ภาคผนวก

ภาคผนวก ก1. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟต (AOAC, 1999)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร
2. โฮโมจิไนเซอร์
3. อ่างน้ำให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. กรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) เข้มข้นร้อยละ 10
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มอล
3. 1.5 % ammonium molybdate เข้มข้นร้อยละ 1.5
4. ไฮดราซีนซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 1
5. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 1000 µg P/ml (Stock std. Solution)

   Intermediate std. Solution 10 µg P/ml

   Working std. Solution 10,20,30,40 และ 50 µg P/ml

การสกัด

1. ชั่งตัวอย่าที่บดผสมแล้ว 10 กรัม
2. เติม 10% TCA 20 มิลลิลิตร ปั่นนาน 5 นาที
3. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ชะตะกอนด้วย 10% TCA 10 มิลลิลิตร
4. ปรับพีเอชสารละลายที่กรอได้ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล จนได้พีเอช 4.5-5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
5. ปิเปตสารละลายในข้อ 4 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการ

1. ปิเปตสารที่สกัด 1 มล. ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นอีก 9 มล.
2. เติม 1.5 % ammonium molybdate 1 มล. ผสมให้เข้ากัน
3. จุ่มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เติม 1% Stanous chloride และผสมให้เข้ากัน
4. ทำให้เย็นด้วยน้ำเย็นนาน 20 นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 830 nm
6. หาการดูดกลืนแสงของ working solution เช่นเดียวกับตัวอย่างตั้งแต่ข้อ 1-6 เพื่อหากราฟมาตรฐาน

การคำนวณ

ปริมาณฟอสเฟต (ppm as P) = $\frac{C \times 25 \times 50}{W \times 1 \times 1}$

หรือ ปริมาณฟอสเฟต (ppm as phosphorus pentoxide; P_2O_5) = $\frac{C \times 25 \times 50 \times 71}{W \times 1 \times 1 \times 31}$

C = ปริมาณฟอสเฟตจากกราฟมาตรฐาน

W = น้ำหนักตัวอย่าง

25/1 = dilution factor

71/31 = factor changing P to P_2O_5

ก2. การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (AOAC, 1999)

อุปกรณ์

1. hot plate
2. ตู้ดูดควัน
3. บิวเรต ขนาด 50 และ 20 มล.
4. ปิเปต ขนาด 5 และ 10 มล.
5. กระดาษกรอง Whateman No.1

สารเคมี

1. สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 นอร์มอล

2. สารละลายโพแทสเซียมไธโอไซยาเนท 0.1 นอร์มอล
3. กรดไนตริกเข้มข้น
4. 5 % Ferric alum indicator

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแน่นอนในช่วง 1-2 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่
2. เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 นอร์มอล 10-20 มิลลิลิตร เทลงไป เขย่าให้เข้ากัน
3. ต้มสารผสมในตู้ดูดควันประมาณ 10 นาที แล้วทิ้งให้เย็น
4. กรองสารละลายที่ได้ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น
5. เติมสารละลาย Ferric alum ลงไป 5 มล. แล้วไตเตรทด้วย 0.1 N KSCN จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพูอ่อน ๆ

การคำนวณ

$$\text{เกลือ (\%)} = 5.8 \times \frac{\{(\text{มล.} \times \text{N})\ AgNO_3 - (\text{มล.} \times \text{N})\ KSCN\}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

ก3. ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนที่ถูกสกัดในสารละลายที่แช่กุ้งโดยใช้ SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท

อุปกรณ์

1.หลอดทดลอง

2.นาฬิกาจับเวลา

3.Vextex mixer

4.เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1.สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA 10มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.สารไบยูเรท: ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 1.5 กรัม โซเดียมโพแตสเซียมทาเตรท 6.0 กรัม เติมน้ำจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตรกวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน

3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ10 จำนวน 300 มิลลิลิตรในขณะกวนปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

วิธีการ

1.ดูดสารละลายโปรตีน 500ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง

2.เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วย Vertex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา30นาที

