ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein)

โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A: คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2. สารละลาย B: โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate $\cdot 4H_2O$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3. สารละลาย C: โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

4. folin-ciocalteu reagent

วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย WS1 และ WS2 ใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ โดย

WS1: สารละลายผสมของสารละลาย A: สารละลาย B: สารละลาย C ในอัตราส่วน 1:1: 98 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

WS2: สารละลาย folin-ciocalteu reagent เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2. เติมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม (5-100ไมโครกรัม) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

3. เติมสารละลาย WS1 ปริมาตร 2.1 มิลลิลิตร ปั่นผสมแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที

4. เติมสารละลาย WS2 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ปั่นผสมทันทีแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

5. นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ส่วน blank วิเคราะห์ด้วยวิธีการเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

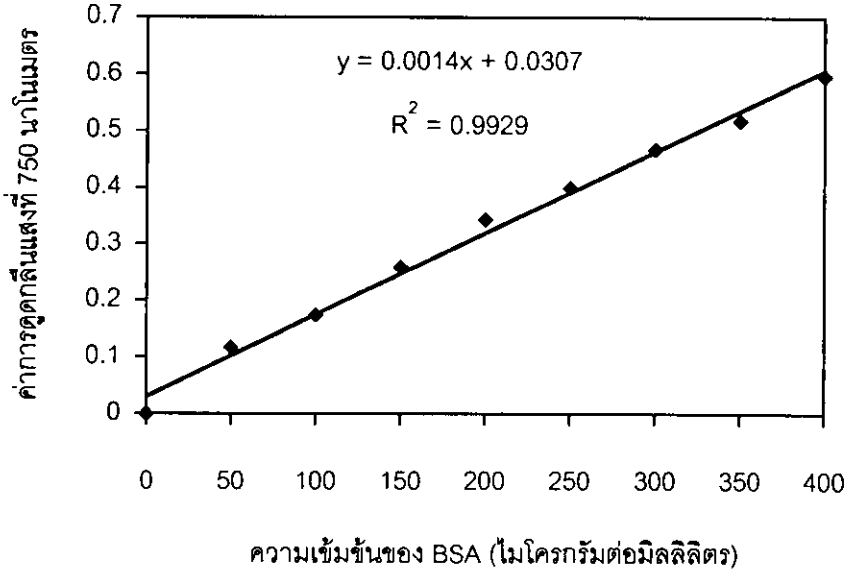
การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน (BSA)

1. ละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin: BSA) 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่เป็น stock solution มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. เจือจางสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน (stock solution) ให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำ stock solution ปริมาตร 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ มาปรับปริมาตรของแต่ละหลอดให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแต่ละความเข้มข้นดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น

4.นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของโบวินซีรัมอัลบูมิน (ภาพภาคผนวก ก2)



ภาพภาคผนวก ก1 กราฟมาตรฐานโปรตีนโบวินซีรัมอัลบูมินที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

2. **การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส**

1. ชั่ง N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) 1 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือสารละลาย N-acetyl-glucosamine ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เจือจางสารละลาย N-acetyl-glucosamine (stock solution) ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. สารละลายที่ได้ในแต่ละหลอดนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล GlcNAc ตามวิธีการของ Reissig *et al.*; 1955)

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล GlcNAc ตามวิธีการของ Reissig's method

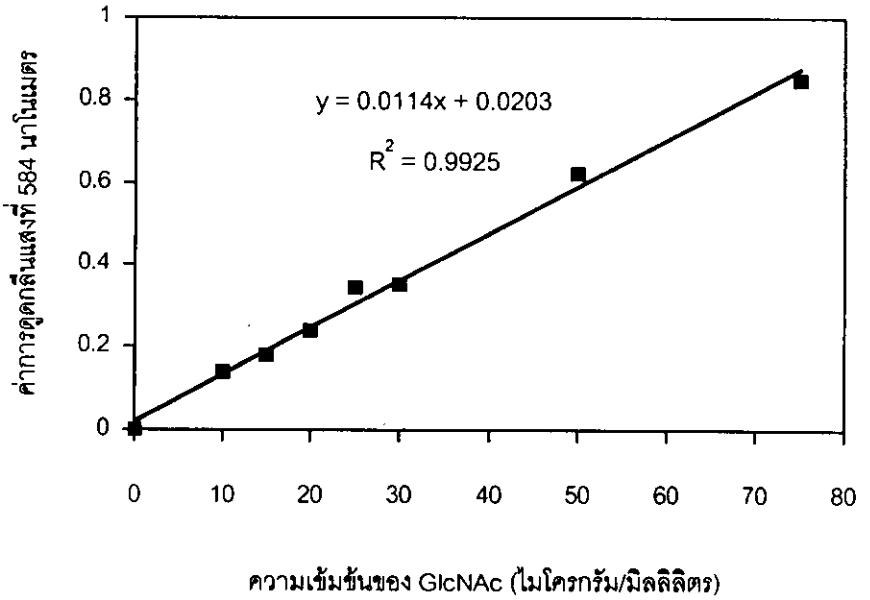
1. นำสารละลาย N-acetylglucosamine (stock solution) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ (10-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย 0.8 M potassium tetraborate ($B_4K_2O_7 \bullet 4H_2O$) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

