

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 สารเคมีและอุปกรณ์

2.1.1 สารเคมี

<u>ชื่อสารเคมี</u>	<u>บริษัทผู้ผลิต</u>
Acetic acid	Merck
Acetone	Riedel-de häenag
Acetyl-tryptophan ethyl ester (ATpEE)	Sigma
Acetyl-tyrosine ethyl ester (ATEE)	Sigma
Acrylamide	Sigma
Agarose	Sigma
Alcalase	Novo
Amastatin	Sigma
Ammonium oxalate	J.T. Baker
Ammonium persulphate	Merck
Azocasein	Sigma
Bacto-agar	Difco
Benzoyl-arginine ethyl ester (BAEE)	Sigma
N- α -Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA)	Sigma
Bestatin	Sigma
Blue dextran	Sigma
Bovine serum albumin	Sigma
Bromophenol blue	Fluka
Calcium chloride dihydrate	Merck
Calcium sulphate dihydrate	BDH
Carbonic anhydrase	Sigma
Casein	Merck
Crystal violet	Fluka
Dipotassium hydrogenphosphate	Merck

<u>ชื่อสารเคมี</u>	<u>บริษัทผู้ผลิต</u>
Disodium hydrogenphosphate	Fluka
Dithiothreitol	Merck
EDTA disodium salt	Merck
Ethanol	Merck
Ethanolamine	Fluka
Ferric (III) citrate	BDH
Ferric chloride hexahydrate	BDH
Formaldehyde	Merck
3-(2-Furylacryloyl)-glycyl-L-leucine amide (FAGLA)	Sigma
Gelatin	Aldrich
Glutaldehyde	Fluka
Glycerol	Fluka
Glycine	Merck
Hemoglobin	Difco
Hydrochloric acid	May&Baker
Iodine	Carlo Erba
L-Leucine	Fluka
Leupeptin	Sigma
Lysozyme	Sigma
Magnesium chloride hexahydrate	BDH
Metalloprotease Type IX	Sigma
Mercaptoethanol	Fluka
Methanol	BDH
N,N'-Methylene-bis-acrylamide	Sigma
Nutrient broth	Merck
Nitrilotriacetic acid (Titriplex I)	Merck
Nitrogen 99.99%	GFO
Ovalbumin	Sigma
Pepsin	Sigma
1,10-Phenanthroline	Sigma

<u>ชื่อสารเคมี</u>	<u>บริษัทผู้ผลิต</u>
L-Phenylalanine methyl ester (PME)	Sigma
Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma
Phosphoramidon	Sigma
Phosphoric acid	Analyticals
Polybuffer exchanger (PBE 94)	Sigma
Polybuffer 74	Sigma
Polybuffer 96	Sigma
Potassium dihydrogenphosphate	Merck
Potassium iodide	Carlo Erba
Protease จาก <i>Thermus</i> S2	ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ มช.
Protein marker (M-3913)	Sigma
For electrophoresis (BSA, Ovalbumin, Glyceralde-3-Phosphate Dehydrogenase, Carbonic Anhydrase, Trypsinogen, Trypsin Inhibitor, α -Lactalbumin, Aprotinin)	
For isoelectric focusing (Amyloglucosidase, Trypsin Inhibitor, β -Lactoglobulin A, Carbonic Anhydrase I and II, Myoglobin, Lentil Lectin, Trypsinogen)	Sigma
Riboflavin-5'-phosphate	Sigma
Safranin O	Fluka
Sephadex G-75 (Fine)	Pharmacia
Sephadex G 100-200	Fluka
Silver nitrate	Merck
Skim milk	Difco
Sodium acetate	Merck
Sodium carbonate anhydrous	Fluka
Sodium chloride	Merck
Sodium dihydrogenphosphate	BDH
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Fluka

<u>ชื่อสารเคมี</u>	<u>บริษัทผู้ผลิต</u>
Sodium hydroxide	Merck
Soybean powder Type I (non-roasted)	Sigma
Sucrose	มิตรผล
N,N,N',N'-Tetramethylenediamine	BDH
p-Tosyl-L-arginine methyl ester (TAME)	Sigma
Trichloroacetic acid	Merck
Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)	Sigma
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Merck
Tryptone	Difco
L-tyrosine	Fluka
Yeast extract	Difco
Zinc chloride	Fluka

2.1.2 จุลินทรีย์

แบคทีเรีย F13, TLS 43 และ P2 จากห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

<u>ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์</u>	<u>บริษัทผู้ผลิต</u>
Appendorf filtration	Sigma
Autoclave	Hirayama
Camera	Minolta
Centrifuge, refrigerate, Model 6800	Kubota
Circulation bath	Lauda
Electrophoresis sets	
- Chamber	Hoefer
- Power Supply Model 250	BRL
Fraction collector	Bio-Rad
Hot plate and stirrer	Corning
Incubator	Memert
Incubator, shaker	GFL

ชื่อเครื่องมือและอุปกรณ์บริษัทผู้ผลิต

Isoelectric focusing sets

- Gel support polyacrylamide (125x65 mm)
- Mini IEF Cell Model 111
- Power Supply Model 1000/500

Bio-Rad

Bio-Rad

Bio-Rad

Laminar Flow

Nuairie

Lyophilizer, Flexi-Dry MP

FTS Systems

Microcentrifuge Model 101-S

Sigma

Microscope attach with camera

Olympus

Oven

Memert

pH meter

Radiometer

Pipet, adjustable micropipet

Biohit

Pump, peristaltic

Pharmacia

Shaker end to end

Stuart Scientific

Spectrophotometer UV-265

Shimadzu

Spectrophotometer UV-VIS Model PU 8625

Phillips

Ultrafiltration

- Unit, Model UHP-75

Cole-Palmer

- Membrane

Millipore

2.2 วิธีการทดลอง**2.2.1 การเลือกแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีนสูงที่สุด**

แบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ F13, TLS43 และ P2 ที่ผลิตโปรตีนส่งออกนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 ให้ผลผลิตโปรตีนเท่ากับ 0.684, 0.512 และ 0.048 UA/ลบ.ซม.⁽¹²⁾ ซึ่งค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับโปรตีนจากเทอร์โมไฟล์ชนิดอื่น ดังนั้นจึงได้นำแบคทีเรียเหล่านี้มาศึกษาการผลิตโปรตีนในอาหารเหลวเปรียบเทียบกัน เพื่อเลือกเทอร์โมไฟล์ที่มีแอกติวิตีมากที่สุด ทั้งนี้เพื่อนำไปให้เตรียมโปรตีนในการศึกษาต่อไป

2.2.1.1 การเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนของเชื้อ F13, TLS43 และ P2

ก. วิธีเตรียมสารละลายอาหาร⁽⁸⁾

เตรียมสารละลายเบสผสมซึ่งประกอบด้วย Titriplex I 1.0 กรัม $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 กรัม $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.0 กรัม 0.01 M Ferric (III) citrate 5.0 ลบ.ซม. และ NaOH 0.2 กรัม ละลายในน้ำ 950 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 7.2 ด้วย 6 M NaOH แล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร และเติมสิ่งสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) และทริปไทโอน (Tryptone) อย่างละ 1 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 1 กก./ลบ.ซม.² ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 20 นาที

ข. วิธีเก็บเชื้อจุลินทรีย์ด้วยอาหารวุ้น⁽⁹⁾

เตรียมอาหารวุ้นโดยผสม Nutrient broth 0.8 กรัม และ Bacto-agar 2.5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 ลบ.ซม. นึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับอาหารเหลว ตั้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50°C เทลงในจานอาหารหรือขวดสำหรับเก็บเชื้อ ซึ่งวางใน Laminar flow ที่ฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลตอย่างน้อย 20 นาทีก่อนใช้งาน ตั้งจานอาหารและขวด (วางเอียง) ไว้ที่อุณหภูมิห้องจนวุ้นแข็งตัวแล้วจึงเก็บอาหารวุ้นไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ F13, TLS 43 และ P2 เพื่อใช้ตลอดการวิจัย

ค. วิธีเตรียมหัวเชื้อ⁽⁹⁾

ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละครั้ง ได้เตรียมหัวเชื้อก่อนโดยเชี่ยเชื้อประมาณครึ่ง loop จากอาหารวุ้น ใส่ลงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปไทโอนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสม ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิ 65°C ใน shaker incubator ที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ง. วิธีเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตโปรตีน

เติมหัวเชื้อ 100 ลบ.ซม. ลงในสารละลายอาหารจากข้อ ก. 900 ลบ.ซม. ทำการเลี้ยงเชื้อใน shaker incubator ที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 65°C เก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปวัดการเจริญเติบโตโดยวัดความขุ่นของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และแยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงโดยปั่นที่ 4,500xg ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บสารละลายใสส่วนบนไปตรวจหาแอกติวิตีโปรตีน

2.2.1.2 วิธีหาแอกติวิตีโปรตีนโดยการไฮโดรไลส์เอไมเคส⁽³⁴⁾

ก. วิธีเตรียมสารละลาย

0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 5mM CaCl_2 เตรียมโดยชั่ง Tris 1.21 กรัม ละลายน้ำ 450 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 7.2 ด้วย 6 M HCl เติม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.37 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 500 ลบ.ซม. ด้วยน้ำกลั่น

0.2% เอโซเคซีน เตรียมโดยชั่งเอโซเคซีน 0.2 กรัม ละลายใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 5mM CaCl_2 ปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม. เก็บสารละลายนี้ไว้ที่ 10°C และใช้ภายใน 1 สัปดาห์

10% Trichloroacetic acid (TCA) เตรียมโดยชั่ง TCA 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

0.5 M NaOH เตรียมโดยชั่ง NaOH 2.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

ข. วิธีหาแอกติวิตีของโปรตีน⁽³⁴⁾

ใส่ 0.2% เอโซเคซีนลงในหลอดทดลอง 2 หลอด ๆ ละ 1.0 ลบ.ซม. แล้วนำไปอุ่นที่ 65°C เมื่อครบ 5 นาทีให้เติมสารละลายเอนไซม์ 0.50 ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 1 แล้วอุ่นหลอดทั้งสองต่อไปที่อุณหภูมิเดิมพร้อมเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้สารละลายเย็นลงอย่างรวดเร็วและเติม 10% TCA 2 ลบ.ซม. ลงในหลอดทั้งสองทันที และเติมสารละลายเอนไซม์เดียวกัน 0.50 ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 2 เขย่าหลอดทดลองทั้งสองทันที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แยกตะกอนออกโดยเซนตริฟิวส์ที่ 3,000xg เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายใสออกมาสวมกับ 0.5 M NaOH ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร (A_{440}) โดยให้สารละลายในหลอดที่ 2 เป็นสารละลายเปรียบเทียบ นำค่านี้ไปคำนวณหาแอกติวิตีของโปรตีน

กำหนดให้ 1 หน่วยโปรตีนในหน่วย UA คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอน และให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ต่อหนึ่งหน่วยชั่วโมง

2.2.1.3 วิธีหาแอกติวิตีโปรตีนโดยการไฮโดรไลสเคซีน⁽³⁴⁾

ก. วิธีเตรียมสารละลาย

0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่มี 5 mM CaCl_2 เตรียมโดยชั่ง Tris 1.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 7.0 ด้วย 6 M HCl เติม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.37 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 500 ลบ.ซม.