3.วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเปรียบเทียมกับกราฟมาตรฐาน BSA

- การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

1. ดูดสารละลาย BSA เข้มข้น10มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจำนวน 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครลิตรเติมสารละลายไบยูเรท2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vertex mixerวางทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสตามวิธีของ Laemmli(1970)

อุปกรณ์

1.ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมินิเจล

สารเคมี

1.Acrylamide/bisacrylamide เตรียมโดยละลาย Acrylamide 29.2กรัม และ bisacrylamide 0.8ก รัมในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร100มิลลิลิตรเก็บในขวดสีชาที่ อุณหภูม 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือนหลังจากการเตรียม

2.สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น1.5โมลาร์ พีเอช8.8

3.สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น0.5โมลาร์ พีเอช6.8

4.โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)

5.Sample buffer (SDS reducing buffer)

- น้ำกลั่น3.8มิลลิลิตร

- 0.5M Tris-HCL, pH 6.8 1.0 มิลลิลิตร

- กลีเซอล์รอล 0.8 มิลลิลิตร

- 10% SDS 1.6 มิลลิลิตร

-เบต้า-เมอแคปโตเอธานอล 0.4 มิลลิลิตร

- 1% โบรโมฟีนอลบูล 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%Ammonium persulfate เตรียมก่อนที่จะใช้

- TEMED (N,N,N,N-tetramethyl ethylenedismine)

8.โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล High Molecular Weight (Sigma)ประกอบด้วย myosin.B-Galactosidade, phosphorylase b, fructose-6-phophate kinase, albumin, glutamic dehydrogenase, ovalbumin, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase มีน้ำหนักโมเลกุล 250,000 116,000 67,000 84,000 66,000 55,000 45,000 36,000 ดาลตัน ตามลำดับ

9. สีย้อมโปรตีน Coomassie Billiant Blue R-250

10. Staining Solution:ละลาย Coomassie Billiant Blue R-250 0.04 กรัมในเมทานอล 100 มิลลิลิตร, คนจนละลายหมด (20นาที) แล้วเติม Glaial Acetic acid 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร

- Destaning Solution 1: ผสมเมธานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 30 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร

- Destaing Solution 2: ผสมเมธานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 75 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่าง 3 กรัมผสมกับ 5% SDS 27 มิลลิลิตรโฮโมจิไนส์ 1 นาทีบ่มที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นวเลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายมาเหวี่ยงแยก 10,000 x g เป็นเวลา 30 นาทีนำส่วนใส่ที่ได้มาผสมกับ Sample buffer (อัตราส่วน1:1)ให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร ต้มสารผสมเป็นเวลา 4 นาที

2. การเตรียม running gel

สารเคมี	10 % gel
30 % Acrylamide/bis	1.167 ml
1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8	0.875 ml
1% SDS	0.35 ml
TEMED	5 µl

3. การเตรียม stacking gel

30 % Acrylamide/bis	0.4 ml
0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8	1.0 ml
1% SDS	0.3 ml
น้ำกลั่น	1.1 ml
0.1 M EDTA	0.8 ml
2% Ammonium persulfate	0.4 ml
TEMED	6 µl

4. การแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

ประกอบชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส จากนั้นเติมอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ ให้เต็ม chamber จากนั้น Load ตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 จำนวน 10 ไมโครลิตร ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสเข้ากับ power supply เปิดกระแสไฟฟ้า 50 โวลท์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนถึง running gel (ประมาณ 30 นาที) เปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 150 โวลท์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนจนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า

5. การย้อมสีโปรตีนในเจล โดยย้อมใน staining solution 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ด้วย Destaining solution 1 เป็นเวลา 30 นาที แล้วแช่ใน Destaining solution 2

ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ข1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1999)

อุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
2. ชุดกลั่นโปรตีน
3. ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด100 มิลลิลิตร
1. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 มิลลิลิตร
2. ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
3. บิวเรต ขนาด 25 มิลลิลิตร
4. ลูกแก้ว
5. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. กรดซัลฟุริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยา ใช้คอปเปอร์ซัลเฟต (Cu_2SO_4) 1 ส่วนต่อโปแตสเซียมซัลเฟต (N_2SO_4) 9 ส่วน
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40 (ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 (ละลายกรดบอริก 40 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร)
5. สารละลายกรดเกลือ เข้มข้น 0.02 นอร์มอล
6. อินดิเคเตอร์เป็นสารผสมระหว่างเมทิลเรด เมทิลีนบลูและโบรโมครีซอลกรีน

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหารบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม และกรดซัลฟุริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

3. ใส่ลูกแก้ว 2 เม็ด นำไปย่อยบนเตาไฟในตู้ดูดควันจนกระทั่งได้สารละลายใส ปล่อยทิ้งให้เย็น

4. เติมน้ำกลั่นร้อนลงไปล้างบริเวณคอขวดให้ทั่ว แล้วให้ความร้อนต่อไปจนเกิดควันของกรดซัลฟุริก ปล่อยทิ้งให้เย็น

5. นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างขวดย่อยโปรตีนให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. จัดอุปกรณ์กลั่น

7. นำขวดชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่จะกลั่น โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

8. ดูดสารละลายตัวอย่างด้วยปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 มิลลิลิตร

9. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มอล จะได้จุดยุติสีม่วง

10. ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2 – 10

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times N \times 1.4007 \times 6.25}{W}$$

โดยที่ A = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรด (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

14.007 = น้ำหนักสมมูลย์ของไนโตรเจน 6.25= แฟกเตอร์

ข2. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC,1999)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า
2. ภาชนะหาความชื้น (จานอลูมิเนียม พร้อมฝา)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
2. กระทำเช่นข้อ1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียด ประมาณ 1-2 กรัมใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก
6. อบซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนัก ที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น(ร้อยละ)} = 100 \times \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}$$

ข3. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC,1999)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

6. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิตซ์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

7. เผาซ้ำอีกครั้งครั้งละประมาณ30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

8. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส และกระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

ข4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC,1999)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ประกอบด้วยขวดกลม สำหรับใส่ตัวทำละลาย ซอคเลต (soxhlet) เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. สำลี

4. ตู้อบไฟฟ้า

5. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง

6. โถดูดความชื้น

วิธีการ

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอคเลต

4. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมันปริมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

5. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทซ์ ให้ความร้อน

6. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่น ด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

7. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจากซอคเลตลงในขวดกลมจนหมด

8. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

9. นำขวดหาไขมันอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

10. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{100 \times \text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

