ภาคผนวก ก การสกัดแอกโตไมโอซิน (Benjakul *et al*., 1997)

สารเคมี

1. สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0
2. สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0
3. น้ำกลั่น

วิธีการ

1. นำเนื้อกุ้งกุลาดำที่ผ่านการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ 4 กรัม มาเติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ ที่ผ่านการแช่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. โฮโมจิไนส์เนื้อกุ้งที่อยู่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์นาน 4 นาที โดยโฮโมจิไนส์ 20 วินาที หยุดพัก 20 วินาที จนครบเวลาที่กำหนด และต้องควบคุมอุณหภูมิระหว่างการโฮโมจิไนส์ไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส
3. นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยง ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000x g นาน 30 นาที และควบคุมอุณหภูมิระหว่างหมุนเหวี่ยงไม่เกิน 4 องศาเซลเซียส
4. นำส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง มาเติมน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในปริมาตร 3 เท่าของส่วนใส
5. นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000x g นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. นำส่วนตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง มาเติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 1.2 โมลาร์ ในปริมาตร 1 เท่าของตะกอนที่ได้ แล้วนำไปกวนนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
7. ตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000x g นาน 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
8. สารละลายแอกโตไมโอซินที่ได้ หรือ ส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง มาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ค่าทางกายภาพ

ข1. การวัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดค่าสี

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าสี ยี่ห้อ Hunter lab รุ่น Color Flex

วิธีการ

1. วางตัวอย่างลงบน Port ซึ่งมีขนาด 1 นิ้ว
2. ใช้ฝาครอบปิดตัวอย่าง เพื่อมิให้แสงรบกวนจากภายนอก
3. เริ่มวัดค่าสีโดยใช้ระบบสีของ CIE Color System ค่าที่วัดได้จะเป็นค่า L* a* และ b*

ข2. การวัดค่าเนื้อสัมผัส Texture Profile Analysis (TPA) (Bourne, 1978)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดเนื้อสัมผัส ยี่ห้อ Texture Analyzer รุ่น TA-XT2i
2. หัววัด cylinder ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

วิธีการ

1. นำตัวอย่างเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบดมาวัดค่าเนื้อสัมผัส Texture Profile Analysis โดยใช้หัว cylindrical ความเร็ว 5 มิลลิเมตรต่อวินาที และกดลงตามความสูงของชิ้นตัวอย่างร้อยละ 50 ตามโปรแกรมการวัดค่า Texture Profile Analysis ที่ต้องกดตัวอย่าง 2 ครั้ง และรายงานผลเป็นค่าความแข็ง (hardness) ค่าการยึดเกาะ (adhesiveness) ค่าการยึดติด (cohesiveness) และค่าความยืดหยุ่น (springiness)

ข3. การวัดค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุ (ดัดแปลงจาก Lanier, 1992)

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าเนื้อสัมผัส ยี่ห้อ Texture Analyzer รุ่น TA- XT2i
2. หัววัด spherical ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

วิธีการ

1.นำตัวอย่างเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบดมาวัดค่าแรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุ โดยใช้หัว spherical ความเร็ว 1.1 มิลลิเมตรต่อวินาที กดตัวอย่างลงไป จนกระทั่งเจาะทะลุเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบด วัดค่าแรงสูงสุดที่ใช้เป็นแรงก่อนเจาะทะลุ รายงานผลเป็นหน่วยกรัม (g) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิเมตร (mm)

ข4. การตรวจสอบค่าการสูญเสียน้ำหนัก

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนและหลังการแปรรูป (ให้ความดันหรือความร้อน)

การคำนวณ

$$\text{การสูญเสียน้ำหนัก (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักก่อนและหลังการแปรรูป}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนการแปรรูป}} \times 100$$

ข5. การตรวจสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ (Jatuphong *et al*., 2000)

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 50 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
2. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร
3. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. อุปกรณ์สำหรับหาปริมาณความชื้น ได้แก่ ตู้อบไฟฟ้า ภาชนะหาความชื้น (จานอลูมิเนียมพร้อมฝา) และโถดูดความชื้น