1% เคซีน เตรียมโดยชั่งเคซีน 1.0 กรัม ละลายใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่มี 5 mM CaCl_2 ให้ปริมาตรครบ 100 ลบ.ซม.

10% TCA เตรียมโดยชั่ง TCA 10.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 ลบ.ซม.

ข. วิธีหาแอกติวิตีของโปรตีน⁽³⁴⁾

ใส่ 1% เคซีนลงในหลอดทดลอง 2 หลอด ๆ ละ 1.0 ลบ.ซม. นำไปอุ่นที่ 65°C 5 นาที เติม

สารละลายเอนไซม์ 0.50 ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 1 แล้วอุ่นสารละลายต่อไปที่อุณหภูมิเดิมพร้อมกับเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว เติม 10% TCA ลงในหลอดทดลองทั้งสองหลอด ๆ ละ 2.0 ลบ.ซม. แล้วเติมสารละลายเอนไซม์เดียวกัน 0.50 ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 2 เขย่าหลอดทั้งสองแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มา เซนติฟิวจ์ที่ 3,000xg เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร (A_{275}) โดยให้สารละลายจากหลอดที่ 2 เป็นสารละลายเปรียบเทียบกับ ค่าวนหาแอกติวิตีของโปรตีนจาก A_{275}

ค. วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

เตรียมสารละลายไทโรซีนเริ่มต้น 100 ไมโครกรัมต่อ ลบ.ซม. และเจือจางให้มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 ไมโครกรัมต่อ ลบ.ซม. โดยใช้สารละลายไทโรซีนเริ่มต้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 4.5 ลบ.ซม. ผสมกับน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 5 ลบ.ซม. วัด A_{275} ส่วนสารละลายไทโรซีนเข้มข้นมากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อ ลบ.ซม. เตรียมโดยละลายไทโรซีน 1.250 มก. ในน้ำให้ปริมาตรครบ 25 ลบ.ซม. และอุ่นที่ 40°C 5 นาที เพื่อให้ไทโรซีนละลายจนหมด เจือจางสารละลายนี้ในขณะที่อุ่น ๆ โดยใช้ปริมาตร 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ลบ.ซม. ผสมกับน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 5 ลบ.ซม. วัด A_{275} เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง A_{275} กับความเข้มข้นของไทโรซีน

2.2.2 วิธีตรวจรูปร่างลักษณะและชนิดกรัมของแบคทีเรีย F13

จากการศึกษาการผลิตโปรตีนพบว่า F13 และ TLS 43 ผลิตโปรตีนส่งออกนอกเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน (530-578 UA/ลิตร) ในการศึกษาต่อไปนี้ได้เลือกใช้แบคทีเรีย F13 ส่วน TLS 43 นั้น มีผู้อื่นศึกษาอยู่แล้ว ดังนั้นในเบื้องต้นของการศึกษานี้จึงได้ตรวจรูปร่างลักษณะของแบคทีเรีย F13

ก. วิธีเตรียมสารละลาย⁽³⁵⁾

Crystal violet เตรียมโดยผสมสารละลาย ก. (crystal violet 2 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล 20 ลบ.ซม.) และสารละลาย ข. (แอมโมเนียม ออกซาลาเลท 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80.0 ลบ.ซม.) เก็บไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง

สารละลาย Gram's iodine เตรียมโดยชั่งไอโอดีน 1 กรัม และโปตัสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 ลบ.ซม. เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

Decolorizer ใช้ acetone

Safranin O เตรียมโดยชั่ง safranin O 2.5 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล 100.0 ลบ.ซม. ผสมสารละลายนี้ 10 ลบ.ซม. กับน้ำกลั่นปริมาตร 90 ลบ.ซม. ก่อนนำไปใช้

ข. การย้อมสีแบบแกรม⁽³⁵⁾

หยดน้ำกลั่น (หยดเล็ก ๆ) บนแผ่นสไลด์ จากนั้นใช้เข็มเย็บเชื้อ (Sterile needle) และสารละลายน้ำเลี้ยงที่เลี้ยงในสารละลายอาหาร 16-18 ชั่วโมง ผสมกับหยดน้ำแล้วเกลี่ยเป็นแผ่นบาง ๆ ตั้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนแผ่นสไลด์โดยผ่านสไลด์บริเวณที่ได้เกลี่ยเชื้อไว้บนเปลวไฟ 3-4 ครั้ง จุ่มสไลด์ลงในสารละลาย crystal violet ตั้งไว้ 10 วินาที ล้างแผ่นสไลด์โดยผ่านกระแสน้ำประปาเบา ๆ หลังจากนั้นราดด้วยสารละลาย Gram's iodine และแช่ไว้ 10 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา เอียงสไลด์ในอ่างน้ำ หยด decolorizer 4-5 หยด แล้วล้างออกด้วยน้ำ จุ่มสไลด์ลงในสารละลาย safranin ตั้งไว้ 10 วินาที ล้างด้วยน้ำและซับน้ำออกให้แผ่นสไลด์แห้ง ตรวจรูปร่างของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่าและถ่ายรูปผ่านเลนส์กล้องจุลทรรศน์

2.2.3 การทำปฏิกิริยาโปรตีนจากแบคทีเรีย F13

ในการศึกษาสมบัติของโปรตีนจากแบคทีเรีย F13 นั้น เตรียมสารละลายโปรตีนโดยใช้หัวเชื้อของ F13 ปริมาตร 100 ลบ.ซม. เลี้ยงในอาหาร 900 ลบ.ซม. ซึ่งประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 ที่อุณหภูมิ 65°C พร้อมกับเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์ออกโดยเซนติฟิวจีที่ 4,500xg 4°C เป็นเวลา 20 นาที และแยกเก็บสารละลายใสซึ่งเป็นสารละลายโปรตีน

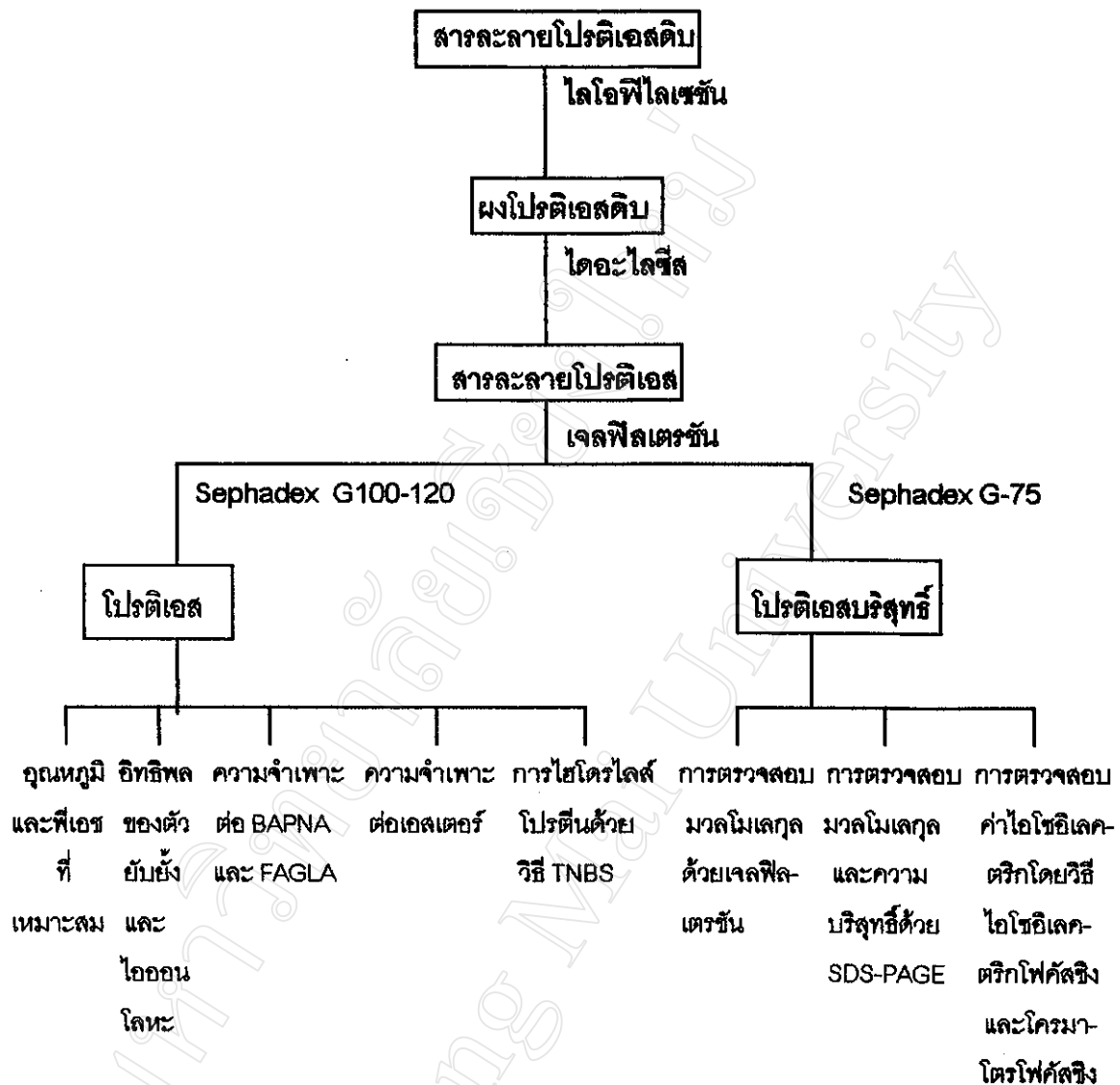
การทำโปรตีนให้เข้มข้นเพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยานั้น ได้ทำให้สารละลายโปรตีนแห้งโดยไลโอไฟไลเซชัน ทำให้ได้ผงโปรตีน จากนั้นจึงทำไดอะไลซิสผงโปรตีนก่อนที่จะทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ของ Sephadex G 100-120 และ G -75 โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากคอลัมน์แต่ละชนิดถูกนำไปตรวจสอบสมบัติต่าง ๆ ดังรูป 2.1 ปริมาณโปรตีนที่ได้ในแต่ละขั้นตอนของการทำปฏิกิริยาวีเคราะหโดยวิธี Bradford (ข้อ 2.2.3.1) ส่วนแอกติวิตีของโปรตีนนั้นตรวจสอบโดยใช้เอซเคซีนเป็นสับสเตรท (ข้อ 2.2.1.2)

2.2.3.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ก. วิธีเตรียมสารละลาย

สารละลายสีย้อม เตรียมโดยชั่ง Coomassie brilliant blue G-250 0.1 กรัม ละลายใน 95% เอทานอลปริมาตร 50 ลบ.ซม. และเติม 85% กรดฟอสฟอริก (w/v) 100 ลบ.ซม. ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ความเข้มข้นสุดท้ายของ Coomassie brilliant blue G-250 เท่ากับ 0.01% (w/v) เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ ลบ.ซม. เตรียมโดยชั่ง BSA 0.0010 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 10 ลบ.ซม.



