 วิธีที่ศึกษาคือ วิธีของ Moreno *et. al*. (1990), Grant *et. al*. (1995), Giri และ Kachole (1996) และ Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการสกัดดังนี้

1) วิธีของ Moreno *et al*. (1990)

นำเมล็ดเนียงนกมาปอกเปลือกออก แล้วบดละเอียดในไนโตรเจนเหลว ชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ แล้วนำไปใส่ใน 10 mM β-mercaptoethanol (1:3 w/v) คนให้เข้ากันประมาณ 5 นาที เซนตริฟิวจ์ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาบัฟเฟอร์ด้วย 0.2 M succinate, 0.1 M $CaCl_2$ (pH 3.8)(110 μl/ml) หลังจากนั้นนำมาบ่มด้วยความร้อน 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงทันทีด้วยน้ำแข็ง กำจัดตะกอนโปรตีนออกโดยการเซนตริฟิวส์ที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสมาปรับ pH เป็น 5.6 ด้วย NaOH แบ่งใส่หลอด หลอดละ 1 มล. 20 หลอด และหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดละ 10 มล. ตามส่วนปริมาตรที่เหลือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ เพื่อไว้ทดลองต่อไป

2) วิธีของ Grant *et al*. (1995)

นำเมล็ดเนียงนกมาปอกเปลือกออก แล้วบดละเอียดในไนโตรเจนเหลว ชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ แล้วสกัดใน 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.9, NaCl 9 g/l (1:5 w/v) stirred เป็นเวลา 16 ชม. หลังจากนั้นนำมาเซนตริฟิวจ์ที่ 50,000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสนำมาบ่มที่ความร้อน 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงทันทีด้วยน้ำแข็ง เซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่ 50,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสแบ่งใส่หลอด หลอดละ 1 มล. 20 หลอด และหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดละ 10 มล. ตามส่วนปริมาตรที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ เพื่อทำการทดลองต่อไป

3) วิธีของ Giri และ Kachole (1996)

นำเมล็ดเนียงนกมาปอกเปลือกออก แล้วบดละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาละลายใน hexane เพื่อกำจัดไขมันออกไป คนประมาณ 5-10 นาที แล้วนำไปชั่งให้ได้น้ำหนักหลังจากนั้นนำมา stirred ด้วย 0.1 M HCl ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M NaCl และ 1% PVP (1:6 w/v) เป็นเวลา 2-2.5 ชม. [PVP เป็นตัวตกตะกอน polyphenols (Singh, 1984)] นำสารละลายมาเซนตริฟิวส์ที่ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1 M NaOH นำสารละลายมาเซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสแบ่งใส่หลอด หลอดละ 1 มล. 20 หลอด และหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดละ 10 มล. ตามส่วนปริมาตรที่เหลือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ เพื่อทำการทดลองต่อไป

4) วิธีของ Pueyo และ Delgado-Salinas (1997)

นำเมล็ดเนียงนกมาปอกเปลือกออก แล้วบดละเอียดในไนโตรเจนเหลว ชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ ละลายในบัฟเฟอร์ 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1 M NaCl, 0.2 mM PMSF (1:10 w/v) นำมาเซนตริฟิวจ์ที่ 15,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสแบ่งใส่หลอด หลอดละ 1 มล. 20 หลอด และหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดละ 10 มล. ตามส่วนปริมาตรที่เหลือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ เพื่อทำการทดลองต่อไป

นำสารสกัดจากทั้ง 4 วิธี ไปหาปริมาณโปรตีนและร้อยละการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลส เพื่อศึกษาว่าสารสกัดจากวิธีใดสามารถยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด

2.6 ศึกษาความคงตัวของสารยับยั้งอะไมเลสในสารสกัดตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิ –20 °ซ

นำสารสกัดเนียงนกที่ได้จากวิธีที่ 4 (Pueyo and Delgado-Salinas, 1997) มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส โดยเจือจางในบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.8, NaCl 0.9 กรัม/ลิตร แบบ serial dilution ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ เช่น 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 ตามลำดับ เพื่อหาค่ากิจ

กรรมการยับยั้งอะไมเลสที่ร้อยละ 50 ทำการทดสอบเดือนละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 3 เดือน เปรียบเทียบค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสที่ร้อยละ 50 ในการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 °ซ กับค่ากิจกรรมการยับยั้งเริ่มต้น (เดือน 0)

2.7 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส

ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยดัดแปลงวิธีของ Yamagata *et al.* (1998)

2.7.1 การคัดเลือกร้อยละของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลสจากสารสกัดตัวอย่าง

เป็นการคัดเลือกเพื่อให้ได้ร้อยละของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ตกตะกอนสารยับยั้งอะไมเลสแล้วได้ค่ากิจกรรมการยับยั้งและค่าความว่องไวจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส (specific inhibitory activity of amylase) สูงที่สุด

