

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายสำหรับการทำ SDS – PAGE

40% Acrylamide : Bis Solution (37.5 : 1)

Acrylamide 20 กรัม

Bis-Acrylamide 0.53 กรัม

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย Deionized H₂O

4X Separating Gel Buffer

Tris (FW = 121.1) 36.3 กรัม

Deionized H₂O 150 มิลลิลิตร

ปรับ pH สารละลายเท่ากับ 8.8 ด้วย Hydrochloric Acid เข้มข้น

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วย Deionized H₂O

เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4°C ได้นาน 3 เดือน

4X Stacking Gel Buffer

Tris (FW = 121.1) 15.1 กรัม

Deionized H₂O 40 มิลลิลิตร

ปรับ pH สารละลายเท่ากับ 6.8 ด้วย Hydrochloric Acid เข้มข้น

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย Deionized H₂O

เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4°C ได้นาน 3 เดือน

10% Ammonium Persulphate

Ammonium Persulphate 0.1 กรัม

Deionized H₂O 1 มิลลิลิตร

ควรใช้ทันที

5X Electrophoresis Buffer (pH 8.3)

Glycine 72 กรัม

Tris (FW = 121.1) 15.15 กรัม

10% Sodium Dodecyl Sulphate 5.0 มิลลิลิตร

ละลายด้วย Deionized H₂O ปรับ pH เท่ากับ 8.3 ด้วย Hydrochloric Acid เข้มข้น
ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตรด้วย Deionized H₂O

Sample Buffer

0.5 M Tris-HCl Buffer pH 6.8	1.2 มิลลิลิตร
10% Sodium Dodecyl Sulphate	2.0 มิลลิลิตร
10% Glycerol	0.5 มิลลิลิตร
0.5% Bromophenol Blue	0.05 มิลลิลิตร
Deionized H ₂ O	4.8 มิลลิลิตร

ผสม β -Mercaptoethanol 50 ไมโครลิตรใน Sample Buffer 0.95 มิลลิลิตรก่อนใช้
(ผสมสารตัวอย่าง : Sample Buffer ในอัตราส่วน 3 : 1)

Staining Solution

Commasie Brilliant Blue R-250	0.5 กรัม
Methanol	200 มิลลิลิตร
Acetic Acid	50 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 500 มิลลิลิตรด้วย Deionized H₂O

Destaining Solution

15% Methanol
10% Acetic acid

ตารางที่ 32 การเตรียม 10% Separating Gel 10 ml

สารเคมี	ปริมาตร (มล.)
40% Acrylamide : Bis Solution (37.5 : 1)	2.0
4X Separating Gel Buffer	2.0
Deionized H ₂ O	5.0
10% Ammonium Persulphate	0.04
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-Ethylenediamine)	0.008

ตารางที่ 33 การเตรียม Stacking Gel 4 ml

สารเคมี	ปริมาตร (มล.)
40% Acrylamide : Bis Solution (37.5 : 1)	0.4
4X Separating Gel Buffer	1.0
Deionized H ₂ O	2.55
10% Sodium Dodecyl Sulphate	0.05
10% Ammonium Persulphate	0.02
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-Ethylenediamine)	0.005

การเตรียมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

A : 2% Sodium Carbonate (Na₂CO₃) ใน 0.1 M Sodium Hydroxide (NaOH)

B : 1% Copper (II) Sulphate (CuSO₄)

C : 2% Sodium Potassium Tartrate

ผสม A : B : C ในอัตราส่วน 100 : 1 : 1

การเตรียมสารละลาย Folin - Ciocalteu's phenol Reagent

นำสารละลาย Folin - Ciocalteu's Phenol Reagent เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 : 1