วิธีการ

1. นำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นบางๆ
2. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม นำมาวางบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 50 จำนวน 1 แผ่น
3. ปิดทับด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 2 แผ่น พับกระดาษกรองแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 x g นาน 15 นาที
4. นำชิ้นตัวอย่างออกจากกระดาษกรอง แล้วนำกระดาษกรองมาชั่งน้ำหนักหาปริมาณความชื้นของตัวอย่าง (A.O.A.C., 1999)

การคำนวณ

$$\text{ความสามารถในการอุ้มน้ำ (ร้อยละ)} = \frac{\text{IWC-WL}}{\text{IWC}} \times 100$$

โดยที่

IWC = ปริมาณความชื้นที่มีในตัวอย่าง (AOAC,1999) x น้ำหนักตัวอย่าง

WL = น้ำหนักของน้ำที่ออกมาจากตัวอย่างภายหลังการหมุนเหวี่ยง

ข6. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1999)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิและภาชนะหาความชื้น

2. โถดูดความชื้นและเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

2. ทำซ้ำเช่นข้อที่ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างอาหารที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว

4. นำไปอบในตู้ไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105±2 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่างนั้น จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบอีก

5. ทำซ้ำเช่นข้อที่ 4 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100$$

โดยให้

W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่าทางเคมี

ค1 การวิเคราะห์ค่าความขุ่น (Benjakul *et al*., 2001)

สารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0

วิธีการ

1. นำตัวอย่างสารละลายแอกโตไมโอซินธรรมชาติที่ละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ ที่ผ่านการแปรรูปที่สภาวะต่างๆ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ค2. การวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรโฟบิกบนพื้นผิว (Benjakul *et al*., 1997)

สารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 6.0

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีกรดแอนิลิโนแนฟธาลีนซัลฟอนิก (ANS) 8 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0

วิธีการ

1. นำสารละลายแอกโตไมโอซินธรรมชาติที่ผ่านสภาวะการแปรรูปมาผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ โดยละลายให้มีความเข้มข้นของสารละลายแอกโตไมโอซิน0.125 ,0.25 , 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

2. บ่มที่อุณหภูมิ 20องศาเซลเซียส นาน 10นาที

3. เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีกรดแอนิลิโนแนฟธาลีนซัลฟอนิก 8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20ไมโครลิตร

4. วัดความเข้มของฟลูออเรสเซนต์ โดยวัดที่ความยาวคลื่นเริ่มต้น (Excitation) ที่ 374 นาโนเมตร และวัดที่ความยาวคลื่นสุดท้าย (Emission) ที่ 485 นาโนเมตร โดยมีสารละลายเมธานอลที่มีสารละลายกรดแอนิลิโนแนฟธาลีน-ซัลฟอนิก (ANS) 8 มิลลิโมลาร์ เป็น blank

5. นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นกับความเข้มที่วัดได้ แล้วหาค่าความชันของเส้นกราฟ (S_0) ได้เป็นค่าปริมาณไฮโดรโฟบิกบนพื้นผิว

ค3. การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด (Benjakul *et al*., 2001)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ที่มียูเรีย 8 โมลาร์ เอธิลไดเมธิลเตตราอะซิติกแอซิด (EDTA) 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ร้อยละ 2 ความเป็นกรดด่าง 6.8

2. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกที่มีไดไทโอบิสไนโทรเบนโซอิกแอซิด (DTNB) 10 มิลลิโมลาร์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเป็นกรดด่าง 6.8

3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีโปแตสเซียม-คลอไรด์ 0.6 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0

วิธีการ

1. นำสารละลายแอกโตไมโอซินธรรมชาติที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผ่านสภาวะการแปรรูปปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกที่มียูเรีย เอธิลไดเมธิลเตตราอะซิติกแอซิดและโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายผสมมาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกที่มีไดไทโอบิส-ไนโทรเบนโซอิกแอซิด ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร

3. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร โดยมีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์ เป็น reagent blank และสารละลายตัวอย่างผสมที่ไม่เติมสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริกที่มีไดไทโอบิสไนโทรเบนโซอิกแอซิด เป็น sample blank

คำนวณ

$C = A/(\varepsilon b)$ โมล/10^5 กรัมโปรตีน

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ε = ค่าคงที่ที่มีค่าเท่ากับ 13600 $M^{-1}. CM^{-1}$

b = เส้นผ่านศูนย์กลางของคิวเวท

ค4. การวิเคราะห์ปริมาณพันธะไดซัลไฟด์ (Benjakul *et al*., 2001)

สารเคมี

1. สารละลาย NTSB ซึ่งเตรียมจากสารละลายไดไทโอบิสไนโทรเบนโซอิกแอซิด (DTNB) 1 กรัม (0.253 มิลลิโมล) ละลายในสารละลายไดโซเดียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่าง 7.5 ผสมกับสารละลายที่มีกัวนิดีนไทโอไซยาเนท (quanidine thiocyanate) 2 โมลาร์ ไกลซีน 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซัลไฟด์ 100 มิลลิโมลาร์ และเอธิลไดเมธิลเตตราอะซิติกแอซิด (EDTA) 3 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 9.5 ในอัตราส่วน 1:100

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.0

วิธีการ

1. นำสารละลายแอกโตไมโอซินธรรมชาติที่มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์ที่ผ่านสภาวะการแปรรูป ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย NTSB 3 มิลลิลิตร

2. บ่มในที่มืดและอุณหภูมิห้อง นาน 25 นาที

3. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร โดยมีสารละลาย NTSB ที่ผสมน้ำกลั่น เป็น blank

คำนวณ

$C = A/(\varepsilon b)$ โมล/10^5 กรัมโปรตีน

โดยที่

A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ε = ค่าคงที่ที่มีค่าเท่ากับ 13900 $M^{-1}. CM^{-1}$

b = เส้นผ่านศูนย์กลางของคิวเวท

ค5. การวิเคราะห์ปริมาณแปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายไตรคลอโรอะซิติก (Morrissey *et al*., (1993

สารเคมี

1. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างเจลกุ้งกุลาดำบดมา 3 กรัม

2. เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาตร 27 มิลลิลิตร

3. โฮโมจีไนส์ตัวอย่างเป็นเวลา 3-1นาที)จนเป็นเนื้อเดียวกัน (ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2ชั่วโมง

4. เหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7500xg นาน 1 5นาที

5. นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry method

ค6. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method (Lowry *et al*., 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย A: โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

2. สารละลาย B: คอปเปอร์ซัลเฟตร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมซิเตรทเข้มข้นร้อยละ 1

3. สารละลาย C: สารละลายโฟลินฟีนอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) เข้มข้น 1 นอร์มอล

4. สารละลาย D: นำสารละลาย B จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย A จำนวน 50 มิลลิลิตร

5. สารละลายโปรตีนมาตรฐานไทโรซีน (Tyrosine) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

วิธีการ

1. นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย D จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

2. เติมสารละลาย C 200 ไมโครลิตร ลงไปในสารละลายผสมข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

3. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน

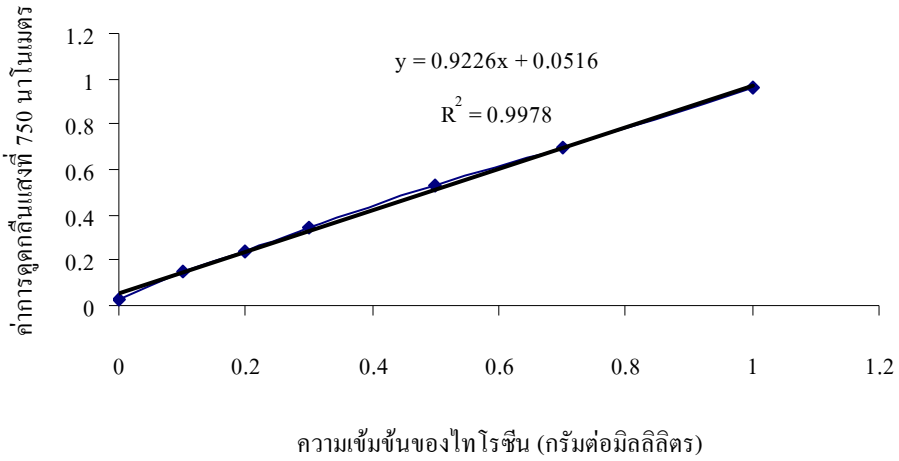
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 0 20 40 60 100 140 และ 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 ไมโครลิตร