นำสารสกัดตัวอย่างโดยวิธี Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 40, 60, 80 และ 100 ของความอิ่มตัว คนที่ 4 °ซ เป็นเวลา 5 ชม. นำสารละลายที่ได้มาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 × g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสและตะกอน ส่วนของตะกอนนำมาละลายใน 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ให้มีปริมาตรเท่าเดิมก่อนการตกตะกอน นำไปหากิจกรรมการยับยั้ง และปริมาณโปรตีน เพื่อเปรียบเทียบว่าที่ร้อยละของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่าใดมีค่ากิจกรรมการยับยั้งและค่าความว่องไวจำเพาะของกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงสุด ร้อยละความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่คัดเลือกได้ จะนำไปใช้ในการตกตะกอนโปรตีนเพื่อทำบริสุทธิ์ต่อไป

2.7.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำไดอะไลซ์

นำตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายในบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ด้วยปริมาตรน้อยที่สุดที่ละลายได้หมด แล้วนำมาไดอะไลซ์โดยใช้ถุง seamless cellulose ที่ไม่ให้สารซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับหรือมากกว่า1,2000 ดาลตันผ่านออกจากถุงได้ ไดอะไลซ์ในบัฟ-เฟอร์เดียวกันที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 16 และ 72 ชั่วโมง เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมใน

การไดอะไลซ์ให้ได้ค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส และค่าการยับยั้งจำเพาะมากที่สุด สำหรับใช้ในการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส

2.7.3 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate precipitation)

ผลการทดลองในข้อ 2.7.1 และ 2.7.2 พบว่า ร้อยละของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนคือที่ร้อยละ 80 ของความอิ่มตัว และเวลาที่เหมาะสมสำหรับการไดอะไลซ์คือที่เวลา 16 ชม.

ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยนำสารสกัดตัวอย่างโดยวิธี Pueyo และ Delgado-Salinas (1997) มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 ของความอิ่มตัว คนที่ 4 °ซ เป็นเวลา 5 ชม. นำสารละลายที่ได้มาเซนตริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 10,000 × g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนมาละลายใน 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ด้วยปริมาตรน้อยที่สุดที่จะละลายได้หมด วัดปริมาตรสารละลายที่ได้(P_{80}) นำไปไดอะไลส์ด้วย 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 16 ชม. นำ dialysate เซนตริฟิวจ์ที่ 8,000 × g เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้ทำให้เข้มข้นด้วยแอควาไซด์ (aquacide) ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 4 มก./มล. ตรวจวัดกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสตามวิธีการในข้อ 2.2 นำสารละลายที่ไดอะไลส์ และทำให้เข้มข้นแล้ว (P_{80} dialysate) ไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี CM-cellulose

2.7.4 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลส P_{80} dialysate โดยคอลัมน์ CM-cellulose

นำสารละลาย P_{80} dialysate มาทำบริสุทธิ์จากโปรตีนอื่นๆต่อ โดยผ่านลงบน คอลัมน์ CM-cellulose ดังนี้

-เตรียม CM-cellulose activate โดยใช้ CM-cellulose 10 กรัม ทำให้อิ่มตัวด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน 0.1 M HCl เป็นเวลา 4 ชม. ล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นจนมี pH เป็น 7 จากนั้นแช่ CM-cellulose ใน 0.5 M NaOH เป็นเวลา 4 ชม. แล้วล้างด่าง

ออกด้วยน้ำกลั่นจนมี pH เป็น 7 หลังจากนั้นนำ CM-cellulose มาแช่ใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

-เตรียม CM-cellulose column โดยบรรจุ CM-cellulose ในคอลัมน์ขนาด 2.5 × 12 ซม. มีปริมาตรเรซิน 60 มล. ปรับให้คอลัมน์สมดุล (equilibrate) โดยการชะคอลัมน์ด้วย 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 3 เท่า ของปริมาตรเรซินในอัตราการไหลคงที่ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

-ทำบริสุทธิ์ P_{80} dialysate ซึ่งมีโปรตีนประมาณ 4 มก./มล. ปริมาตร 10 มล. ผ่านลงในคอลัมน์ ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ชะคอลัมน์ด้วย 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ที่อัตราการไหล 24 มล./ชม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาด้วย fraction collector หลอดละ 1 มล.

-ติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ถูกชะออกมาที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เข้าใกล้ศูนย์

-จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย gradient 0-0.2 M NaCl ในบัฟเฟอร์เดิม ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิมและเก็บสารที่ถูกชะออกมาในหลอดหลอดละ 1 มล.

-ติดตามการแยกโปรตีนโดยนำสารละลายแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งมีค่าเข้าใกล้ศูนย์

-นำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และจำนวนหลอดทดลอง นำสารละลายที่ได้ไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสทุกๆ 4 หลอด เขียนกราฟระหว่างค่ากิจกรรมการยับยั้ง และจำนวนหลอดทดลองทุกๆ 4 หลอด รวมสารละลายหลอดที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นด้วยแอควาไซด์จนเหลือปริมาตรที่เหมาะสม นำ CM fractions ไปหาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ส่วนที่เหลือนำไปทำให้สารยับยั้งเอนไซม์บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75

2.7.5 **การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์** Sephadex G-75

นำสารละลายส่วนที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูงที่รวมได้จากคอลัมน์ CM-cellulose (CM fractions)มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยผ่านลงในคอลัมน์ที่มี Sephadex G-75 บรรจุอยู่ดังนี้

-เตรียม Sephadex G-75 โดยนำมา 10 กรัม แช่ให้พองตัวในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 ชม. แล้วแช่ใน 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 อีก 5 ชม.

-บรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.0 × 60 ซม. มีปริมาตรเจล 190 มล. ปรับให้คอลัมน์สมดุลโดยการชะด้วย 50 mM Sodium acetate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจล แล้วนำ CM fraction มีโปรตีนประมาณ 4 มก./มล. และปริมาตร 10 มล. มาผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-75 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันโดยการชะด้วยอัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บสารละลายในหลอดทดลองหลอดละ 1 มล.

-ติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ถูกชะออกมาที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เข้าใกล้ศูนย์

-นำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และจำนวนหลอดทดลอง

-นำสารละลายที่ได้ไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสทุกๆ 4 หลอด เขียนกราฟระหว่างค่ากิจกรรมการยับยั้ง และจำนวนหลอดทดลองทุกๆ 4 หลอด รวมสารละลายหลอดที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นด้วยแอควาไซด์ จนเหลือปริมาตรที่เหมาะสม นำ Sephadex fractions ไปหาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส

-ส่วนที่เหลือนำไปทำให้สารยับยั้งเอนไซม์บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Hydroxyapatite

2.7.6 **การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสโดยคอลัมน์** Hydroxyapatite

นำสารละลายส่วนที่มีกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสสูง ที่รวมได้จากคอลัมน์

Sephadex G-75 (Sephadex fractions) มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านลงในคอลัมน์ Hydroxyapatite ดังนี้

-เตรียมคอลัมน์โดยนำ Hydroxyapatite สำเร็จรูปที่ละลายอยู่ใน 1 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 บรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2.2 × 10 ซม. มีปริมาตรเจล 40 มล.

-ปรับให้คอลัมน์สมดุลโดยการชะด้วย 1 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเจล ในอัตราการไหลคงที่ ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

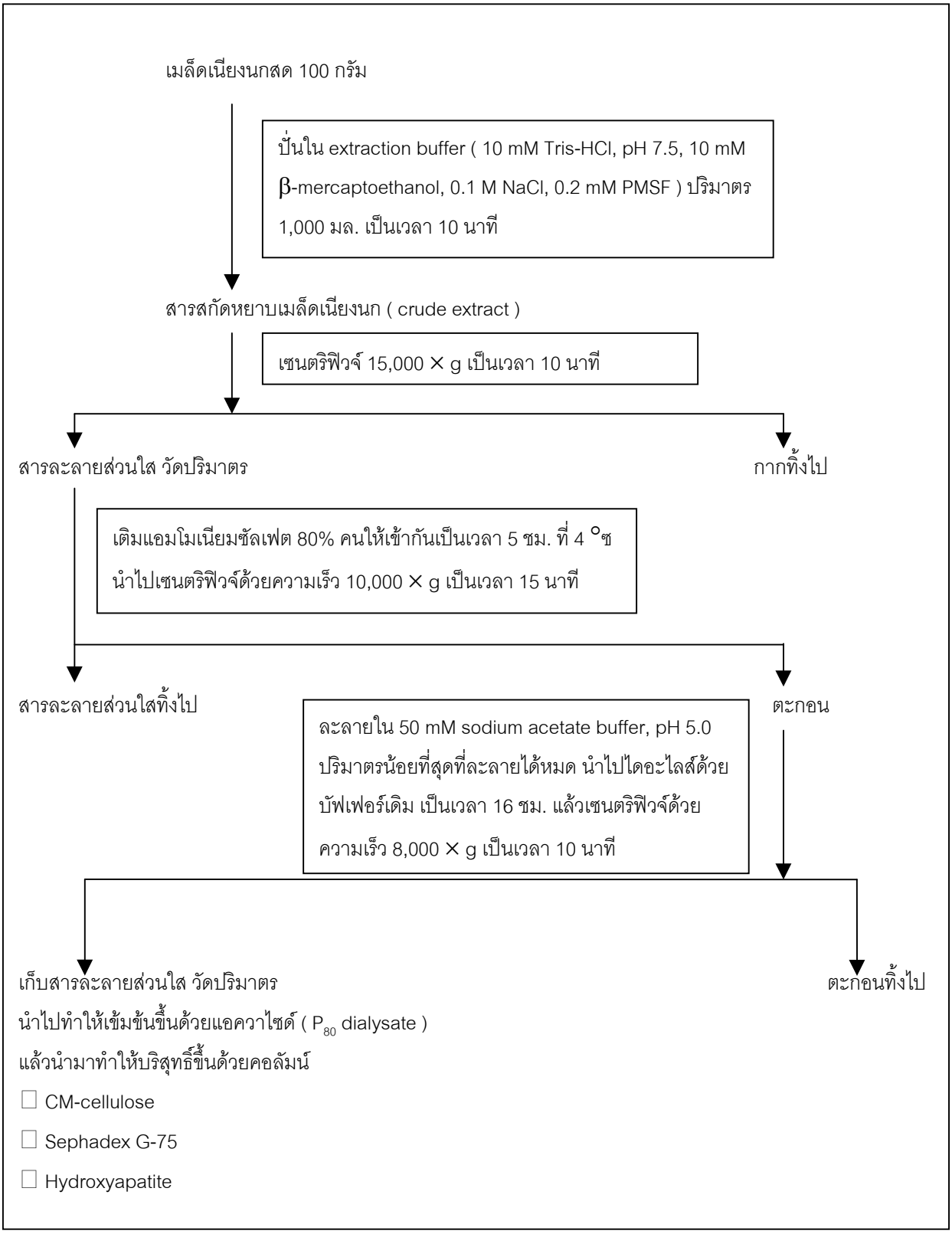
-นำ Sephadex fractions จากข้อ 2.7.5 ซึ่งมีโปรตีนประมาณ 3 มก./มล. ปริมาตร 5 มล. ผ่านลงในคอลัมน์ Hydroxyapatite ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันโดยการชะด้วยอัตราการไหล 20 มล./ซม. ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาด้วย fraction collector หลอดละ 1 มล.

-ติดตามการแยกโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ถูกชะออกมาที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก สังเกตได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เข้าใกล้ศูนย์

-ชะคอลัมน์ด้วย 10, 100 และ 500 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8 ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิมและเก็บสารที่ถูกชะออกมาในหลอดหลอดละ 1 มล.

-ติดตามการแยกโปรตีนโดยนำสารละลายแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งมีค่าเข้าใกล้ศูนย์

-นำผลที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และจำนวนหลอดทดลอง นำสารละลายที่ได้ไปหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสทุกๆ 4 หลอด เขียนกราฟระหว่างค่ากิจกรรมการยับยั้ง และจำนวนหลอดทดลองทุกๆ 4 หลอด รวมสารละลายหลอดที่มีกิจกรรมการยับยั้งสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นด้วยแอควาไซด์จนเหลือปริมาตรที่เหมาะสม นำ Hydroxyapatite fractions ไปหาปริมาณโปรตีนและกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส ส่วนที่เหลือนำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส และศึกษาสมบัติของสารยับยั้งอะไมเลสต่อไป



รูปที่ 3 ไดอะแกรมการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสในขั้นตอนต่างๆ

2.8 การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ต่าง ๆ

ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารยับยั้งอะไมเลสแต่ละขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ โดยวิธีเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (gel electrophoresis) แบบแผ่น (slab gel) ขนาด 10 × 12 ซม. หนา 1 มม. เจลแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ เจลส่วนล่างที่ทำหน้าที่แยกสาร (separating gel) มีความสูง 7 ซม. และเจลส่วนบน ทำหน้าที่รวมสารตัวอย่างไม่ให้กระจาย (stacking gel) มีความสูงประมาณ 3 ซม. ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ของสารยับยั้งอะไมเลสที่แยกได้ในขั้นตอนต่างๆ ใช้อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) หรือการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพซึ่งมี SDS อยู่ด้วย (SDS-PAGE)

2.8.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native polyacrylamide gel electrophoresis, Native-PAGE)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์สารยับยั้งอะไมเลสที่แยกโดยวิธี Native-PAGE ทำได้โดยนำตัวอย่างสารยับยั้งอะไมเลสในขั้นตอนต่างๆของการสกัดและทำบริสุทธิ์ มาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่าง โดยผสมสารละลายตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) สำหรับ Native-PAGE 1 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล (glycerol) และ 0.4% โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสตามวิธีดัดแปลงของ Davis (1964) ซึ่งใช้โพลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 3% ใน 0.063 M Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน (stacking gel) โพลิอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7% (แบบเจลความเข้มข้นเดียว) ใน 0.75 M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง (separating gel) ซึ่งมีองค์ประกอบดังตารางที่ A.1 (ภาคผนวก) นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีน 50-80 ไมโครกรัม ใส่ลงในแต่ละช่องของแผ่นเจล ทำการแยกโปรตีนในแผ่นเจลด้วยบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 กระแสไฟฟ้าที่ใช้แยกขนาด 15 mA/เจล 1 แผ่น นานประมาณ 3 ชม. เมื่อสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟฟ้านำแผ่นเจลไปย้อมสีโปรตีน และไกลโคโปรตีน

- การย้อมสีคูมาซีบิลเลียนบลู อาร์ 250

ย้อมสีโปรตีนในแผ่นเจลด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู อาร์ 250 (Coomassie brilliant blue R-250) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ 0.02% สีคูมาซีบลู -50% เมทานอล –7.5% กรดน้ำส้ม (acetic acid) นาน ½ ชม. ล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลายผสมของเมทานอล : กรดน้ำส้ม : น้ำ ในอัตราส่วน 5 : 7 : 88 จนเห็นแถบโปรตีนสีน้ำเงินชัดเจน