ภาคผนวกค. การตรวจสอบโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน

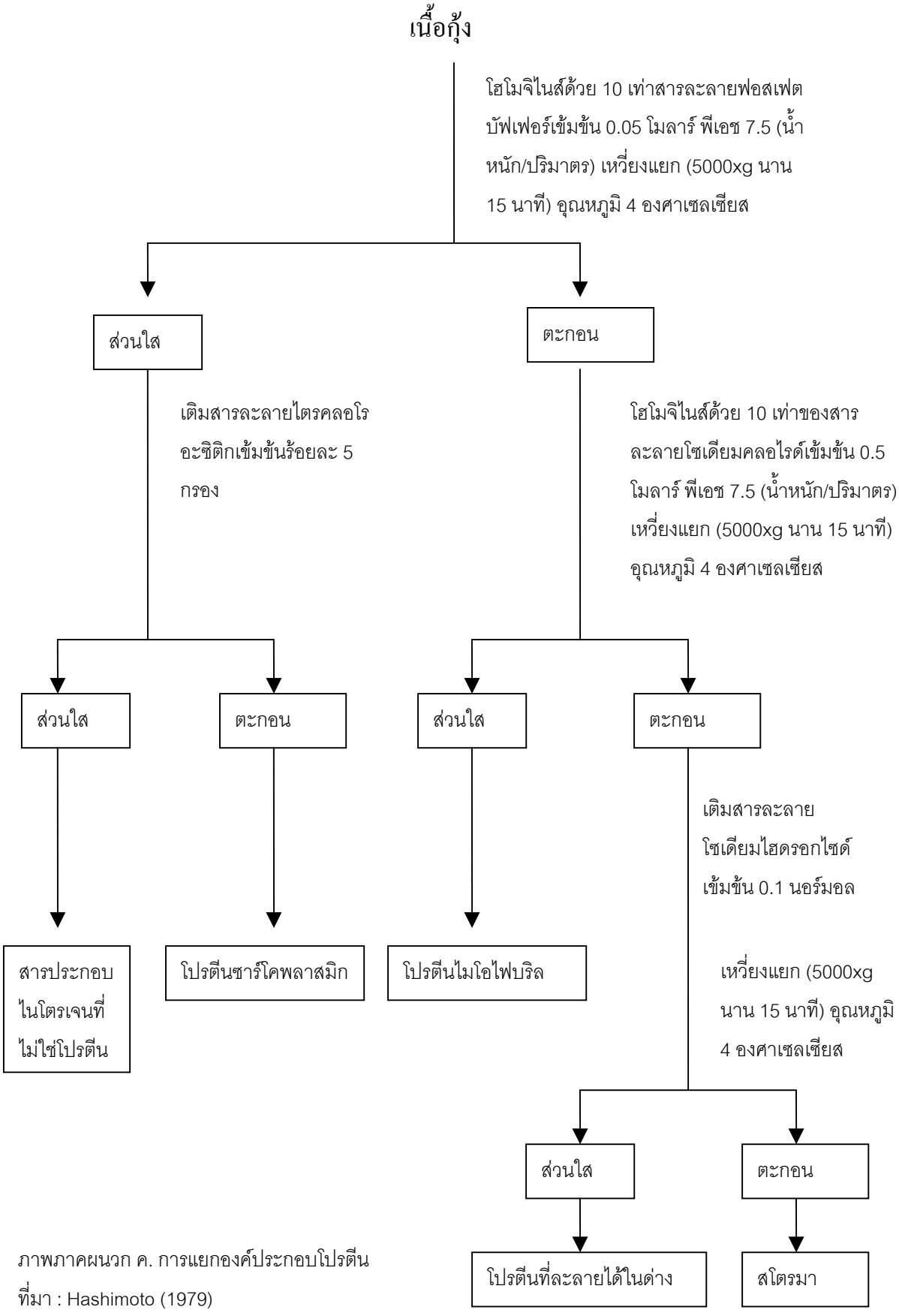
(Hashimoto *et al*., 1979)

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ
3. กระบอกตวง
4. เครื่องโฮโมจิไนส์
5. เครื่องกวนชนิดแม่เหล็กไฟฟ้าและแท่งกวนแม่เหล็ก

สารเคมี

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.5
2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.5
3. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น ร้อยละ5
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 นอร์มอล



ภาพภาคผนวก ค. การแยกองค์ประกอบโปรตีน

ที่มา : Hashimoto (1979)

ภาคผนวก ง. การวิเคราะห์ Thermal in activation rate constant (K_D)

ของแอกโตไมโอซิน (Tsai *et al*., 1989)

วิธีการ

1. สกัดแอกโตไมโอซิน
2. เจือจางแอกโตไมโอซินให้มีความเข้มข้น 10-5.0 มก. ต่อ มล.
3. บ่ม (incubation)ที่อุณหภูมิ (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 องศาเซลเซียส) และเวลา (0, 5, 10, 20, 30, 60 นาที)
4. ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
5. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
6. วิเคราะห์กิจกรรม Ca^{2+}-ATPase

การคำนวณ

$K_D = (\ln C_0 - \ln C_t)/t$

C_0 = กิจกรรม Ca^{2+}-ATPase ก่อนการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

C_t = กิจกรรม Ca^{2+}-ATPase หลังการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

t = เวลาในการบ่ม (นาที)