รูป 2.1 แผนผังขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โปรตีนจากแบคทีเรีย F13 และการทดสอบสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์

ข. วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน⁽³⁶⁾

นำหลอดทดลองมา 11 หลอดใส่สารละลาย BSA 100 ไมโครกรัมต่อ ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 2-11 เท่ากับ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นให้แต่ละหลอดมีปริมาตรครบ 0.50 ลบ.ซม. เติมสารละลาย Coomassie หลอดละ 1.0 ลบ.ซม. เขย่าสารละลายแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 ซึ่งมีน้ำกลั่น 0.50 ลบ.ซม. และสารละลายสีย้อม 1.0 ลบ.ซม. เป็นสารละลายเปรียบเทียบ นำค่า A_{595} ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานโปรตีนระหว่างค่า A_{595} กับปริมาณโปรตีน

ค. วิธีหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง

ทำการทดลองควบคู่กับข้อ ข. โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 0.05 ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 0.45 ลบ.ซม. นำหลอดที่ 2 มาใส่น้ำกลั่น 0.50 ลบ.ซม. เติมสารละลาย Coomassie brilliant blue 1.0 ลบ.ซม. ลงในหลอดทั้งสอง เขย่าสารละลายและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัด A_{595} เปรียบเทียบกับสารละลายหลอดที่ 2 เพื่อหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

2.2.3.2 วิธีทำสารละลายโปรตีนให้แห้งโดยวิธีไลโอไฟไลเซชัน

ใช้สารละลายโปรตีน 300 ลบ.ซม. ใส่ลงในขวด ทำสารละลายให้กลายเป็นแผ่นน้ำแข็งเคลือบติดผนังภายในภาชนะ บรรจุในเครื่อง Freezer (รูป 2.2 ก.) แล้วระเหิดน้ำออกโดยเครื่อง Lyophilizer (รูป 2.2 ข.) โดยสวมขวดเข้ากับส่วนที่ทำให้เกิดสุญญากาศแล้วเปิดระบบสุญญากาศให้เริ่มทำงาน ความดันในระบบลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งคงที่ที่ 100 มิลลิเมตรปรอท น้ำจากน้ำแข็งจะค่อย ๆ ระเหิดออกจากสารละลาย สารตัวอย่างจะแห้งสนิทเมื่อใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ซึ่งสังเกตได้จากไม่มีหยดน้ำเกาะข้างขวด และอุณหภูมิของขวดสารตัวอย่างจะใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง ปิดระบบสุญญากาศ อีกสักครู่จึงค่อย ๆ ถอดขวดสารตัวอย่างออกจากเครื่อง เก็บผงโปรตีนใส่ขวดปิดฝาให้สนิท ชั่งน้ำหนักและเก็บที่ 4°C เพื่อใช้ในการทดลอง

2.2.3.3 ไดอะไลซิส

ละลายผงโปรตีน 1 กรัม ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. ลงในถุงไดอะไลซิสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11.5 มม. ที่มี MW cut-off 3,500 แล้วแช่ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่อุณหภูมิ 4°C (รูป 2.3) เปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายที่ได้จากการไดอะไลซิสมีปริมาตร 12.6 ลบ.ซม. นำไปหาแอกติวิตีของโปรตีนและปริมาณโปรตีนโดยใช้สารละลายเอนไซม์ 20 ไมโครลิตร

2.2.3.4 การทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 และ G-75

สารละลายโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรีย F13 886 ลบ.ซม. ได้ถูกทำให้เป็นผงโดยไลโอไฟไลเซชัน ได้ผงโปรตีน 3.535 กรัม เพื่อใช้ตลอดการทดลอง การทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วยเจลฟิเลเทรชันได้ใช้สารละลายของผงโปรตีนเข้มข้น 0.1% ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ซึ่งไดอะไลส์ก่อนทำการแยกด้วยเจลฟิเลเทรชันทั้งหมด 11 ครั้ง

ก. การเตรียมสารละลาย

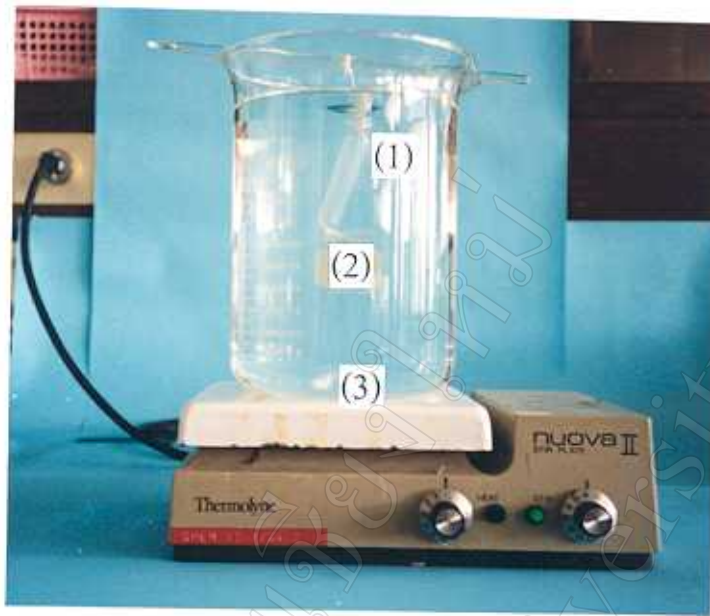
0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 5 mM CaCl_2 เตรียมโดยชั่ง Tris 2.42 กรัม ละลายน้ำกลั่น 900 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 7.2 ด้วย 6 M HCl เติม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.74 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร



รูป 2.2 (ก) การทำสารละลายโปรตีนให้แข็งตัวในขวด (1) ซึ่งหมุนอยู่ในสารละลายเอทานอลที่เย็นจัดในเครื่อง Freezer (2)



รูป 2.2 (ข) การระเหิดน้ำออกจากสารละลายโปรตีนในระบบที่เป็นสุญญากาศของเครื่อง Lyophilizer ซึ่งมีสวิตช์ปิด-เปิดเครื่อง (1) ปุ่มให้เครื่องทำงาน (2) ปุ่มช่วยละลายน้ำแข็ง (3) จอแสดงอุณหภูมิและความดันของเครื่อง (4) ท่อสำหรับต่อเข้ากับขวดสารตัวอย่าง (5) และถาดสำหรับรองน้ำที่เกาะข้างขวดสารตัวอย่าง (6)



รูป 2.3 การไดอะไลซิสสารละลายโปรตีน (1) ซึ่งจะแพร่ผ่านถุงไดอะไลซิสเข้ามาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (2) โดยการกวนสารละลายบัฟเฟอร์ด้วย magnetic bar (3)

เจลสำหรับคอลัมน์ เตรียมโดยแช่เจลแห้ง (Sephadex G-75 หรือ G100-120) 10 กรัม ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 5 mM CaCl_2 ปริมาตร 250 ลบ.ซม. เป็นเวลา 1 คืน จนกระทั่งเม็ดเจลพองตัวเต็มที่ แล้วใส่กากออกจากเม็ดเจลให้หมดด้วยปั้มน้ำ (water pump)

สารละลาย Blue dextran เตรียมโดยชั่ง Blue dextran 0.0010 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 ลบ.ซม.

สารละลาย Bromophenol blue เตรียมโดยชั่ง Bromophenol blue 0.0010 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 ลบ.ซม.

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA, Ovalbumin, Carbonic anhydrase และ Lysozyme เตรียมโดยชั่งโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด ๆ ละ 0.0010 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1.0 ลบ.ซม.

สารละลายโปรตีนตัวอย่าง ละลายผงโปรตีน 1 กรัม ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. ทำไดอะไลซิสสารผสมนี้ในสารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ข. การเตรียมคอลัมน์ Sephadex

ตั้งคอลัมน์แก้วขนาด 1.5x60 ซม. ใส่ 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 5 mM CaCl_2 10 ลบ.ซม. ใช้ใยแก้วชุบบัฟเฟอร์แล้วใส่ลงในคอลัมน์ เทเจล Sephadex (G-75 หรือ G 100-120) ที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ช้า ๆ พร้อมกับปล่อยให้สารละลายบัฟเฟอร์ไหลออกจากคอลัมน์ เติมน้ำกลั่น

เจลต่อไปจนได้ความสูงในคอลัมน์ 50 ซม. ปิดผิวหน้าเจลด้วยกระดาษกรอง ป้อนสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ผ่านคอลัมน์เจลด้วยอัตราเร็ว 12 ลบ.ซม./ชม. เพื่อให้คอลัมน์เจล อยู่ในสภาวะสมดุล

ผสมสารละลาย Blue dextran และ Bromophenol blue อย่างละ 0.25 ลบ.ซม. เติมลงในคอลัมน์เจล (Sephadex G-75 หรือ G100-120) ล้างเจลด้วย 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ที่มี 5 mM CaCl_2 ด้วยอัตราเร็ว 12 ลบ.ซม./ชม. เก็บสารละลายด้วย fraction collector ให้ได้ fraction ละ 2.0 ลบ.ซม. วัด A_{540} ของแต่ละ fraction หาค่า V_0 และ V_i ของคอลัมน์เจลจากกราฟ ระหว่าง A_{540} กับปริมาตรของสารละลายที่ชะ Blue dextran และ Bromophenol blue ตามลำดับ

ค. วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลของโปรตีน

เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 0.75 ลบ.ซม. ลงในคอลัมน์ ชะคอลัมน์เจลด้วย 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ที่มี 5 mM CaCl_2 (12 ลบ.ซม./ชม.) เก็บสารละลายที่ชะไว้หลอดละ 2.0 ลบ.ซม. นำสารละลายแต่ละ fraction ไปวัดค่า A_{280} เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า A_{280} ของแต่ละ fraction กับปริมาตรที่ถูกชะ

ง. วิธีแยกโปรตีน

เติมสารละลายโปรตีน 1.0 ลบ.ซม. ลงในคอลัมน์ Sephadex (G-75 3 ครั้ง และ G 100-120 8 ครั้ง) ผ่าน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 5 mM CaCl_2 ลงในคอลัมน์เจล ด้วยอัตราเร็ว 12 ลบ.ซม./ชม. เก็บสารละลายที่ชะได้ด้วย fraction collector โดยเก็บหลอดละ 2.0 ลบ.ซม. วัด A_{280} และตรวจหาแอกติวิตีของโปรตีนในหลอดที่มี A_{280} โดยวิธีไฮโดรไลซิสเคซีน สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง A_{280} และแอกติวิตีของโปรตีนในแต่ละหลอด (แกน X) กับปริมาตรของสารละลายที่ถูกชะ (แกน Y)