2. นำสารละลายไทโรซีนจากข้อ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับตัวอย่าง

3. เขียนกราฟ และหาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร แสดงดังภาพภาคผนวกที่ 1 ปริมาณ

โปรตีนคำนวณโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานไทโรซีน



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานไทโรซีน

Tyrosine standard graph

ค7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยไบยูเรท (Copeland, 1994)

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. สารละลายไบยูเรท : ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 1.5 กรัม โซเดียม-โปแตสเซียมทาเรต 6.0 กรัม เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 300 มิลลิลิตรในขณะกวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายโปรตีน 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที

3. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

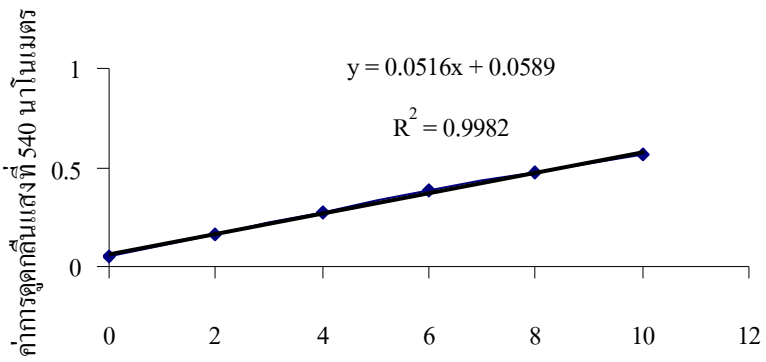
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 200 300 400 และ 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครลิตร

2. เติมสารละลายไบยูเรท จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4. เขียนกราฟมาตรฐาน และหาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แสดงดังภาพถาคผนวกที่ 2 ปริมาณโปรตีนคำนวณได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน BSA



ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐาน BSA

BSA standard graph

ภาคผนวก ง การตรวจสอบรูปแบบโปรตีนไมโอไฟบริลโดยใช้วิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (ดัดแปลงจาก Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

1. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมินิเจล

สารเคมี

1. Acrylamide/bis-acrylamide: ละลายAcrylamide 29.2 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน หลังเตรียม

2. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.8

3. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 6.8

4. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

5. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 5 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

6. Sample buffer (non reducing buffer):

ทริสไฮโดรคลอไรด์	0.1514	กรัม
กลีเซอรอล	2.5	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.25	กรัม
EDTA	0.0186	กรัม
โบรโมฟีนอลบลู	0.25	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

7. Sample buffer (reducing buffer):

ทริสไฮโดรคลอไรด์	0.1514	กรัม
กลีเซอรอล	2.5	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.25	กรัม
EDTA	0.0186	กรัม
เบต้า-เมอแคปโตเอธานอล	0.25	มิลลิลิตร
โบรโมฟีนอลบลู	0.25	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

8. Electrod buffer:

ทริสไฮโดรคลอไรด์	3.0	กรัม
กลีเซอรอล	14.4	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

9. Catalyst ประกอบด้วย

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เตรียมก่อนใช้)

TEMED (N,N,N,N,-tetramethy ethylenediamine)

10. โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล High Molecular Weight (Sigma) ประกอบด้วย myosin, β-galactosidase, phosphorylas b, fructose-6-phosphate kinase, albumin, glutamic dehydrogenase, ovalbumin, glyceraldehydes-3-phosphate dehydeogenase มีน้ำหนักโมเลกุล 205,000 116,000 97,000 84,000 66,000 55,000 45,000 และ 36,000 ดาลตัน ตามลำดับ