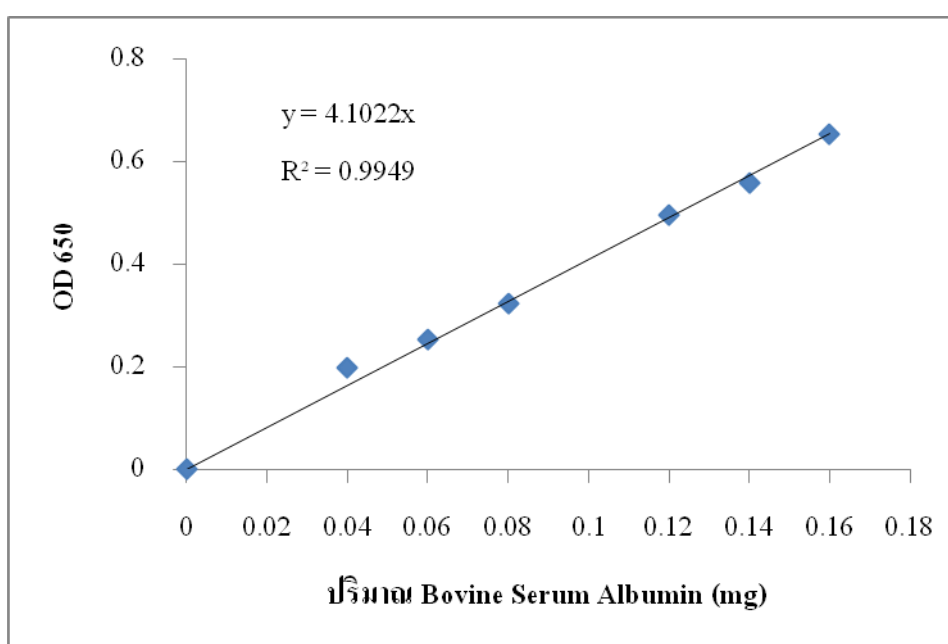
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก Lowry, et al. (1951 : 265 - 275))

นำสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนมาผสมกับสารละลาย Alkaline Copper ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตรวางไว้ที่อุณหภูมิ 10 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย Folin - ciocalteu's Phenol Reagent

reagent ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องอีกครั้งเป็นระยะเวลา 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา คำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่าง โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA) ดังตารางที่ 34 และภาพที่ 48

ตารางที่ 34 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรของสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0.4 - 1.6 mg/mL

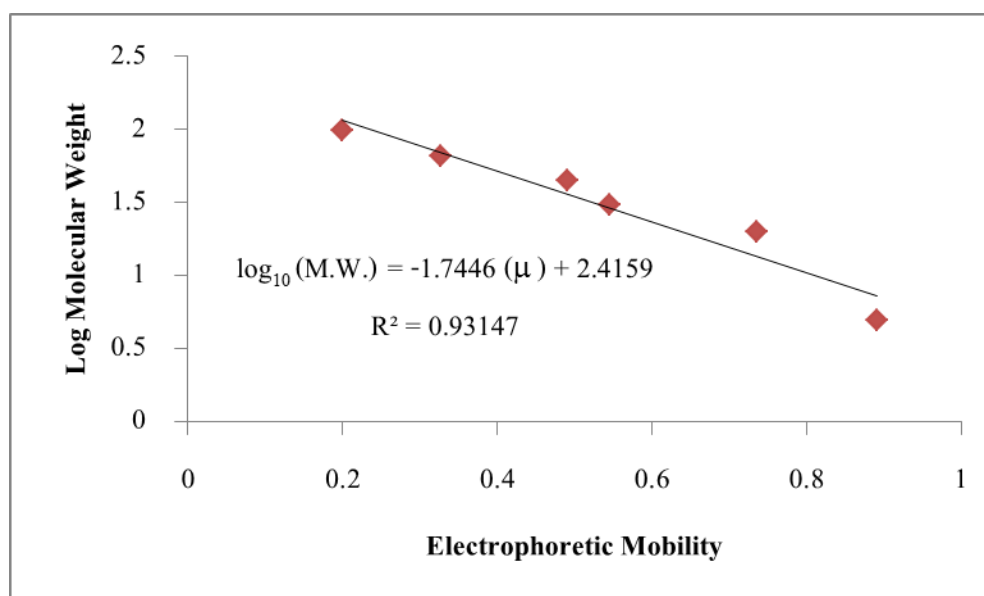
ปริมาณโปรตีน (mg)	OD 650
0.04	0.200
0.06	0.254
0.08	0.325
0.12	0.497
0.14	0.56
0.16	0.655



ภาพที่ 48 กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

ตารางที่ 35 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐาน	ระยะทางเคลื่อนที่ (cm)	ค่า Electrophoretic Mobility (μ)	Molecular Weight (kDa)
Phophorylase b	1.10	0.200	97.0
Albumin	1.80	0.327	66.0
Ovalbumin	2.70	0.491	45.0
Carbonic Anhydrase	3.00	0.545	30.0
Trypsin inhibitor	4.05	0.736	20.1
α -Lactalbumin	4.90	0.891	14.4



ภาพที่ 49 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log Molecular Weight และ
ค่า Electrophoretic Mobility (μ) ของโปรตีนมาตรฐาน