2.2.4 การศึกษาสมบัติของโปรตีน

โปรตีนซึ่งแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 แต่ละครั้ง จำนวน 8 ครั้ง แต่ไม่ได้นำมา รวมกัน โดยใช้โปรตีนที่แยกได้แต่ละครั้งทดสอบสมบัติหนึ่ง ๆ ของเอนไซม์จนสารละลายโปรตีน นั้นหมด จึงทำการแยกโปรตีนใหม่ ทั้งนี้ได้ทำการแยกทั้งหมด 8 ครั้ง ดังนี้

ครั้งที่	สมบัติที่ทดสอบ
1-2	ความสัมพันธ์ในการเจือจางและการทำบริสุทธิ์โปรตีน
3	pI ด้วยไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง
4	มวลโมเลกุลโดย SDS-PAGE ครั้งที่ 1
5	อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม

ครั้งที่	สมบัติที่ทดสอบ
6	ผลของตัวยับยั้ง ผลของไอออนและความจำเพาะต่อสับสเตรท
7	การไฮโดรไลสโปรตีนด้วยวิธี TNBS และการหา pI ด้วยไอโซอิเล็กตริกโฟคัสซิง
8	มวลโมเลกุลจากเจลฟิสิกส์

2.2.4.1 วิธีการเตรียมสารละลาย

0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0, 7.5 และ 9.0 ที่มี 5 mM CaCl_2 เตรียมโดยชั่ง Tris 1.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 7.0, 7.5 และ 9.0 ด้วย 6 M HCl ตามลำดับ เติม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.37 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 500 ลบ.ซม.

0.05 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.8 ที่มี 0.02 M CaCl_2 เตรียมโดยชั่ง Tris 0.6057 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 7.8 ด้วย 6 M HCl เติม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.29 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 0.02 M CaCl_2 เตรียมโดยชั่ง Tris 1.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 7.2 ด้วย 6 M HCl เติม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.29 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

0.005 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 8.0 ที่มี 0.02 M CaCl_2 เตรียมโดยชั่ง Tris 0.061 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 8.0 ด้วย 6 M HCl เติม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.29 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

0.02 M Acetate บัฟเฟอร์พีเอช 5.0 เตรียมโดยชั่งไฮเดียมอะซิเตท 0.057 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 ลบ.ซม. เติม glacial acetic acid 0.08 ลบ.ซม. ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

0.02 M Phosphate บัฟเฟอร์พีเอช 6.0 เตรียมโดยชั่ง K_2HPO_4 0.0177 กรัม และ KH_2PO_4 0.262 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 เตรียมโดยชั่ง Tris 1.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 ด้วย 6 M HCl ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

0.02 M Glycine-NaOH บัฟเฟอร์พีเอช 10.0, 11.0 และ 12.0 เตรียมโดยชั่ง Glycine 0.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 10.0, 11.0 และ 12.0 ด้วย 6 M NaOH ตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

สารละลายตัวยับยั้ง (ตาราง 2.1)

ตาราง 2.1 ส่วนประกอบของสารละลายตัวยับยั้งเอนไซม์

ชนิด	ตัวยับยั้ง		0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 9.0 (ลบ.ชม.)
	ความเข้มข้น (M)	น้ำหนัก (กรัม)	
Amastatin	2×10^{-5}	0.0010	200
Bestatin	2×10^{-5}	0.0010	200
Iodoacetic acid	2×10^{-4}	0.0010	300
Leupeptin	0.01	0.0271	5
Phosphoramidon	0.01	0.0271	5
EDTA	0.02	0.0372	5
1,10-Phenanthroline	0.02	0.0198	5
PMSF	0.02	0.0174	5

สารละลาย BAPNA เตรียมโดยชั่ง BAPNA 0.0100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลบ.ชม. นำไปอุ่นให้ตะกอนละลายหมด ซึ่งได้สารละลายสีเหลืองอ่อน (เก็บสารละลายไว้ในตู้เย็น)

สารละลาย FAGLA เตรียมโดยชั่ง FAGLA 0.031 กรัม ละลายใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ที่มี 0.02 M CaCl_2 10 ลบ.ชม.

สารละลายเอสเตอร์ เตรียมโดยชั่งเอสเตอร์ (ATEE, ATpEE, BAEE, PME และ TAME 0.1257, 0.1372, 0.1714, 0.1079 และ 0.1875 กรัม ตามลำดับ) ละลายใน 95% เอทานอลให้ปริมาตรครบ 5 ลบ.ชม.

สารละลาย Trypsin เตรียมโดยชั่ง Trypsin 0.0100 กรัม ละลายใน 0.05 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.8 ที่มี 0.02 M CaCl_2 1 ลบ.ชม.

สารละลาย Alcalase เตรียมโดยชั่ง Alcalase 0.0100 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ที่ต้องการ 1.0 ลบ.ชม.

สารละลาย Metalloprotease Type IX เตรียมโดยชั่ง Metalloprotease 0.0100 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ที่ต้องการ 1.0 ลบ.ชม.

สารละลาย Protease S2 เตรียมโดยชั่งโปรตีนจาก *Thermus* S2 0.0100 กรัม ละลายใน 0.005 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 8.0 ที่มี 0.02 M CaCl_2 1 ลบ.ชม.

สารละลายโปรตีนของ F13 ได้จากการแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 8 ครั้ง ซึ่งเริ่มด้วยการเตรียมสารละลายโปรตีน 2 ครั้ง แต่ครั้งใช้ผงโปรตีน 1 กรัม

ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. แล้วทำไดอะไลซิสที่ 4°C 24 ชั่วโมง ได้ปริมาตร 12.6 และ 11.8 ลบ.ซม. สารละลายครั้งแรก นำไปแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 3 ครั้ง (ครั้งที่ 1-3) และสารละลายครั้งหลังให้แยกโปรตีนด้วยคอลัมน์เดียวกัน 5 ครั้ง (ครั้งที่ 4-8) และเก็บสารละลายโปรตีนที่แยกได้จากคอลัมน์ครั้งหนึ่ง ๆ จากหลอดที่มีแอกติวิตีโปรตีนรวมกัน เพื่อทดสอบสมบัติจากโปรตีน

2.2.4.2 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม

เตรียมหลอดทดลอง 2 ชุด ๆ ละ 8 หลอด แต่ละชุดประกอบด้วยสารละลายที่เหมือนกันคือ 0.2% เอซีเคซีนในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ในหลอดที่ 1-8 ตามลำดับหลอดละ 1 ลบ.ซม. อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายโปรตีน (ซึ่งได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 5) 0.30 ลบ.ซม. ลงในแต่ละหลอดทุกหลอดในชุดที่หนึ่ง อุณหภูมิหลอดทดลองทั้งหมดที่อุณหภูมิเดิมพร้อมเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 10% TCA 2.0 ลบ.ซม. ลงในหลอดทั้งหมดเพื่อหยุดปฏิกิริยาและเติมสารละลายโปรตีน 0.30 ลบ.ซม. ลงในแต่ละหลอดทั้ง 8 หลอดในชุดที่สอง ผสมสารละลายในหลอดทดลองให้เข้ากันและตั้งไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เซนติฟิวจที่ 3,000xg เป็นเวลา 10 นาที ผสมสารละลายไตกับ 0.5 M NaOH ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) วัด A_{440} ของสารละลายแต่ละหลอดในชุดที่หนึ่งโดยใช้สารละลายในชุดที่สองของแต่ละพีเอชเป็นสารละลายเปรียบเทียบ

ทำการทดลองในทำนองเดียวกัน โดยเปลี่ยนอุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาจาก 40°C เป็น 50, 60, 65, 70, 80 และ 90°C

2.2.4.3 ผลของตัวยับยั้ง^(16 a)

เปิดสารละลายตัวยับยั้งและบัฟเฟอร์ใส่ในหลอดทดลอง 22 หลอด ดังแสดงในตาราง 2.2 เติมสารละลายโปรตีน (ซึ่งได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 6) 0.50 ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 2-22 ตั้งไว้ให้ตัวยับยั้งทำงานที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำสารละลายทั้งหมดไปหาแอกติวิตีโดยวิธีเอซีเคซีน โดยเติม 0.2% เอซีเคซีนหลอดละ 1.0 ลบ.ซม. อุณหภูมิหลอดทั้งหมดที่ 80°C เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% TCA 2.0ลบ.ซม. เติมสารละลายโปรตีน 0.50 ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 1 เขย่าหลอดทั้งหมดตั้งไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เซนติฟิวจแยกตะกอน แล้วผสมสารละลายใส่เข้ากับ 0.5 M NaOH ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) วัด A_{440} โดยให้สารละลายในหลอดที่ 1 เป็นสารละลายเปรียบเทียบ คำนวณหาแอกติวิตีของโปรตีนจาก

A_{440}

ตาราง 2.2 ส่วนประกอบของสารละลายตัวยับยั้งเพื่อศึกษาอิทธิพลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของโปรติเอส

หลอดที่	ตัวยับยั้ง		ปริมาตร (μl)	0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 9.0 (μl)
	ชนิด	ความเข้มข้น (mM)		
1	-	-	-	500
2	EDTA	0.1	5	495
3		1	50	450
4		10	500	-
5	1,10-Phenanthroline	0.1	5	495
6		1	50	450
7		10	500	-
8	PMSF	0.1	5	495
9		1	50	450
10		10	500	-
11	Amastatin	1×10^{-3}	50	450
12		1×10^{-2}	500	-
13	Bestatin	1×10^{-3}	50	450
14		1×10^{-2}	500	-
15	Iodoacetic acid	1×10^{-3}	5	495
16		1×10^{-2}	50	450
17		1×10^{-1}	500	-
18	Leupeptin	1×10^{-3}	0.1	499.9
19		1×10^{-2}	10	490
20		1×10^{-1}	100	400
21	Phosphoramidon	1×10^{-3}	0.1	499.9
22		1×10^{-2}	10	490

2.2.4.4 ผลของไอออน

ปีเปตสารละลายไอออนและบัฟเฟอร์ได้ในหลอดทดลอง 22 หลอด ดังตาราง 2.3 เติมสารละลายโปรตีน (ซึ่งได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 6) 0.50 ลบ.ซม. ลงในหลอดที่ 2-22 ตั้งไว้ให้ไอออนทำงานที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติม 0.2% เอซีเคซีนหลอดละ 1.0 ลบ.ซม. อุณหภูมิทั้งหมดที่อุณหภูมิ 80°C เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง เติม 10% TCA 2.0 ลบ.ซม. และในหลอดที่ 1 ให้เติมสารละลายโปรตีน 0.50 ลบ.ซม. ตั้งไว้ที่ 4°C 2 ชั่วโมง เชนติฟายแยกสารละลายใสผสมกับ 0.5 M NaOH ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) วัด A_{440} โดยให้สารละลายในหลอดที่ 1 เป็นสารละลายเปรียบเทียบ คำนวณหาแอกติวิตีโปรตีนจาก A_{440}