- การย้อมไกลโคโปรตีน

ย้อมสีไกลโคโปรตีนในแผ่นเจลหลังจากทำอิเล็กโทรฟอรีซิสโดยวิธี พีเอเอส ของ Zacharius *et al.* (1969)โดยแช่เจลในกรดไตรคลอโรอะซิติก 12.5% นาน 30 นาที เพื่อตรึงโปรตีนให้อยู่กับที่และป้องกันการแพร่กระจายของโปรตีน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 15 วินาที นำไปแช่ในสารละลายกรดเปอร์ไอโอดิก (Periodic acid) 1% ในกรดน้ำส้ม 3% นาน 50 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นจนไอโอเดต (IO_3^-) ที่มากเกินพอหมดไป ทดสอบไอโอเดตโดยใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) 0.1 M ถ้ามีไอโอเดตเหลืออยู่ จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลของซิลเวอร์ไอโอเดต นำเจลไปย้อมในสารละลายฟุกซิน-ซัลไฟต์ (Fuchsin-sulfite stain หรือ Schiff's reagent) ในที่มืดนาน 50 นาที ล้างสีที่ไม่ได้จับกับไกลโคโปรตีนออกด้วยสารละลายเมตาไบซัลไฟต์ (Metabisulfite) 0.5% 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ล้างต่อด้วยน้ำกลั่นจนสีที่ไม่ใช่แถบของไกลโคโปรตีนหมดไป เก็บเจลไว้ในสารละลายกรดน้ำส้ม 7.5%

2.8.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS แปลงสภาพ (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

การศึกษาสารยับยั้งอะไมเลสที่แยกได้ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS ทำได้โดยนำตัวอย่างสารยับยั้งอะไมเลสในขั้นตอนต่างๆ ของการสกัดและทำบริสุทธิ์ มาเตรียมเป็นสารละลายตัวอย่าง ทำโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมี SDS ดัดแปลงตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 3% ใน 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน โพลิอะคริลาไมด์เจลความ

เข้มข้น 4-10% (แบบเจลความเข้มข้นต่างกัน) ใน 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นเจลชั้นล่าง ดังมีรายละเอียดการเตรียมในตารางที่ A.2 (ภาคผนวก)

เตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อทำอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยผสมสารละลายตัวอย่าง 3 ส่วน กับบัฟเฟอร์ตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE 1 ส่วน บัฟเฟอร์นี้ประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 40% กลีเซอรอล, 4% SDS, 4% β-mercaptoethanol และ 0.4% สีโบรโมฟีนอลบลู หลังจากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 50-80 ไมโครกรัม ลงในแต่ละช่องของแผ่นเจล

ทำการแยกโปรตีนในแผ่นเจลด้วยบัฟเฟอร์ 0.025 M Tris-0.2 M glycine-1% SDS,pH 8.3 ใช้กระแสไฟฟ้า 15 mA/เจล 1 แผ่น เป็นเวลาประมาณ 3 ชม. รอจนสีโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ไปจนสุดขอบล่างของแผ่นเจล ปิดกระแสไฟฟ้า และนำเจลไปย้อมโปรตีน และไกลโคโปรตีนด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1

2.8.3 การตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ Starch-PAGE

การตรวจกิจกรรมสารยับยั้งอะไมเลสโดยอิเล็กโทรฟอรีซิสนี้ดัดแปลงจากวิธีของGiri และ Kachole(1996) หลักการของวิธีคือการแยกโปรตีนสภาพธรรมชาติในแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจล 10% ที่มีน้ำแป้ง สับสเตรทของเอนไซม์อะไมเลสผสมอยู่ภายหลังการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส นำแผ่นเจลแช่ในเอนไซม์อะไมเลสที่อุณหภูมิ 37 °ซ ช่วงเวลาหนึ่ง เพื่อให้เอนไซม์ย่อยแป้งในเนื้อเจล บริเวณเนื้อเจลที่มีสารยับยั้งอะไมเลสอยู่จะจับกันกับอะไมเลส ส่งผลให้อะไมเลสย่อยแป้งในบริเวณนั้นไม่ได้ เมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนจึงปรากฏแถบสีน้ำเงินตรงแถบของสารยับยั้งอะไมเลส

วิธีการทดลองคือ เตรียมแผ่นเจล 2 แผ่น โดยที่เจลชั้นล่าง มีแป้งผสมอยู่คิดเป็น 0.02% ต่อแผ่นเจล ส่วนผสมดังตารางที่ A.3 (ภาคผนวก) ทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ Native-PAGE ตามวิธีการในข้อ 2.8.1 หลังจากนั้นนำแผ่นเจลแผ่นที่ 1 ย้อมสีคูมาซีบิลเลียนบลูตามวิธีการเหมือนที่กล่าวมาแล้ว ส่วนแผ่นที่ 2 นำมาแช่ในบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate, pH 6.8 ที่มี 0.01 M NaCl เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อให้เกิดการสมดุล แล้วนำแผ่นเจลแช่ในสารละลายที่มีกิจกรรมอะไมเลสความเข้มข้น 2.5