3. ให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 3 นาที และหลังจากนั้นทำให้เย็นในน้ำเย็นทันที

4. เติมสารละลาย 10% *p*-DMAB ในสารละลาย gracial acetic acid ที่มี 12.5% HCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำเย็น

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 584 นาโนเมตร ส่วน blank วิเคราะห์ด้วยวิธีการเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง แล้วทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน น้ำตาล GlcNAc (ภาพภาคผนวก ก4)



ภาพภาคผนวก ก2 กราฟมาตรฐานน้ำตาล GlcNAc

3. **การหามวลโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส ตามวิธีการของ** Laemmli (1970)

สารเคมี

1. Acrylamide/bisacrylamide เตรียมโดยละลาย Acrylamide 29.2 กรัม และ bisacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน หลังจากการเตรียม
2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8
4. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
5. Stock sample buffer (SDS-Reducing buffer) ประกอบด้วย

น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.8	มิลลิลิตร

10% SDS	1.6	มิลลิลิตร
เบต้า-เมอแคปโตเอธานอล	0.4	มิลลิลิตร
1% โบรโมฟีนอลบลู	0.4	มิลลิลิตร

6. 5X electrode (running) buffer, pH 8.3

Tris-base	9	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
SDS	3	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

7. Catalyst ประกอบด้วย

   2% (w/v) Ammonium persulfate (APS) (เตรียมก่อนที่ใช้)

   TEMED (N, N, N', N'- tetramethylenediamine)

8. โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล Low molecular weight (Bio-Rad) ประกอบด้วย โปรตีน 6 ชนิดคือ phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, soybean trypsin inhibitor และ lysozyme ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 97,400, 66,200, 45,000, 31,000, 21,500 และ 14,400 ดาลตัน ตามลำดับ
9. สีย้อมโปรตีน Coomassie Brilliant Blue R-250
10. Staining solution เตรียมโดย ละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 0.04 กรัม ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร ทำให้ละลาย แล้วเติม glacial acetic acid 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร
11. Destaining solution 1 : ผสมเมทานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 30 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร

    Destaining solution 2 : ผสมเมทานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

3.1 **การเตรียมตัวอย่าง**

ทำการผสมสารละลายตัวอย่างกับ SDS-reducing buffer ในอัตราส่วน 1:4 ทำการต้มสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ก่อนจะนำตัวอย่างไปใส่ในเจล

3.2 **การเตรียมองค์ประกอบของเจลในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ** SDS-PAGE

(10% separating gel และ 4% stacking gel) แสดงดังตารางภาคผนวก ก1

3.3 **วิธีการ** run gel electrophoresis (running the gel)

ประกอบชุดเจลอิเล็กโตรฟอรีซิส จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber จากนั้นทำการ load ตัวอย่างที่เตรียมได้ 5-20 ไมโครลิตร ต่อชุดอิเล็กโตรฟอรีซิสเข้ากับหม้อแปลงไฟฟ้า (power supply) ที่ขั้วแอโนด และแคโทดด้วยกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ถึง running gel (ประมาณ 30 นาที) แล้วเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 150 โวลต์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่จนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

ตารางภาคผนวก ก1 องค์ประกอบของเจลในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

Chemical	10% Separating gel	4% Stacking gel
30% Acrylamide-bis	1.167 ml	0.4 ml
1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8	0.875 ml	-
0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8	-	1.0 ml
1% SDS	0.35 ml	0.3 ml
Distilled water	0.7585 ml	0.9 ml
0.1 M EDTA	-	0.8 ml
2% Ammonium persulfate	0.35 ml	0.4 ml
TEMED	6 µl	5 µl

3.4 **วิธีการย้อมเจล** (Staining the gel)

1. วางเจลที่ได้ลงในกล่องพลาสติกและเติมสารละลายที่ใช้ในการย้อมโปรตีน เรียกว่า staining solution ทำการเขย่าช้าๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

2. ทำการเทสารละลายที่ใช้ย้อมเจลออก แล้วเติมสารละลายที่เรียกว่า Destaining solution 1 ลงไปแทนแล้วทำการเขย่าช้าๆ เป็นเวลาประมาณ 15 นาที แล้วแช่ใน Destaining solution 2

4. การตรวจสอบแบบแผนการย้อมแถบโปรตีนโดยอิเล็กโตรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

มีองค์ประกอบของเจลแสดงดังตารางภาคผนวก ก2

ตารางภาคผนวก ก2 องค์ประกอบของเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

Chemical	Stacking gel	Separating gel	
	4%	10%	12%
30% Acrylamide-bis mixture (ml)	0.65	2.38	2.80
0.5M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	1.25	-	-
1.5M Tris-HCl , pH 8.8 (ml)	-	1.82	1.82
10% Ammonium persulfate (µl)	25	70	70
TEMED (µl)	5	5	5
Distilled water (ml)	3.02	2.66	2.24
Total volume (ml)	5.0	7.0	7.0