2.2.4.5 ความจำเพาะต่อ BAPNA⁽³⁷⁾

ใส่ 0.05 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.8 ที่มี 0.02 M CaCl_2 300 ไมโครลิตรลงใน quartz cuvet เติม BAPNA 1 มก./ลบ.ซม. 400 ไมโครลิตร ความคมอุณหภูมิไว้ที่ 80°C แล้วเติมสารละลายโปรตีนจาก F13 (แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 6) 200 ไมโครลิตร บันทึกกราฟการเปลี่ยนแปลงค่า A_{405} ในช่วง 5 นาทีด้วย Shimadzu UV-265 คำนวณอะมิเนสแอกติวิตี (amidase activity) ของโปรตีนจากกราฟที่ได้

การเปรียบเทียบความจำเพาะต่อ BAPNA ของโปรตีนจาก F13 กับ Alcalase, Metalloprotease และทริปซิน ทำโดยใช้ Alcalase และ Metalloprotease และสารละลายทริปซิน ชนิดละ 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยาแทนสารละลายโปรตีนจาก F13 และให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60° , 37° และ 27°C แทนการทำปฏิกิริยาที่ 80°C ของโปรตีนจาก F13 ตามลำดับ

กำหนดให้โปรตีน 1 ยูนิตเอนไมต์ BAPNA (UAm (BAPNA)) หมายถึง ปริมาณโปรตีนที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และให้ค่า A_{405} ที่เปลี่ยนแปลงต่อเวลาที่เท่ากับ 1 หน่วย

2.2.4.6 ความจำเพาะต่อ FAGLA⁽³⁴⁾

ก. การเตรียมกราฟความเข้มข้นของ FAGLA มาตรฐาน

เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด หลอดที่ 1 ใส่ 0.001 M FAGLA 1.0 ลบ.ซม. หลอดที่ 2-4 ใส่ 0.001 M FAGLA 0.75, 0.50 และ 0.25 ลบ.ซม. ตามลำดับ เติม 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ที่มี 20 mM CaCl_2 0.25, 0.50 และ 0.75 ลบ.ซม. ตามลำดับ วัดค่า A_{345} โดยใช้ 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ที่มี 20 mM CaCl_2 เป็นสารละลายเปรียบเทียบ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า A_{345} กับความเข้มข้นของ FAGLA

ตาราง 2.3 ส่วนประกอบของสารละลายไอออนในการศึกษาอิทธิพลของไอออนต่อแอกติวิตีของโปรติเอส

หลอดที่	ไอออน		ปริมาตร (μl)	0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 9.0 (μl)
	ชนิด	ความเข้มข้น (mM)		
1	-	-	-	500
2	Ca ²⁺	1	50	450
3		5	250	250
4		10	500	-
5	Mg ²⁺	1	50	450
6		5	250	250
7		10	500	-
8	Zn ²⁺	1	50	450
9		5	250	250
10		10	500	-
11	Co ²⁺	1	50	450
12		5	250	250
13		10	500	-
14	Mn ²⁺	1	50	450
15		5	250	250
16		10	500	-
17	Cu ²⁺	1	50	450
18		5	250	250
19		10	500	-
20	Fe ³⁺	1	50	450
21		5	250	250
22		10	500	-

ข. วิธีหาแอกติวิตีด้วย FAGLA

ตรวจสอบแอกติวิตีโปรติเอสของสารละลายโปรติเอสจาก F13 (แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 6), Alcalase และ Metalloprotease โดยวิธีเอโซเคซีน และใช้โปรติเอสเหล่านี้ด้วยแอกติวิตีที่เท่ากันคือ 1 UA ซึ่งทำโดยใช้ 0.001 M FAGLA 1.0 ลบ.ซม. ใส่ลงใน cuvet ที่วางอยู่ในช่องที่มีการควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80°C 5 นาที เติมสารละลายโปรติเอส 2.0 ลบ.ซม. บันทึก

การเปลี่ยนแปลงค่า A_{345} ในช่วงเวลา 10 นาทีด้วยเครื่องบันทึกผล (Shimadzu UV-265) คำนวณหาความเข้มข้นของ FAGLA ที่ลดลง/เวลา

การเปรียบเทียบความจำเพาะต่อ FAGLA ของโปรติเอสจาก F13 กับ Alcalase และ Metalloprotease ทำโดยใช้ Alcalase 0.81 ลบ.ซม. และ Metalloprotease 1.0 ลบ.ซม. ทำปฏิกิริยากับ FAGLA 2.0 ลบ.ซม. อุณหภูมิ 60°C และ 37°C ตามลำดับ

กำหนดให้ 1 หน่วย FAGLA ของโปรติเอส (UAm (FAGLA)) หมายถึง จำนวนโมลของ FAGLA ที่ลดลงในหน่วยโมลโครโมลเนื่องจากการไฮโดรไลส์ของโปรติเอสในเวลา 1 นาที

2.2.4.7 ความจำเพาะต่อเอสเทอร์⁽⁹⁾

ในการศึกษาความจำเพาะของโปรติเอสของ F13 ต่อเอสเทอร์ เปรียบเทียบกับ Metalloprotease, Alcalase และโปรติเอสจากแบคทีเรีย S2 ได้เลือกใช้เอสเทอร์ 5 ชนิด ได้แก่ ATEE, ATpEE, BAEE, PME และ TAME ทำได้โดยใช้ 0.005 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 ที่มี 0.02 M CaCl_2 2.0 ลบ.ซม. ผสมกับ ATEE 0.3 ลบ.ซม. อุณหภูมิ 80°C 5 นาที เติมโปรติเอส (แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 6) 2.0 ลบ.ซม. วัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 237 นาโนเมตรด้วยเครื่องบันทึกผล (Shimadzu UV-265) ในทำนองเดียวกันใช้ ATpEE, BAEE, PME และ TAME แทน ATEE และวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 237, 253, 237 และ 256 นาโนเมตร ตามลำดับ

เปรียบเทียบความจำเพาะต่อเอสเทอร์ 5 ชนิดของโปรติเอส F13 กับ Metalloprotease, Alcalase และโปรติเอสจากแบคทีเรีย S2 โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37° , 60° และ 65°C ตามลำดับ

กำหนดให้ 1 หน่วยโปรติเอสในหน่วย UE หมายถึง ปริมาณโปรติเอสที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงไป 1 หน่วย เมื่อทำปฏิกิริยา 1 นาที

2.2.4.8 การไฮโดรไลส์โปรตีนด้วยวิธี Titrobenzenesulfonic acid

ในการศึกษาความสามารถของโปรติเอสจาก F13 ในการไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้ใช้ เอโซเคซีน เคซีน ฮีโมโกลบิน เจลาติน โปรตีนจากถั่วเหลืองและนมพร่องมันเนยเป็นสับสเตรทและเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับผงโปรติเอสดิบของ F13 และ Alcalase ผลิตภัณฑ์จากการไฮโดรไลส์สับสเตรทซึ่งไม่ตกตะกอนด้วยกรดสามารถทำปฏิกิริยากับ TNBS ทำให้ได้สารละลายของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ตกตะกอนที่ดูดกลืนแสงได้ที่ 340 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ A_{340} กับกราฟมาตรฐานของ leucine จะทำให้คำนวณค่า degree of hydrolysis (DH) ของโปรติเอสได้

ก. การเตรียมสารละลาย

0.2125 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.2 เตรียมโดยชั่ง NaH_2PO_4 1.17 กรัม และ

Na_2HPO_4 13.82 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 ลบ.ซม. และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 500 ลบ.ซม.

สารละลาย 0.1% TNBS เตรียมโดยเปิด TNBS 0.1 ลบ.ซม. เติมน้ำ deionized ให้ครบ 100 ลบ.ซม. (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

1% SDS เตรียมโดยชั่ง SDS 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 50 ลบ.ซม.

1.5 mM Leucine เตรียมโดยชั่ง L-Leucine 0.0019 กรัม ละลายใน 1% SDS ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ลบ.ซม.

0.2% เอซีเคซีน เตรียมโดยชั่งเอซีเคซีน 0.1 กรัม ละลายใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 หรือ 9.0 ที่มี 5 mM CaCl_2 ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ลบ.ซม.

1% เคซีน ฮีโมโกลบินและเจลาติน เตรียมโดยชั่งโปรตีน (เคซีน ฮีโมโกลบินหรือเจลาติน) 0.5 กรัม ละลายใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 หรือ 9.0 ที่มี 5 mM CaCl_2 ปรับปริมาตรให้ครบ 50 ลบ.ซม.

0.25% โปรตีนจากถั่วเหลืองและนมพร่องมันเนย เตรียมโดยชั่งโปรตีนจากถั่วเหลืองหรือนมพร่องมันเนย 0.125 กรัม ละลายใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 หรือ 9.0 ที่มี 5 mM CaCl_2 ให้ปริมาตรครบ 50 ลบ.ซม.

สารละลายโปรตีนเอส เตรียมโดยละลายผงโปรตีนเอสดิบ 1 กรัม ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ทำไดอะไลซิสที่ 4°C 24 ชั่วโมง

สารละลายโปรตีนเอส ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ครั้งที่ 4 และ 7

สารละลาย Alcalase เตรียมโดยชั่ง Alcalase 0.0100 กรัม ละลายใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 1 ลบ.ซม.

ข. การเตรียมกราฟมาตรฐานของ Leucine

เตรียมหลอดทดลอง 8 หลอด หลอดที่ 2-8 ใส่ 1.5 mM Leucine 10, 20, 40, 80, 100, 200 และ 250 ไมโครลิตร เติมน้ำ 1% SDS ให้ครบ 250 ไมโครลิตรทุกหลอด ส่วนหลอดที่ 1 ใส่ 1% SDS 250 ไมโครลิตร เติมน้ำ 0.2125 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8.2 ปริมาตร 2 ลบ.ซม. และ 0.1% TNBS หลอดละ 2 ลบ.ซม. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็นสารละลายเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง A_{340} กับความเข้มข้นของ leucine ในหน่วย milliequivalent ต่อ ลบ.ซม.

