บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ

ส่วนของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำเลี้ยง (Cultured black tiger shrimp) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัทห้องเย็นโชติวัฒน์ หาดใหญ่ จำกัด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2. สารเคมี

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส รวมทั้งการหาปริมาณโปรตีน และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ของบริษัท Sigma จำกัด (Analytical grade)

อุปกรณ์

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2000 ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer) ยี่ห้อ Jasco รุ่น V-530 ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hitachi รุ่น SCR-20B ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Homogenizer) ยี่ห้อ IKA labortechnik รุ่น IKA ประเทศมาเลเซีย

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350 ประเทศเยอรมัน

เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer) ยี่ห้อ IKA labortechnik รุ่น MS1 ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องกวนผสม (Magnetic stirrer) ยี่ห้อ IKA labortechnik รุ่น RO5 power ประเทศเยอรมัน

เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 210S ประเทศเยอรมัน

เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP 2100S ประเทศเยอรมัน

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Schott รุ่น CG 825 ประเทศเยอรมัน

ปั๊ม (Peristaltic pump) ยี่ห้อ Isamotec รุ่น Reglo Analog 2 channels MS-2/8

ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ตัวกรองแบบละเอียด (Ultrafiltration Vivacell 70 Concentrator) ขนาด 10 กิโลดาลตัน MWCO. PES ยี่ห้อ Vivascience รุ่น VS 6001 ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องเก็บแยกส่วนอัตโนมัติ (Automatic fraction collector) ยี่ห้อ LKB รุ่น LKB 2212 Herirac ประเทศสหรัฐอเมริกา

ชุดอิเล็กโทรฟอรีซิส (Electrophoresis apparatus) ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น Mini-Protein II ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการศึกษา

1. การสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

เก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำเลี้ยงจากโรงงาน บันทึกจำนวนตัวต่อกิโลกรัมของกุ้งกุลาดำ แล้วนำมาดึงเอาหัวออก หลังจากนั้นนำเอาส่วนของหัวที่ได้ มาชั่งน้ำหนักหาสัดส่วนของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำต่อน้ำหนักตัวกุ้ง และร้อยละของน้ำหนักตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ และเก็บตัวอย่างที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำที่ได้ด้วยวิธีการซึ่งดัดแปลงจาก Chuang และ Shih (1990) และ Chen และคณะ (1997) โดยนำตัวอย่างตับอ่อนจากกุ้งกุลาดำเลี้ยง น้ำหนักตัวอย่างละ 50 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร [อัตราส่วนของตับอ่อนกุ้งกุลาดำต่อสารละลาย บัฟเฟอร์เท่ากับ 1:3 (น้ำหนักต่อปริมาตร)] นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปสกัดต่อโดยการกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่อง หมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735x*g*) นาน 30 นาทีจะได้สารละลายเอนไซม์สกัด 2 ส่วน คือ ส่วนสกัดสารละลาย (supernatant) และส่วนสกัดอิมัลชั่น (emulsion)

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์

นำเอนไซม์สกัดที่ได้ทั้ง 2 ส่วน มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ โดยวิธีการของ Lowry และคณะ (1951) โดยใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และเอนไซม์ ไฮยาลูโรนิเดส ตามวิธีการในข้อ 1.2.1-1.2.2 ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนั้นในขั้นตอนต่อไป

1.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โดยดัดแปลงวิธีการของ Malamy และ Horecker (1966) และ Ericksson และคณะ (2001)

นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรต คือ สารละลาย *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายผสมของสารละลาย ammediol บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.8 และแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ในอัตราส่วน 97.9 : 2.1, ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงต่อโมลาร์ (molar extinction coefficient) เท่ากับ 18,500 M^{-1} cm^{-1} (Ericksson *et al.*, 2001)

กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต (*p*NPP) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A_{405nm} \times 1000 \times \text{ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)}}{\text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{extinction coefficient} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

1.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ตามวิธีการของ Krishnapillai และคณะ (1999a)

นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรตคือ สารละลายโซเดียมไฮยาลูโรเนต (sodium hyaluronate) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.4 ที่ประกอบด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ปริมาตร 0.40 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเติมสารละลายโปแตสเซียมเตตราบอเรต ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 3 นาที และทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็น แล้วเติม สารละลาย *p*-DMAB (*p*-dimethylamino-benzaldehyde) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำให้เย็นในทันที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 584 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาล N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) นำค่าที่ได้มาคำนวณหา กิจกรรมของเอนไซม์

กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของGlcNAc} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{มวลโมเลกุลของGlcNAc (กรัมต่อโมล)} \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำไดอะไลซิส

นำตัวอย่างเอนไซม์สกัดได้มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวต่างๆ เมื่อทดสอบหาช่วงความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนเอนไซม์ที่ต้องการเตรียม (โดยคัดเลือกช่วงความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่า กิจกรรมของเอนไซม์นั้นๆ สูงสุด) แล้วจึงทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความอิ่มตัวที่เหมาะสมโดยค่อยๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยอย่างช้าๆ พร้อมทั้งทำการกวนด้วยเครื่องกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมด นำสารละลายที่ได้มาเหวี่ยงแยกเพื่อตกตะกอนโปรตีน

ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735x*g*) นาน 20 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 จนตะกอนละลายหมด แล้ววัดปริมาตร

นำสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้บรรจุลงในถุงไดอะไลซิส (dialysis tubing) ซึ่งมีขนาดของรูกำจัดโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับหรือต่ำกว่า 8,000 ดาลตัน ผูกถุงให้แน่น แช่ในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วนสารละลายในถุง 1 ส่วนต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 50 ส่วน โดยมีการกวนสารละลายบัฟเฟอร์ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ภายหลังเวลาผ่านไป 1, 2 และ 4 ชั่วโมง นำสารละลายในถุงไดอะไลซิสมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735x*g*) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

2.2 การทำโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนอิออน

เตรียมเรซินแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M ซึ่งเป็นตัวแลกเปลี่ยนแอนอิออน (anion exchange) แล้วบรรจุลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.4x20 เซนติเมตร (ปริมาตร 30.79 มิลลิลิตร) ซึ่งผ่านการปรับสมดุล (equilibrate) ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรเจล โดยมีอัตรา การไหลคงที่เท่ากับ 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.1 ผ่านลงในคอลัมน์ แล้วชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการปรับสมดุล เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ในหลอดทดลองปริมาตร 3.0 มิลลิลิตรต่อหลอด ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าใกล้ศูนย์หรือไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก แล้วจึงเริ่มชะโปรตีนที่เกาะกับเรซินด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้นต่อเนื่องจาก 0-0.35 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันในอัตราการไหลเท่าเดิม ทำการติดตามปริมาณโปรตีนของสารละลายที่ถูกชะออกจากคอลัมน์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ นำเฉพาะส่วนที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงมารวมกันแล้วทำให้เข้มข้นโดยวิธี อัลตราฟิวเตรชั่น ด้วยเมมเบรน Vivacell 70 concentrator (ขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 10 กิโลดาลตัน) แล้ว

จึงนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และ ปริมาณโปรตีน ก่อนจะนำเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นในขั้นตอนต่อไป

2.3 การทำโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิวเตรชัน

นำสารละลายส่วนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่รวมได้จากคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M และผ่านการทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นแล้ว มาทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นอีกโดยการผ่านลงในคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่น โดยใช้เรซินชนิด Sephadex G-100 ทำการบรรจุเรซินลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1.4x25 เซนติเมตร (ปริมาตร 38.48 มิลลิลิตร) ซึ่งผ่านการปรับให้คอลัมน์ให้สมดุลแล้วด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเจล แล้วนำสารละลายส่วนที่ทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่น ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 ทำการชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ในการปรับให้สมดุล ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายในหลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของสารละลายแต่ละหลอดจนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาโดยสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ นำสารละลายที่เก็บได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แล้วทำการรวมสารละลายของหลอดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน นำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่น ด้วยเมมเบรน Vivacell 70 concentrator ซึ่งมีขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 10 กิโลดาลตัน นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส

2.4.1 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากแต่ละขั้นตอนมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน โดยใช้วิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ ตามวิธีการของ Davis (1964) ทำการย้อมแถบโปรตีนที่ได้บนแผ่นวุ้นด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250

2.4.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

นำสารละลายของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากแต่ละขั้นตอนมาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) ตามวิธีการ

ของ Laemmli (1970) ใช้ stacking gel เท่ากับ ร้อยละ 4 และ separating gel เท่ากับ ร้อยละ 10 ย้อมสีแถบโปรตีนที่ได้บนแผ่นวุ้นด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้อิเล็กโทรฟอรีซิสชนิด SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานชุด Low Molecular Weight (LMW) Calibration Kit ของบริษัท Bio-rad ซึ่งใช้สำหรับโปรตีนในช่วงมวลโมเลกุล 14,400-94,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด คือ ฟอสฟอรีเลส บี(phosphorylase b) โบวินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) โอวัลบูมิน (ovalbumin) คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase) ซอยบีน ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor) และไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 97,400, 66,200, 45,000, 31,000, 21,500 และ 14,400 ดาลตัน ตามลำดับ และหาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนในสารละลายตัวอย่างหรือโปรตีนมาตรฐานต่อระยะทางของสีโบรโมฟีนอลบลู แล้วนำมาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility, R_f) จากนั้นจึงนำมาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับ ค่า log ของ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานทั้ง 6 ชนิด นำค่า R_f ของโปรตีนตัวอย่างที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหามวลโมเลกุลของเอนไซม์

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพันธ์ } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

3.1 พีเอชที่เหมาะสม

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) โดยนำสารละลายเอนไซม์ใส่ลงในสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี พีเอช 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 และสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 9.0, 10.0 และ 11.0 แล้วตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.2 **ความคงตัวต่อพีเอช**

ศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ โดยการผสมสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) ในสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 และสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 9.0, 10.0 และ 11.0 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที แล้วนำมาตรวจ วัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.3 **อุณหภูมิที่เหมาะสม**

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) เติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.1) ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส

3.4 **ความคงตัวต่ออุณหภูมิ**

ศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) ทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับแล้วนำมาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.5 **ผลของอิออนโลหะและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์**

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100) มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอิออนของโลหะต่างๆ ละลายอยู่ในอัตราส่วนสารละลายเอนไซม์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:1) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่าที่ต้องการ (Table 1) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที แล้วจึงตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

Table 2. Ions and some chemicals at various concentrations

Ions and chemicals	Concentration
KCl	10 mM
NaCl	10 mM
LiCl	10 mM
$CaCl_2$	10 mM
$MgCl_2$	10 mM
$ZnSO_4$	10 mM
$CuSO_4$	10 mM
EDTA	10 mM
NaN_3	10 μM
$HgCl_2$	10 μM
Ethanol	2.0 %
Methanol	2.0 %
SDS	0.5 %

SDS = Sodium dodecyl sulfate EDTA = Ethylenediaminetetra acetic acid