ไมโครกรัมโปรตีน/มล. (หรือเท่ากับ 0.6 หน่วยกิจกรรม) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลขึ้นมาล้างเร็วๆด้วยน้ำกลั่นเพื่อเอาอะไมเลสออก แช่แผ่นเจลในสารละลาย 0.3% ไอโอดีนที่เตรียมใหม่ๆ เป็นเวลา 4-5 นาที แล้วล้างสารละลายไอโอดีนส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง เปรียบเทียบแถบกิจกรรมการยับยั้งอะไมเลส (แถบสีน้ำเงิน) บนแผ่นเจลกับแถบโปรตีนของสารตัวอย่างที่ย้อมด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู เพื่อดูว่าแถบโปรตีนใดเป็นแถบของสารยับยั้งอะไมเลส

2.9 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลส

2.9.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสโดยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี

การทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสโดยเจลฟิลเตร-ชันคอลัมน์บรรจุ Sephadex G-75 ขนาด 2.0 × 60 ซม. ซึ่งใช้ในการแยกสารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์CM-cellulose แล้ววัดปริมาตรชะหรือปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะโปรตีนตัวนี้ออกมา (elution volume, V_e) เปรียบเทียบกับปริมาตรชะที่ใช้ในการชะโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลที่มีขนาดต่างๆกัน 4 ตัว คือ โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (BSA, M_r 67,000 ดาลตัน),โอวัลบูมิน (ovalbumin, M_r 43,000 ดาลตัน), ไคโมทริพซิโนเจน เอ (chymotrypsinogen A, M_r 25,000 ดาลตัน) และไรโบนิวคลีเอส เอ (ribonuclease A, M_r 13,700 ดาลตัน) บรรจุลงในคอลัมน์อันเดียวกันทีละตัวโดยโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัวมีความเข้มข้น 5 มก./มล. แล้วชะด้วย 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ด้วยอัตราการชะ 20 มล./ชม. เช่นเดียวกับการชะสารยับยั้งอะไมเลสออกจากคอลัมน์ Sephadex G-75 เก็บสารละลายที่ชะออกมาเป็นส่วนๆ ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มล. โดยอาศัยเครื่องเก็บสารแยกส่วนอัตโนมัติ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาแอคทิวิตีของสารยับยั้งอะไมเลสในหลอดที่มีโปรตีน โดยวิธีในข้อ 2.2 ส่วนกรณีของ บลูเด็กซ์แตรน (blue dextran, M_r 2,000,000 ดาลตัน) ที่ใช้ในการหาปริมาตรภายนอกเม็ดเจลหรือปริมาตรวอยด์ (void volume, V_o) ของคอลัมน์ และ $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้ในการหาปริมาตร (total volume, V_t) ของคอลัมน์ ทำโดยการนำบลู

เด็กซ์แตรน และ $K_2Cr_2O_7$ ผ่านคอลัมน์พร้อมกัน และชะคอลัมน์ด้วย 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ด้วยอัตราเร็วเดิม วัดค่าการดูดกลืนแสงของบลูเด็กซ์แตรนที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และ $K_2Cr_2O_7$ ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ทั้งหมดคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (distribution coefficient, K_{av}) ของโปรตีนแต่ละชนิดได้จากสมการ

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

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำให้บริสุทธิ์โดย Sephadex G-75 ในการทดลองนี้ใช้คอลัมน์เดียวกันตลอด แต่นำสารผ่านคอลัมน์ทีละชนิดและปรับอัตราการไหลให้คงที่เพื่อไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของ Sephadex ในคอลัมน์

2.9.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ

การหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลส โดยการทำ Native-PAGE โดยการเตรียมโพลิอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 3% เป็นเจลชั้นบนและ 7% เป็นเจลชั้นล่างเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่แยกได้ และโปรตีนมาตรฐานในแผ่นเจลจากการย้อมด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง แถบโปรตีนมาตรฐาน และแถบสีโบรโมฟีนอล-บลู แล้วคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

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

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด ที่ใช้ได้แก่ ไธโรโกลบูลิน (thyroglobulin, M_r 669,000 ดาลตัน), เฟอร์ริติน (ferritin, M_r 440,000 ดาลตัน), แคตาเลส (catalase, M_r

232,000 ดาลตัน), แลคเตดดีไฮโดรจิเนส (lactate dehydrogenase, M_r 140,000 ดาลตัน) และอัลบูมิน (albumin, M_r 67,000 ดาลตัน) นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแต่ละแถบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของสารยับยั้งอะไมเลสได้

2.9.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของสารยับยั้งอะไมเลสโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบมี SDS แปลงสภาพ

น้ำหนักโมเลกุลย่อยของสารยับยั้งอะไมเลสหาได้จากการทำ SDS-PAGE แบบ slab gel โดยการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 3% เป็นเจลชั้นบนและ 4-10% เป็นเจลชั้นล่างเช่นเดียวกับข้อ 2.8.2 ติดตามการเคลื่อนที่ของโปรตีนตัวอย่างที่แยกได้และโปรตีนมาตรฐานในแผ่นเจลจากการย้อมโปรตีนด้วยสีคูมาซีบิลเลียนบลู วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนของสารตัวอย่าง, แถบโปรตีนมาตรฐาน และแถบสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) ของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง จากความสัมพันธ์ดังนี้

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

จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิดที่ใช้ได้แก่ ฟอสโฟรีเลสบี (phosphorylase b, M_r 94,000 ดาลตัน), โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (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) นำค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนแต่ละแถบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยและรวมของสารยับยั้งอะไมเลส