ค. การหาปริมาณโปรตีนของโปรตีนตัวอย่างโดยวิธี Bradford⁽³⁶⁾

เตรียมหลอดทดลอง 7 หลอด ใส่ 0.2% เอซีเคซีน, 1% เจลาติน, 0.25% โปรตีนจากถั่วเหลืองและนมพร่องมันเนย ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เจือจาง 100 เท่า และ 1% ของสารละลายเคซีน

และสารละลายอีโมโกลบิน ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เจือจาง 100 เท่า ลงในหลอดที่ 1-6 ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นให้แต่ละหลอดมีปริมาตรครบ 0.50 ลบ.ซม. เติมสารละลาย Coomassie Brilliant blue (ข้อ 2.2.3.1) หลอดละ 1.0 ลบ.ซม. เขย่าสารละลายและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที วัด A_{595} โดยใช้หลอดที่ 7 ซึ่งมีน้ำกลั่น 0.50 ลบ.ซม. และสารละลาย Coomassie Brilliant blue 1.0 ลบ.ซม. เป็นสารละลายเปรียบเทียบ หาปริมาณโปรตีนโดยการเทียบค่า A_{595} กับกราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ง. วิธีหาประสิทธิภาพการไฮโดรไลสโปรตีน⁽²³⁾

ใส่สับสเตรท (0.2% เอซีเคซีน, 1% เคซีน, อีโมโกลบินและเจลาติน, 0.25% โปรตีนจากถั่วเหลืองและนมพว่องมันเนย) ลงในหลอดทดลอง 1 ลบ.ซม. นำไปอุ่นที่ 80°C 5 นาที เติมสารละลายของโปรติเอสดิบจาก F13 (สารละลายไดอะไลสและสารละลายโปรติเอส) 0.3 ลบ.ซม. อุ่นสารละลายทั้งหมดที่อุณหภูมิเดิม เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว เติม 10% TCA 2.0 ลบ.ซม. เซนต์ปีฟัจและแยกตะกอนทิ้งไป ใส่สารละลายไอ 0.25 ลบ.ซม. ลงในหลอดทดลอง เติม 0.2125 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8.2 2.0 ลบ.ซม. และ 0.1% TNBS 2.0 ลบ.ซม. อุ่นสารละลายที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยไม่ให้สารละลายถูกแสง หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 M HCl 4.0 ลบ.ซม. เขย่าหลอดและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัด A_{340} โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปรียบเทียบ ทำการทดลองในทำนองเดียวกันโดยใช้สารละลาย Alcalase 100 ไมโครลิตรแทนสารละลายโปรติเอสจาก F13 โดยใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยาที่ 60°C แทน 80°C

2.2.5 การตรวจสอบมวลโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE

ในการทำบริสุทธิ์โปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ซึ่งเริ่มต้นด้วยการไดอะไลสสารผสมของผงโปรติเอสดิบ 1 กรัม ในสารละลาย 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 จากนั้นจึงแบ่งสารละลายนี้ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-75 ทำให้ได้โปรติเอสบริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนพบว่าสารละลายโปรติเอสบริสุทธิ์ที่ได้มีความเข้มข้นของโปรตีนไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนั้นจึงต้องทำให้เข้มข้นด้วย Ultrafiltration appendrof จนได้สารละลายที่มีโปรตีนเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE

2.2.5.1 วิธีเตรียมสารละลาย

ก. วิธีเตรียมสารละลายโปรติเอสบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย F13 เตรียมโดยผ่านสารละลาย 1 ลบ.ซม. ที่ได้จากการไดอะไลสสารผสมของผงโปรติเอสดิบ 1 กรัมในสารละลาย 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. และทำให้ได้สารละลาย 11.8 ลบ.ซม. มีแอกติวิตี 115.64 UA และโปรตีน 0.354 มก. ลงในคอลัมน์ Sephadex G-75 ได้โปรติเอสบริสุทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งถูกชะออก

จากคอลัมน์ในช่วงปริมาตรการชะ 48-60, 62-80 และ 84-94 ลบ.ซม. และทำให้สารละลายโปรตีน-เอนบริสุทธิเข้มข้นโดยเติมสารละลายโปรตีนเอนบริสุทธิลงในหลอด Ultrafiltration appendrof ที่มี MW cut-off 10,000 2 หลอด ๆ ละ 100 μ l เซนติฟิวส์ที่ 3,000xg 4°C เป็นเวลา 15 นาที ได้สารละลายเหลือ 20 μ l

ข. การเตรียมสารละลายสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

Stock acrylamide ประกอบด้วย 30% Acrylamide และ 8% bis-acrylamide เตรียมโดยชั่ง Acrylamide 15.0 กรัม และ bis-acrylamide 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรให้ครบ 50 ลบ.ซม.

สารละลายบัฟเฟอร์

1.875 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 8.8 เตรียมโดยชั่ง Tris 22.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 8.8 ด้วย 6 M HCl ปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

0.6 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 เตรียมโดยชั่ง Tris 7.32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 ลบ.ซม. ปรับพีเอช 6.8 ด้วย 6 M HCl ปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

สารละลายเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องล้าง มีดังต่อไปนี้

10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เตรียมโดยชั่งแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 1 กรัม ละลายน้ำกลั่นให้ครบ 10 ลบ.ซม.

10% SDS เตรียมโดยชั่ง SDS 1 กรัม ละลายน้ำกลั่นให้ครบ 10 ลบ.ซม.

สารละลายบัฟเฟอร์อิเล็กโตรด เตรียมโดยชั่ง Tris 1.5 กรัม Glycine 7.2 กรัม และ SDS 0.25 กรัม ละลายน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 250 ลบ.ซม.

สารละลายบัฟเฟอร์ของสารตัวอย่าง ประกอบด้วย 0.6 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 6.8 และ 0.5% Bromophenol blue อย่างละ 5.0 ลบ.ซม., 10% SDS 0.5 ลบ.ซม., Sucrose 5.0 กรัม และ Mercaptoethanol 0.25 ลบ.ซม. ปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 50 ลบ.ซม. ด้วยน้ำกลั่น

สารละลายของ Separating gel (10% gel) เตรียมโดยผสม 1.875 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 8.8 3.0 ลบ.ซม., น้ำกลั่น 6.8 ลบ.ซม., stock acrylamide 5.0 ลบ.ซม., 10% SDS 0.15 ลบ.ซม. 10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 75 ไมโครลิตร และ TAMED 5.5 ไมโครลิตร (เตรียมใช้ทันที)

สารละลาย Stacking gel (4% gel) เตรียมโดยผสม 0.6 M Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 6.8 1.0 ลบ.ซม., stock acrylamide 1.35 ลบ.ซม., น้ำกลั่น 7.5 ลบ.ซม., 10% SDS 0.1 ลบ.ซม., 10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 0.05 ลบ.ซม. และ TAMED 14 ไมโครลิตร (เตรียมใช้ทันที)

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Sigma Marker M-3913 ประกอบด้วย BSA (66,000), Ovalbumin (45,000), Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (36,000), Carbonic

Anhydrase (29,000), Trypsinogen (24,000), Trypsin Inhibitor (20,000), α -Lactalbumin (14,200) และ Aprotinin (6,500)

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA, Trypsin Inhibitor และ Lysozyme) เตรียมโดยชั่งโปรตีนมาตรฐาน 0.0010 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลบ.ซม.

การเตรียมสารละลายโปรตีน

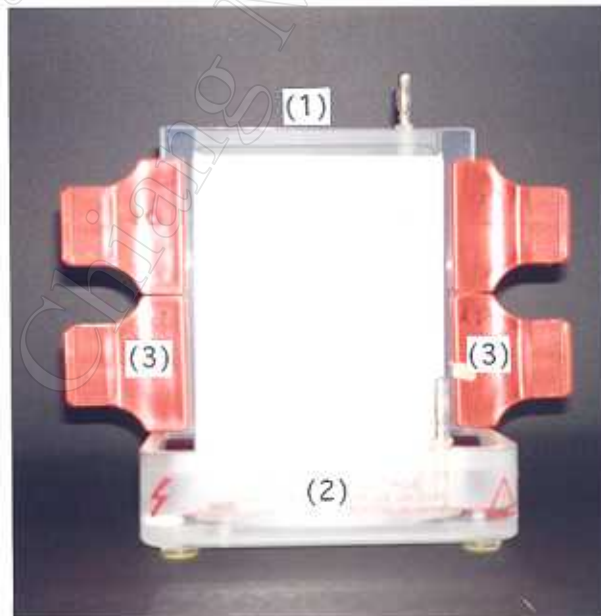
สารละลายโปรตีนจากไลโอไฟไลเซชัน เตรียมโดยละลายผงโปรตีน 0.020 มก. ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 1 ลบ.ซม.

สารละลายโปรตีนจากโคอะไลเซชัน เตรียมโดยละลายผงโปรตีน 1 กรัม ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. ทำโคอะไลเซชันในสารละลาย 4°C 24 ชั่วโมง

การเตรียมสารตัวอย่างทั้งหมด เตรียมโดยผสมสารละลายโปรตีน (โปรตีนมาตรฐาน โปรตีนและสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์) เข้ากับสารละลายบัฟเฟอร์ของสารตัวอย่างในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ใส่ลงในหลอด นำแต่ละหลอดไปอุ่นในน้ำเดือด 3 นาที

2.2.5.2 วิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส⁽³⁸⁾

เตรียมเจลโดยใช้ spacer หนา 1.25 มม. คั่นขอบ 2 ข้างระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่น (ขนาด 10x12 ซม.) แล้วใช้ตัวหนีบยึดกระจกทั้งสองไว้ด้วยกันแล้ววางลงในช่องว่างของ chamber ล่างของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส (Hoefer SE 280) ดังรูป 2.4 ชุดสารละลาย agarose (agarose 0.05 กรัม ผสม



รูป 2.4 การเตรียมเจลใน chamber ของชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส (Hoefer SE 280) ซึ่งประกอบด้วย chamber บน (1) chamber ล่าง (2) และใช้ตัวหนีบ (3) ยึดกระจกทั้งสองข้าง

กับน้ำกลั่น 5 ลบ.ซม. ต้มให้เดือด) ไป ค่อย ๆ หยดเป็นทางยาวตามขอบล่างของแผ่นกระจกด้านที่ติดกับ chamber ล่าง เนื่องจากแรงดึงดูดแคปิลลารี (capillary adhesion) สารละลาย agarose จะซึมขึ้นไปในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกทั้งสอง ซึ่งจะทำให้มีความสูงจากขอบล่างประมาณ 0.3 ซม. ปลดอxygen agarose แข็งตัว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที เตรียมสารละลายของ Separating gel และใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกด้าน chamber บนทันที ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในขณะเติมสารละลายและให้สารละลายเจลมีความสูงห่างจากขอบบนประมาณ 1.5 ซม. เติมน้ำกลั่นปิดผิวหน้าเจล ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวสมบูรณ์ (ประมาณ 40 นาที) เทน้ำที่ปิดหน้าเจลออก ใส่สารละลายของ Stacking gel ลงในช่องว่างระหว่างกระจก ทำให้สารละลายไหลลงปิดผิวหน้า Separating gel และให้สารละลายมีความสูงจากขอบบนประมาณ 0.5 ลบ.ซม. พร้อมกับใส่หัว (ซึ่งมีความกว้างช่องละ 0.4 มม.) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเจลแข็งตัวสมบูรณ์แล้วจึงดึงหัวออก จะได้ช่องว่างสำหรับใส่ตัวอย่าง