ภาคผนวก จ1. การวิเคราะห์กิจกรรม ATPase ของแอกโตไมโอซิน

(Benjaku, *et* al., 1997)

การสกัดแอกโตไมโอซิน

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ พีเอช 7.0
2. สารละลายโซเดียคลอไรด์เข้มข้น 1.2 โมลาร์ พีเอช 7.0

วิธีการ

1. นำเนื้อกุ้ง 4 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ พีเอช 7.0 (4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร

2. โฮโมจิไนส์นาน 4 นาที และเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5000 x g นาน 30 นาที (0 องศาเซลเซียส)
3. ตะกอนที่ได้เติมน้ำกลั่น (4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 3 เท่า โฮโมจิไนส์นาน 30 นาที และเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5000 x g นาน 20 นาที (0 องศาเซลเซียส)
4. ตะกอนที่ได้เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.2 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 1 เท่า กวนเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5000 x g นาน 20 นาที (0 องศาเซลเซียส)
5. ตะกอนที่ได้ใช้เป็นแหล่งของแอกโตไมโอซิน

วิธีการวิเคราะห์

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปต
2. หลอดทดลอง
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
4. นาฬิกาจับเวลา

สารเคมี

1. สารละลาย EGTA เข้มข้น 0.01 โมลาร์
2. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์
3. สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์
4. สารละลาย Tris maleate เข้มข้น 0.5 โมลาร์
5. สารละลาย ATP เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์
6. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 15

วิธีการ

1.ทำการเจือจางสารสกัดแอกโตไมโอซินด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ พีเอช 7.0 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.ดูดสารละลายแอกโตไมโอซินจากข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร เติม 0.5 โมลาร์ Trismaleate พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

3.เติมสารละลายต่างๆ จนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 9.5 มิลลิลิตร เพื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ATPase ดังนี้

- สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกิจกรรม Ca^{2+} ATPase
- สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกิจกรรม Mg^{2+} ATPase
- สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกิจกรรม Mg^{2+}-Ca^{2+} ATPase
- สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย EGTAเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ สำหรับการตรวจวัดกิจกรรม Mg^{2+}-EGTA ATPase

4. เติมสารละลาย ATP เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที

5.เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 15 (น้ำหนัก/ปริมาตร) 5 มิลลิลิตร

6. ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3500 x g นาน 5 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปตรวจวัดปริมาณ inorganic phosphate (Pi)

จ2. การวิเคราะห์กิจกรรม AG และ NAG (Benjakul and Bauer, 2000)

สารเคมี

1. โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.0
2. โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5
3. โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์
4. โพแทสเซี่ยมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์

5. โพแทสเซี่ยมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์
6. โพแทสเซี่ยมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์
7. 4.2 mM ρ-nitrophenyl-∝-glucopyranoside solution (std AG)
8. 1.0 mM ρ- nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamide solution (std NAG)

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่าง โดยเหวี่ยงแยกชิ้นเนื้อบางๆ (0.5-0.8 cm.)ที่ 22000 x g นาน 60 นาที
2. ใช้หลอดหยดดูดออกมา วัดปริมาตรที่ได้ หาความเข้มข้นโปรตีน วิเคราะห์กิจกรรมดังนี้

กิจกรรม AG

- ผสม โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.0 จำนวน 0.3 มล. ร่วมกับ โซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ 0.2 มล. และ ตัวอย่างที่เข้มข้น 5 มก./มล. จำนวน 1 มล.
- บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- เติม Std. AG 1 มล.
- บ่มต่อจนครบ 60 นาที
- หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.3 โมลาร์ 1 มล.
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm
- ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

กิจกรรม NAG

- ผสม โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 จำนวน 0.3 มล. ร่วมกับ โพแทสเซี่ยมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ 0.2 มล.และ ตัวอย่างเข้มข้น 2 มก. ต่อ มล. จำนวน 0.2 มล.
- เติม Std. NAG 0.2 มล.
- บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- หยุดปฏิกิริยาด้วย โพแทสเซี่ยมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.3 โมลาร์ 1 มล.
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm

คำนวณหาปริมาณ AG และ NAG

จ3. การวิคราะห์การละลาย (Xiong *et al*., 2000)

สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์
2. 50 % TCA และ 10% TCA
3. KCl 0.6 M (เย็น)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างกุ้ง 1 กรัม บดใส่ในภาชนะขนาด 100 มล.
2. เติม 0.6 M KCl ที่เย็น 19 มล. จนได้ปริมาตร 20 มล.
3. โฮโมจีไนส์ นาน 1 นาที
4. คนผสมที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง
5. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4
6. เหวี่ยงแยกที่ 8500 x g นาน 30 นาที
7. นำส่วนใสมา 10 มล. เติม 50% TCA 2 มล. คนผสมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง
8. เหวี่ยงแยกที่ 8500 x g นาน 30 นาที ใน microtube แล้วแยกส่วนใสออก
9. เติม 10 % TCA ที่เย็นลงไป 5 มล. เหวี่ยงแยก 5 นาที
10. ละลายตะกอนด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ 5 มล.
11. วัดหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี ไบยูเรท

การคำนวณ

ค่าการละลาย = (100 x)/y

x = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

y = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จ4. การวิเคราะห์หมู่ซัลฟ์ไฮดริล (Ellman, 1959)

สารเคมี

1. Tris –HCl buffer 0.2 M พีเอช 6.8
2. DTNB 0.1 % พีเอช 7.2

3. KCl 0.6 M พีเอช 7.0

วิธีการ

1. นำแอกโตไมโอซิน 1 มล. (ความเข้มข้น 4 มก./มล.)ผสมกับ Tris-HCl buffer 0.2 M พีเอช 6.8 ปริมาตร 9 มล.
2. นำสารละลายผสมมา 4 มล. เติม 5,5’ dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 0.1 % ปริมาตร 0.4 มล.
3. บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที
4. วัดการดูดกลืนแสงที่ 412 nm
5. วิเคราห์ blank โดยใช้ KCl 0.6 M พีเอช 7.0 แทนตัวอย่าง

การคำนวณ

ปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริล = (OD x M)/13600

M = mol/1000ml

จ5. การวิเคราะห์ไดซัลไฟด์ (Thanhanser *et al*., 1987)

สารเคมี

1. Ellman’ reagent
2. 1 M Na2SO3
3. 2M guanidine thiocyanate
4. 50 mM sodium sulfide
5. 3 mM EDTA
6. 50 mM glycine

วิธีการ

1. เตรียม Ellman’ reagent
2. ปิเปตแอกโตไมโอซิน 100 ไมโครลิตร ผสมกับใน 2,4,4,6 trinitrobenzene sulforic acid (TNBS) 3 มล.
3. บ่มที่มืด 25 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 412 nm

5. วิเคราะห์ blank โดยใช้น้ำแทนตัวอย่าง

การคำนวณ

ปริมาณไดซัลไฟด์ = OD/13900

จ6. การวิเคราะห์ไฮโดรโฟบิซิตี้บริเวณพื้นผิว (Benjakul *et al*., 1997)

สารเคมี

1. 10 mM phosphate buffer พีเอช 6.0 ใน 0.6 M NaCl
2. 8 mM ANS (1-anilinonaphthalen-8-sulfonic acid)

วิธีการ

1. เจือจางแอกโตไมโอซินด้วย 10 mM phosphate buffer พีเอช 6.0 ใน 0.6 M NaCl ให้ได้ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 มก./มล. ปริมาตร 4 มล.
2. นำตัวอย่างมา 2 มล.
3. บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
4. เติม 8 mM ANS 20 ไมโครลิตร
5. วัดความเข้มแสงโดยใช้ Fluorometer ที่ excitation 374 nm และ emission 485 nm
6. คำนวณปริมาณไฮโดรโฟบิซิตี้จากกราฟ