ที่มา : Davis (1964)

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. **การเตรียมสารละลายซิเตรต–ฟอสเฟตบัฟเฟอร์** (Citrate–phosphate buffer) (Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.1 M citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 19.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
2.6	44.6	5.4
3.0	39.8	10.2
3.4	35.9	14.1
3.8	32.3	17.7
4.0	30.7	19.3
4.4	27.8	22.2
4.8	25.2	24.8
5.0	24.3	25.7
5.4	22.2	27.8
5.8	19.7	30.3
6.0	17.9	32.1
6.4	15.4	34.6
6.8	9.1	40.9
7.0	6.5	43.6

2. **การเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์** (Tris–HCl buffer) (Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.2 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane (6.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M HCl

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
7.0	46.6
7.2	44.2
7.4	41.4
7.6	38.4
7.8	32.5
8.0	26.8
8.2	21.9
8.4	16.5
8.6	12.2
8.8	8.1
9.0	5.0

3. **การเตรียมสารละลายคาร์บอเนต–ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์** (Carbonate–bicarbonate buffer) (Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.2 M anhydrous sodium carbonate (21.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M sodium bicarbonate (16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
9.2	4.0	46.0
9.4	9.5	40.5
9.6	16.0	34.0
9.7	19.5	30.5
9.8	22.0	28.0
10.0	27.5	22.5
10.2	33.0	17.0
10.4	38.5	11.5
10.5	40.5	9.5
10.6	42.5	7.5
10.7	45.0	5.0

4. **การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์** (Sodium acetate buffer) (Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.2 M acetic acid (11.55 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M sodium acetate ($C_2H_3O_2Na$ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร หรือ $C_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ 27.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการดังตารางแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย A (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

5. **การเตรียมสารละลาย Ammediol บัฟเฟอร์** (2–Amino–2–methyl–1,3–propanediol) (Stoll and Blanchard, 1990)

สารละลาย A: 0.2 M 2–amino –2–methyl–1,3–propanediol (21.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M HCl

ผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

พีเอช	ปริมาตรสารละลาย B (มิลลิลิตร)
10.0	2.0
9.8	3.7
9.6	5.7
9.4	8.5
9.2	12.5
9.0	16.7
8.8	22.0
8.6	29.5
8.4	34.0
8.2	37.7
8.0	41.0
7.8	43.5

6. **สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมไฮยาลูโรนิเดส**

สารละลาย 10% *p*-DMAB

ชั่ง *p*-DMAB (*p*-dimethylaminobenzaldehyde) 10 กรัม ละลายในสารละลายกรดอะซิติก (gracial acetic acid) 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 12.5% (v/v) ของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) สารละลายที่เตรียมได้ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ให้เจือจางกับกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 1: 9 (v/v) และควรเจือจางใหม่ๆก่อนใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

1. **การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟี** (column chromatography)

1.1 **การใช้เรซิน** DEAE-Toyopearl 650M (Ion-exchange column chromatography)

เตรียมโดยนำ DEAE-Toyopearl 650M มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาล้างต่อด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยแช่ทิ้งค้างคืนไว้ แล้วล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์เดิมอีกประมาณ 2-3 ครั้ง ก่อนจะนำไปบรรจุลงคอลัมน์ เก็บเรซินที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 **การใช้เรซิน** Sephadex G-100 (Gel-filtration chromatography)

เตรียมโดยการดัดแปลงวิธีการของ Cooper (1977 อ้างโดย สมรักษ์ พันธ์ผล, 2537) โดยใช้เจลซนิด Sephadex G-100 โดยนำมาแช่น้ำกลั่นนาน 30 นาที ดูดเอาอนุภาคขนาดเล็กที่แขวนลอยในน้ำออก แล้วทำการล้างต่อด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยแช่ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วนำมาล้างต่อด้วยบัฟเฟอร์เดิมอีก 2-3 ครั้ง ก่อนนำไปบรรจุลงคอลัมน์ เก็บเรซินที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. **การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต**

คำนวณการใช้ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและเปอร์เซ็นต์ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน จากตารางภาคผนวก ค1

ตารางภาคผนวก ค1 ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต : เปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัว

AMMONIUM SULPHATE, GRAMS TO BE ADDED TO 1 LITRE

From ↓ To →	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	5	55	84	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
		27	56	85	115	146	179	212	246	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
	10		28	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
		15		28	58	88	119	151	185	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
			20		29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
				25		29	60	91	123	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
					30		30	61	92	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
						35		30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
							40		31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
								45		31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
									50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
										55		33	66	101	138	175	215	256	298	343
											60		33	67	103	140	179	219	261	305
												65		34	69	105	143	183	224	266
													70		34	70	107	146	186	228
														75		35	72	110	149	190
															80		36	73	112	152
																85		37	75	114
																	90		37	76
																		95		38

ที่มา : Scopes (1978)