เติมสารละลายบัฟเฟอร์อิเล็กโทรดลงใน chamber บนและล่างให้ท่วมแผ่นเจล ต่อหัวไฟฟ้าลบและบวกจาก power supply เข้ากับหัวไฟฟ้าใน chamber บนและล่าง ดังรูป 2.5 ผ่านกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 45 นาที หยุดจ่ายกระแสไฟฟ้า และเติมสารต่าง ๆ ลงในช่องสารตัวอย่างดังนี้

ช่องที่	สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
1	Sigma Marker	1
2	BSA	1
3	Trypsin Inhibitor	1
4	Lysozyme	5
5	สารละลายโปรตีนเคซีน 20 มก./ลบ.ซม. และ 5% SDS	20
6	สารละลายไดอะไลสโปรตีนและ 5% SDS เจือจาง 5 เท่า	6
7	สารละลายโปรตีน I (เจือจาง 10 เท่า)	10
8	สารละลายโปรตีน II (เจือจาง 10 เท่า)	10
9	Sigma Marker	0.5

ผ่านกระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมป์ จนกระทั่งเห็นสีน้ำเงินของ bromophenol blue เคลื่อนที่ถึงปลายของ separating gel ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หยุดผ่านกระแสไฟฟ้าและถอดหัวไฟฟ้า



รูป 2.5 การแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ซึ่งประกอบด้วย Power supply (1) และ ชุดอิเล็กโตรฟอรีซิส (2)

ทั้งสองออกจาก chamber เทลารละลายบัฟเฟอร์อิเล็กโตรดออกจาก chamber บนและล่าง ดึงตัวหนีบออกแล้วยกแผ่นเจลพร้อมกับแผ่นกระจกออกจาก chamber ค่อย ๆ ดึงแผ่นกระจกด้านหนึ่งออกก่อน แล้วจึงวางแผ่นเจลด้านที่ติดกระจกออกแล้วลงในกล่องสารละลายที่ใช้ในขั้นตอนการย้อม จากนั้นค่อย ๆ ดึงแผ่นกระจกออกจากเจลอย่างช้า ๆ นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อม

2.2.5.3 การย้อมสีเจลโดยวิธี Silver staining

ก. การเตรียมสารละลาย (ใช้น้ำ deionized ทั้งหมด)

50% เมทานอลและ 10% กรดอะซิติก เตรียมโดยผสมเมทานอล 50 ลบ.ซม. กับกรดอะซิติก 10 ลบ.ซม. แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 ลบ.ซม.

5% เมทานอลและ 7% กรดอะซิติก เตรียมโดยผสมเมทานอล 5 ลบ.ซม. กับกรดอะซิติก 7 ลบ.ซม. แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 ลบ.ซม.

10% กลูเทรลดีไฮด์ เตรียมโดยตวง 50% กลูเทรลดีไฮด์ 20 ลบ.ซม. เติมน้ำให้ครบ 100 ลบ.ซม.

5 ไมโครกรัม/ลบ.ซม. Dithiothreitol เตรียมโดยชั่ง Dithiothreitol 0.005 กรัม ละลายในน้ำ 100 ลบ.ซม.

0.08% ซิลเวอร์ไนเตรท เตรียมโดยชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.08 กรัม ละลายน้ำ 100 ลบ.ซม.

3% โซเดียมคาร์บอเนต เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 3.0 กรัม ละลายในน้ำ 100 ลบ.ซม.

สารละลาย developer เตรียมโดยเติม 37% ฟอรัลดีไฮด์ 50 ไมโครลิตรลงใน 3% ไฮเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 100 ลบ.ซม.

ข. วิธีการย้อมสีโปรตีนบนแผ่นเจล (ใช้น้ำ deionized ตลอดการทดลอง)

นำแผ่นเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโตรฟอเรซิสมาทำให้โปรตีนย้อมติดบนแผ่นเจลโดยเติมสารละลายผสมของ 50% เมทานอล และ 10% กรดอะซิติกลงในกล่องพลาสติกให้ท่วมแผ่นเจลที่วางอยู่ ทำการเขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าแบบ end to end เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่เจลในสารละลายผสมของ 5% เมทานอล และ 7% กรดอะซิติกในกล่องพลาสติก 15 นาที นำแผ่นเจลออกไปใส่ลงในสารละลาย 10% กลูเทอรัลดีไฮด์ แช่ไว้ 15 นาที ล้างแผ่นเจลในน้ำโดยแช่แผ่นเจลในน้ำ 15 นาที นำแผ่นเจลออกไปแช่ในสารละลาย Dithiothreitol 10 นาที ย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย 0.08% จิลเวอร์ในเตรท 15 นาที (ข้อควรระวัง ก่อนทั้งสารละลายจิลเวอร์ในเตรท ควรเติมกรดเกลือเข้มข้น ปริมาณเล็กน้อยก่อนทั้งสารละลาย) แช่แผ่นเจลที่ย้อมแล้วลงในสารละลาย developer จนกระทั่งเห็นแถบสีโปรตีนปรากฏเป็นสีน้ำตาลเข้มบนแผ่นเจลสีน้ำตาลอ่อน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยยกแผ่นเจลไปแช่ในน้ำ บันทึกระยะที่พบแถบโปรตีนแต่ละชนิดที่เคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นและความยาวของเจล แล้วนำไปคำนวณค่า Relative mobility ของแถบโปรตีนแต่ละชนิดต่อไปและนำเจลไปถ่ายรูป โดยวางแผ่นเจลบนกล่องแสง

2.2.6 การตรวจสอบค่าไอโซอิเล็กตริกโดยวิธีไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง

การวิเคราะห์หาค่า pI ทำโดยใช้สารละลายโปรตีนที่แยกได้จากการผ่านสารละลายไดอะไลซิสโปรตีนลงในคอลัมน์ Sephadex G 100-120 2 ครั้ง พบโปรตีนเพียงพีคเดียว ซึ่งก่อนที่จะหาค่า pI จะต้องทำให้ความเข้มข้นสูงขึ้นก่อน

2.2.6.1 วิธีเตรียมสารละลาย (ใช้น้ำ deionized ทั้งหมด)

สารละลายโปรตีนจาก F13 ได้จากการแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 2 ครั้ง โดยใช้สารละลายโปรตีน 3.0 และ 0.2 ลบ.ซม. (ผงโปรตีนดิบ 1 กรัม ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. ซึ่งทำให้ได้สารละลายที่มีปริมาตรทั้งหมด 11.8 ลบ.ซม. มีแอกติวิตี 115.64 UA และโปรตีน 0.354 มก.) ทำให้ได้โปรตีน 241 และ 19.2 ลบ.ซม. ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ในช่วงปริมาตรการชะ 132.6-378.8 และ 55.2-71.2 ลบ.ซม. ตามลำดับ แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย Ultrafiltration unit และ Ultrafiltration appendrof (MW cut-off 10,000) ตามลำดับให้มีปริมาตรเหลือเหลือละ 10 ไมโครลิตร

Stock acrylamide (T = 25%, C = 4%) เตรียมโดยชั่ง acrylamide 24 กรัม และ bis-acrylamide 1 กรัม ละลายในน้ำ ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ลบ.ซม. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

0.1% (w/v) riboflavin-5' phosphate เตรียมโดยชั่ง riboflavin-5' phosphate 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 50 ลบ.ซม. เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

20% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เตรียมโดยชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.2 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลบ.ซม. ควรเตรียมใหม่ ๆ ทุกครั้ง

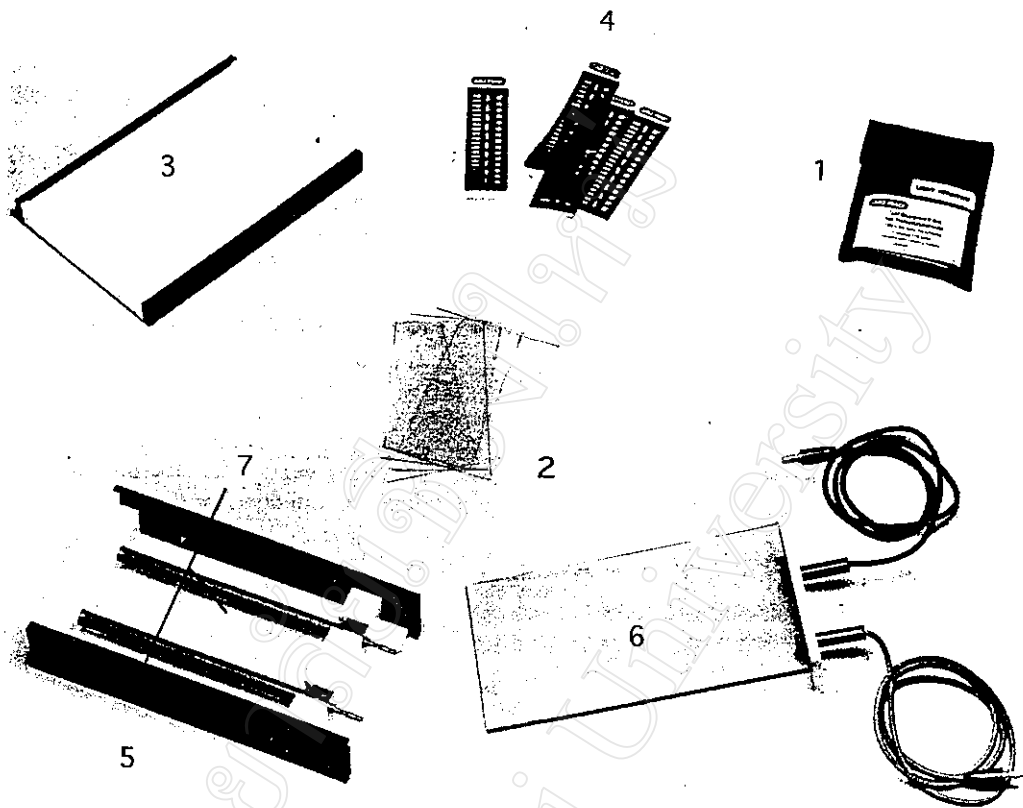
25% (w/v) กลีเซอรอล เตรียมโดยชั่งกลีเซอรอล 2.5 กรัม ละลายในน้ำให้ครบ 10 ลบ.ซม.