11. สีย้อมโปรตีน Coomassie Billiant Blue R-250

12. Staining solution: ละลาย Comassie Billiant Blue R-250 0.04 กรัม ในเมธานอล 100 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด แล้วเติม Glacial acetic acid 15 มิลิลิตร และน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร

13. Destaining solution 1: ผสมเมธานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซีติก 75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง 3 กรัม ผสมกับ สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร โฮโมจีไนส์ 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5,500xg นาน15 นาที นำสวนใสที่ได้มาผสมกับ Sample buffer (อัตราส่วน 1:1) ให้มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ต้มสารผสมในน้ำเดือด นาน 3 นาที ทำให้เย็นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม running gel (10%gel) (สำหรับเจล 2 แผ่น)

30% Aceylamide/0.8% bis-acrylamide	0.665	มิลลิลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.8	1.250	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	3.000	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10	100	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10	50	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน

TEMED	5	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูดใส่ในแผ่นเจล แผ่นละ 3.5 มิลลิลิตร

3. การเตรียม stacking gel (สำหรับเจล 2 แผ่น)

30% Aceylamide/0.8% bis-acrylamide	0.665	มิลลิลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 6.8	1.250	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.000	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10	50	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10	25	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากัน

TEMED	3	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากันแล้วเทใส่แผ่นเจล

4. การแยกโปรตีนโดยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

ประกอบชุดเจลอิเลคโตรโฟรีซีส จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber ด้านใน จากนั้นเติมตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 จำนวน 5 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของโปรตีน 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเติม electrode buffer ใน chamber ด้านนอก ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส เข้ากับตัวให้กระแสไฟฟ้า เปิดกระแสไฟฟ้า 30mA (สำหรับเจล 2 แผ่น) รอจนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า

5. การย้อมสีโปรตีนในเจล

นำเจลมาย้อมสีโดยแช่ใน Staining solution นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ใน Destaining solution 1 นาน 15 นาที แล้วนำมาแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนใน Destaining solution 2

ภาคผนวก จ วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (ดัดแปลงจาก Nip and Moy, 1988)

สารเคมี

1. สารละลายกลูทาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ในน้ำกลั่น ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร

2. สารละลายเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 10 30 50 70 90 และ 100 ปริมาตรโดยปริมาตร

วิธีการ

1. ตัดตัวอย่าง ขนาด กว้าง x ยาว x หนา เท่ากับ 0.4 x 0.4 x 0.4 เซนติเมตร ใส่ในสารละลายกลูทาราลดีไฮด์ในน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

2. ดึงน้ำออก (dehydration) จากตัวอย่างโดยแช่ในสารละลายเอธานอล จากความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูงดังนี้

ความเข้มข้นร้อยละ 10 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

ความเข้มข้นร้อยละ 30 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

ความเข้มข้นร้อยละ 50 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

ความเข้มข้นร้อยละ 70 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

ความเข้มข้นร้อยละ 90 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

ความเข้มข้นร้อยละ 100 ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

3. ส่งตัวอย่างที่แช่ในสารละลายเอธานอล ความเข้มข้นร้อยละ 100 เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดต่อไป

ภาคผนวก ฉ วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (ดัดแปลงจาก Ngapo *et al*., 1996)

สารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีกลูทาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 30 กรัมต่อกิโลกรัม และฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้น 20 กรัมต่อกิโลกรัม ความเป็นกรดด่าง 7.2

2. สารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 7.2

วิธีการ

1. ตัดตัวอย่างให้มีความหนาเท่ากับ 0.1 เซนติเมตร ใส่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีกลูทาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และฟอร์มาลดีไฮด์ นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

2. ล้างตัวอย่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ 3 ครั้ง

3. ส่งตัวอย่างที่แช่ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านต่อไป