2.10 การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว

2.10.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บสารยับยั้งอะไมเลสในรูปของสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 37, 4 และ –20 °ซ

นำสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 5.2 มก./มล. มาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บสารยับยั้งอะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37, 4 และ –20 °ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อเปรียบเทียบหาอุณหภูมิเหมาะสมที่สุดในการเก็บสารยับยั้งอะไมเลสไว้ระหว่างการทดลอง ซึ่งไม่ทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงมากนัก โดยในแต่ละวันนำสารยับยั้งอะไมเลสที่เก็บในอุณหภูมิต่างๆมาหาค่ากิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธีการเดิมที่ได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.2 เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.8 ที่มี NaCl 0.9 กรัม/ลิตร แบบ serial dilution ที่ความเข้มข้น 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 และ 1:32 แล้วหาค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 เปรียบเทียบผลที่ได้กับค่ากิจกรรมการยับยั้งเริ่มต้น

2.10.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งอะไมเลส

นำสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 5.2 มก./มล. มาเจือจางให้มีค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ร้อยละ 50 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งอะไมเลสที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.2 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิการบ่ม 37 °ซ 30 นาทีเป็น 4, 25, 37, 40, 60 และ 80 °ซ 30 นาที

2.10.3 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารยับยั้งอะไมเลสที่อุณหภูมิ 37 °ซ

นำสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 5.2 มก./มล. มาเจือจางให้มีค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ร้อยละ 50 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งอะไมเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate, NaCl 0.9 กรัม/ลิตรที่ pH ต่างๆ โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับข้อ 2.2 แต่เปลี่ยน pH ของบัฟเฟอร์ช่วงการบ่ม 37 °ซ 30 นาที เป็น pH 5, 6, 6.8, 7, 8 และ 9

2.10.4 การศึกษาจลนศาสตร์ของสารยับยั้งอะไมเลส

เปลี่ยนปริมาณสับสเตรท (น้ำแป้ง) ที่ความเข้มข้นของแป้งในบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate, pH 6.8 ที่มี NaCl 0.9 กรัม/ลิตร เป็นร้อยละ 0, 1, 2, 4 และ 6 ตามลำดับ โดยใช้ปริมาณสารยับยั้งอะไมเลสคงที่ที่ ไม่มีค่าการยับยั้ง, มีค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 25 และมีค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 ซึ่งเตรียมโดยการเจือจางสารยับยั้งอะไมเลสบริสุทธิ์ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีน 5.2 มก./มล.ทำการหาค่ากิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 2.2 นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่าง 1/ความเข้มข้นของสับสเตรท (1/S) และ 1/ความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลส (1/V) หาค่า K_m และ V_{max} จากกราฟ

2.10.4 การทดสอบคุณสมบัติเลคตินของสารสกัดเนียงนก และสารยับยั้งอะไมเลสที่ทำบริสุทธิ์แล้ว

2.10.5.1 การเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงคน, กระต่าย และหนู

วัสดุอุปกรณ์

เลือดคนปกติ

เลือดทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากผู้บริจาคโลหิต (ชายอายุ 20-40 ปี จำนวน 4 คน หมู่เลือดแตกต่างกัน 4 หมู่ และหญิงอายุ 20-40 ปี จำนวน 4 คน หมู่เลือดแตกต่างกัน 4 หมู่) ที่หน่วยคลังเลือด โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

เลือดหนู และอสุจิหนู

เลือดหนูเพศเมีย 2 ตัว และอสุจิหนู 1 ตัว สายพันธุ์ Wistar ขนาดน้ำหนักประมาณ 700-800 กรัม

เลือดกระต่าย

เลือดกระต่ายเพศเมีย 2 ตัว ขนาดน้ำหนักประมาณ 3 กก.

การทดลอง

(1) การเตรียมตัวอย่างเลือด

ดูดเลือดจากคน, กระต่าย และหนู ใส่ในภาชนะเคลือบเฮพาริน (heparin) เพื่อกันเลือดแข็งตัว เซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 700 × g ที่ 4 °ซ นาน 5 นาที เก็บเม็ดเลือด

แดงและล้างด้วย TBS (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 ซึ่งมี 0.95% NaCl)นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็วเดิม ล้างซ้ำ 2 ครั้ง

(2) การทดสอบการเกาะกลุ่ม

แขวนลอยเม็ดเลือดแดงใน TBS ให้ได้ความเข้มข้น 2.5% นำไปทดสอบการเกาะกลุ่มเซลล์ตามวิธีของ Kilpartrick และ Yeoman (1978) โดย

-เจือจางสารสกัดเนียงนกหรือสารละลายของสารยับยั้งอะไมเลสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว แบบ serial dilution อัตราส่วน 1:2

-ผสมสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตรกับ 2.5% สารแขวนลอยเม็ดเลือดแดง 50 ไมโครลิตร ในไมโครไตเตอร์เพลทที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 1 ชม.

-เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุมที่ใช้ TBS แทนสารสกัดเนียงนกหรือสารละลายของสารยับยั้งอะไมเลส

<u>กำหนดให้</u>:ไตเตอร์ (titer) ของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงคน, กระต่ายและหนูมีค่าเป็นค่าการเจือจางสูงสุดของสารสกัดเนียงนก หรือสารละลายของสารยับยั้งอะไมเลส ซึ่งยังทำให้เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้อย่างสมบูรณ์ กิจกรรมของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (hemagglutinating activity, HA) มีค่าเป็นส่วนกลับของไตเตอร์ต่อปริมาตรสารละลายที่ใช้ 50ไมโครลิตร กิจกรรมที่จำเพาะของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง (specific hemagglutinating activity) มีค่าเป็นกิจกรรมของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

2.10.5.2 การเกาะกลุ่มตัวอสุจิหนู

(1) การเตรียมตัวอสุจิหนู

ตัวอสุจิหนูที่ใช้ในการศึกษาคือตัวอสุจิที่ยังไม่เจริญพันธุ์ซึ่งได้จากอิพิดิไดมิสส่วนต้น และตัวอสุจิที่เจริญพันธุ์ที่ได้จากอิพิดิไดมิสส่วนปลาย ตัดอิพิดิไดมิสจากตัวหนูเลาะไขมันออกให้หมด ล้างอิพิดิไดมิสให้สะอาดจากเลือดด้วย TBS ตัดอิพิดิไดมิสส่วนต้นและส่วนปลายแยกออกจากกัน เจาะตัวอสุจิออกจากอิพิดิไดมิสแต่ละส่วนโดยแทงด้วยเข็มขนาดเล็กใน TBS จำนวนน้อยๆ ล้างอสุจิด้วย TBS 3 ครั้ง

โดยการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 2,000 × g ที่ 4 °ซ นานครั้งละ 2 นาที จากนั้นแขวนลอยตัวอสุจิใน TBS นับจำนวนตัวอสุจิและทำให้เจือจางจนได้ 40 × 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (กนกนาถ ชูปัญญา, 2520) แล้วนำตัวอสุจิไปทดสอบการเกาะกลุ่มเซลล์ด้วยสารสกัดเนียงนกและสารละลายของสารยับยั้งอะไมเลสต่อไป

(2) การทดสอบการเกาะกลุ่มตัวอสุจิ

ผสมสารสกัดเนียงนกหรือสารละลาย AI ที่เจือจางแบบ 1:2 ตามลำดับ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับเซลล์ตัวอสุจิจากข้อ(1) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องนาน 1-3 นาที หยดสารผสมลงบนแผ่นสไลด์ (slide) สังเกตการเกาะกลุ่มของเซลล์ตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ TBS แทนสารสกัดเนียงนกหรือสารละลาย AI โดยกำหนดการให้คะแนนการเกาะกลุ่มเซลล์ตั้งแต่ 0-4 ดังนี้

คะแนน 0 คือ ไม่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์หรือมีน้อยกว่า 5 เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน 1 คือ กลุ่มขนาดเล็กมีการเกาะกลุ่ม 5-10 เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน 2 คือ กลุ่มขนาดกลางมีการเกาะกลุ่ม 11-25 เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน 3 คือ กลุ่มขนาดใหญ่มีการเกาะกลุ่ม 26-35 เซลล์ต่อกลุ่ม
คะแนน 4 คือ กลุ่มขนาดใหญ่มีการเกาะกลุ่มมากกว่า 36 เซลล์ต่อกลุ่ม

หาค่าไตเตอร์หรือค่าการเจือจางสารสกัดเนียงนกหรือสารละลายสารยับยั้งอะไมเลสมากที่สุดที่ยังให้ผลการเกาะกลุ่มเซลล์ด้วยคะแนน 1 กิจกรรมของการเกาะกลุ่มตัวอสุจิมีค่าเป็นส่วนกลับของไตเตอร์และกิจกรรมจำเพาะของการเกาะกลุ่มตัวอสุจิเป็นกิจกรรมของการเกาะกลุ่มเซลล์ต่อมิลลิกรัมของโปรตีน

2.10.6 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งอะไมเลสจากมอดแป้งสาลี และด้วงถั่วเขียว

วัสดุอุปกรณ์

มอดแป้งสาลี (*Tribolium castaneum*) และด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) ตัวเต็มวัยชนิดละ 20 ตัว จากภาควิชา ชีววิทยา

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาว่า สารยับยั้งอะไมเลสที่ได้จากเมล็ดเนียงนกสามารถยับยั้งอะไมเลสจากมอดแป้งและด้วงถั่วเขียวได้หรือไม่ เพื่อประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชในทางการเกษตรต่อไป

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งอะไมเลสของสารยับยั้งที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว กับอะไมเลสจากมอดแป้งสาลี และด้วงถั่วเขียว โดยทำการบดแมลงทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 20 ตัว ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.02 M sodium phosphate, pH 6.8 ที่มี NaCl 0.9 กรัม/ลิตร สารละลายที่ได้มาเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ซึ่งมีเอนไซม์อะไมเลสจากแมลงทั้ง 2 ชนิดมาทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 2.2 และหาโปรตีนเช่นข้อ 2.4