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ประกอบด้วย Amyloglucosidase (pl 3.6), Trypsin Inhibitor (pl 4.6), β -Lactoglobulin (pl 5.1), Carbonic anhydrase II (pl 5.9), Carbonic anhydrase I (pl 6.6), Myoglobin (pl 6.8), Lentil Lectin (pl 8.2, 8.6, 8.8) และ Trypsinogen (pl 9.3)

สารละลายของ Polyacrylamide electrofocusing gels เตรียมโดยผสมน้ำ 2.75 ลบ.ซม. acrylamide และ 25% (w/v) กลีเซอรอล อย่างละ 1.0 ลบ.ซม., Ampholyte 3-10 0.25 ลบ.ซม., 20% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 7.5 ไมโครลิตร, 0.1% (w/v) riboflavin-5' phosphate 35 ไมโครลิตร และ TEMED 1.5 ไมโครลิตร

2.2.6.2 วิธีการทำไอโซอิเล็กตริกโฟกัส⁽³⁹⁾

ใช้ forceps ดึงแผ่น gel support film ออกจากซองบรรจุ (หมายเลข 1 รูป 2.6) ในห้องมืด ปิดของฟิล์ม หยดน้ำ 4-5 หยดลงบนแผ่นกระจก วางแผ่น gel support film ให้ด้านที่เป็น hydrophobic (ผิวมัน) ติดกับแผ่นกระจก (หมายเลข 2 รูป 2.6) จากนั้นคว่ำแผ่นกระจกลงบนภาชนะเตรียมเจล (หมายเลข 3 รูป 2.6) เปิดสารละลาย polyacrylamide electrofocusing gel ที่เตรียมไว้ใส่ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกกับภาชนะอย่างช้า ๆ จนเต็ม ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น ปลดปล่อยเจลแข็งซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง ค่อย ๆ แซะแผ่นเจลออกจากภาชนะ วางด้านที่มีแผ่นฟิล์มลงบนแผ่นกระจก วางแผ่นแบบช่องใส่สาร (หมายเลข 4 รูป 2.6) สำหรับใส่สารตัวอย่างลงบนเจล ซึ่งมีช่องใส่สาร 8 ช่อง ใส่สารละลายโปรตีนมาตรฐานลงในช่องที่ 1, 4 และ 8 ส่วนช่องที่เหลือทั้งหมดใส่สารละลายโปรตีนของละ 2 ไมโครลิตร ตั้งไว้ 5 นาที เพื่อให้สารละลายแพร่เข้าไปในเนื้อเจล คว่ำแผ่นเจลลงบนอิเล็กโตรดกราไฟท์ใน chamber นอก (หมายเลข 5 รูป 2.6) โดยที่มีแผ่นฟิล์มวางอยู่ข้างบน ปิดฝา chamber (หมายเลข 6 รูป 2.6) พร้อมกับเสียบขั้วไฟฟ้าเข้ากับอิเล็กโตรดกราไฟท์ใน chamber (หมายเลข 7 รูป 2.6) ต่อขั้วไฟฟ้าจากฝาปิด chamber เข้าที่ power supply (รูป 2.7) เปิดสวิตช์ของ power supply โดยตั้งโปรแกรม S1, S2 และ S3 ให้มีค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100, 200 และ 450 โวลต์ เป็นเวลา 15, 15 และ 60 นาที ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดเวลาปิด power supply เปิดฝา และดึงอิเล็กโตรดกราไฟท์ออก ยกแผ่นเจลออกมาโดยจับที่ปลายทั้งสองข้างของแผ่นฟิล์ม ย้อมเจล



รูป 2.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซึ่งประกอบด้วยแผ่น gel support film (1) แผ่นกระจก (2) ถาดเตรียมเจล (3) แผ่นแบบช่องใส่ตัวอย่าง (4) chamber นอก (5) ฝาปิด chamber พร้อมล๊อคภายในที่มีขั้วไฟฟ้า (6) และอิเล็กโทรด-กราไฟท์ (7)

ซึ่งติดอยู่บนแผ่นฟิล์มด้วย silver stain (ข้อ 2.2.5.3) เปรียบเทียบระยะห่างของแถบโปรตีนจากขอบด้านซ้ายของเจลระหว่างสารละลายโปรตีนกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน เพื่อหาค่า pI ของสารละลายโปรตีน

2.2.7 การตรวจสอบค่าไอโซอิเล็กตริกโดยวิธีโครมาโตกราฟี

ในการทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยโครมาโตกราฟีนั้น ได้ใช้โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-75 โดยเริ่มจากการผ่านสารละลายไดอะไลซิสโปรตีนครั้งละ 3 ลบ.ซม. 2 ครั้ง จากนั้นจึงรวมโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้ แล้วจึงทำให้สารละลายนี้มีโปรตีนเข้มข้นขึ้นก่อนที่จะทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ของ Polybuffer exchanger 94



รูป 2.7 การตรวจสอบค่า pi ของสารละลายโปรตีนโดยวิธีไฮโดรอิเล็กตริกโฟลลิ่ง ซึ่งประกอบด้วยเจลที่มีสารทดสอบวางใน chamber นอก (1) ซึ่งต่อเข้ากับ power supply (2) ด้วยอิเล็กโทรดกราฟไฟท์ (3)

2.2.7.1 วิธีเตรียมสารละลาย (ใช้น้ำ deionized ทั้งหมด)

สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ของ F13 เตรียมโดยใช้สารละลายไดอะไลต์ F13 3 ลบ.ซม. (ละลายผงโปรตีน 1 กรัม ใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. แล้วไดอะไลต์ ทำให้ได้สารละลายทั้งหมด 11.8 ลบ.ซม. มีแอกติวิตี 115.64 UA และโปรตีน 0.354 มก.) ผ่านลงในคอลัมน์ของ Sephadex G-75 ทำให้ได้โปรตีนบริสุทธิ์ซึ่งถูกชะออกจากคอลัมน์ในช่วงปริมาตรการชะ 195.9-279.9 และเมื่อทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง ทำให้ได้โปรตีนบริสุทธิ์ที่ปริมาตรการชะที่ 227.5-284.2 ลบ.ซม. รวมสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ 2 ครั้ง ได้ 116 ลบ.ซม. แล้วทำให้เข้มข้นด้วย Ultrafiltration unit (MW cut-off 10,000) (รูป 2.8) ให้เหลือปริมาตร 10 ลบ.ซม. และจากนั้นจึงทำให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นด้วย Ultrafiltration appendrof จนเหลือปริมาตรสุดท้ายประมาณ 2 ลบ.ซม. จะทำให้ได้สารละลายที่มีโปรตีนเพียงพอสำหรับการแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยโครมาโตกราฟี

0.02 M Ethanolamine-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 9.4 เตรียมโดยชั่ง Ethanolamine 1.24 กรัม ละลายในน้ำ 900 ลบ.ซม. ปรับพีเอชเป็น 9.4 ด้วย 6 M HCl เติมน้ำให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร

Polybuffer exchanger 94 เตรียมโดยนำ exchanger 50 ลบ.ซม. มาแช่ใน 0.02 M Ethanolamine-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 9.4 1 คืน แล้วไล่ก๊าซออกจาก exchanger ให้หมดด้วยบีมน์



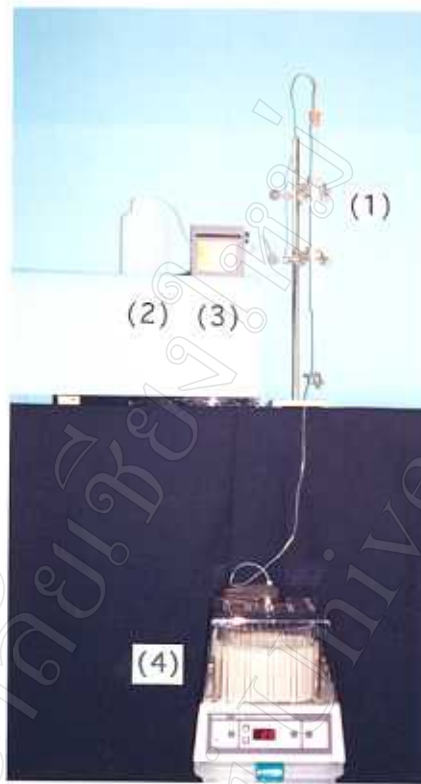
รูป 2.8 การทำอัลตราฟิลเตรชันของสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์โดยผ่านเมมเบรนในโตรเจน (1) เข้าสู่อัลตราฟิลเตรชันยูนิต (2) ซึ่งมีสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่ถูกกวนตลอดเวลา ด้วยแท่งกวนแม่เหล็ก (3) และเก็บสารละลายที่ผ่านเมมเบรนไว้ในบีกเกอร์ (4)

Polybuffer 96 เตรียมโดยตรง polybuffer 96 10 ลบ.ซม. ละลายในน้ำ 80 ลบ.ซม. ปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย 6 M HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

Polybuffer 74 เตรียมโดยตรง polybuffer 74 10 ลบ.ซม. ละลายในน้ำ 80 ลบ.ซม. ปรับพีเอชเป็น 4.0 ด้วย 6 M HCl ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ลบ.ซม.

2.2.7.2 วิธีการทำโครมาโตกราฟี⁽¹¹⁾

เตรียมคอลัมน์เจลของ polybuffer exchanger 94 ขนาด 1x30 ซม. (หมายเลข 1 รูป 2.9) วางกระดาดกรองขนาดเท่ากับเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ปิดบนผิวหน้าของเจล ชะคอลัมน์ด้วย 0.02 M Ethanolamine-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 9.4 (หมายเลข 2 รูป 2.9) ผ่าน peristaltic pump (หมายเลข 3 รูป 2.9) ด้วยอัตราเร็ว 40 ลบ.ซม./ชม. จนเจลอยู่ในสภาวะสมดุล เปิดสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ของ F13 1.0 ลบ.ซม. (20 UA และโปรตีน 3 มก.) ลงในคอลัมน์เจล เปลี่ยนสารละลายตัวชะ (หมายเลข 2 รูป 2.9) โดยใช้สารละลาย polybuffer 96 เก็บสารละลายที่ชะด้วย fraction collector (หมายเลข 4 รูป 2.9) โดยเก็บ fraction ละ 3 ลบ.ซม. จนกระทั่งสารละลายที่ได้มีพีเอชเท่ากับ 6.0 เปลี่ยนสารละลายตัวชะโดยใช้สารละลาย polybuffer 74 หยุดเก็บสารละลายเมื่อสารละลายที่ชะออกมามีพีเอชเท่ากับ 4.0 วัด A_{280} . พีเอชและแอกติวิตีของโปรตีนของสารละลายที่แยกได้ทั้งหมด



รูป 2.9 การทำบริสุทธิ์และการหาค่า pI ของโปรตีนจากแบคทีเรีย F13 โดยโครมาโตกราฟีคอลัมน์ ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์ของ polybuffer exchanger 94 (1) สารละลาย polybuffer 74/96 (2) โดยใช้ peristaltic pump ช่วยควบคุมอัตราการไหลที่ 40 ลบ.ซม./ชม. (3) และเก็บสารละลายจากคอลัมน์ด้วย fraction collector (4)