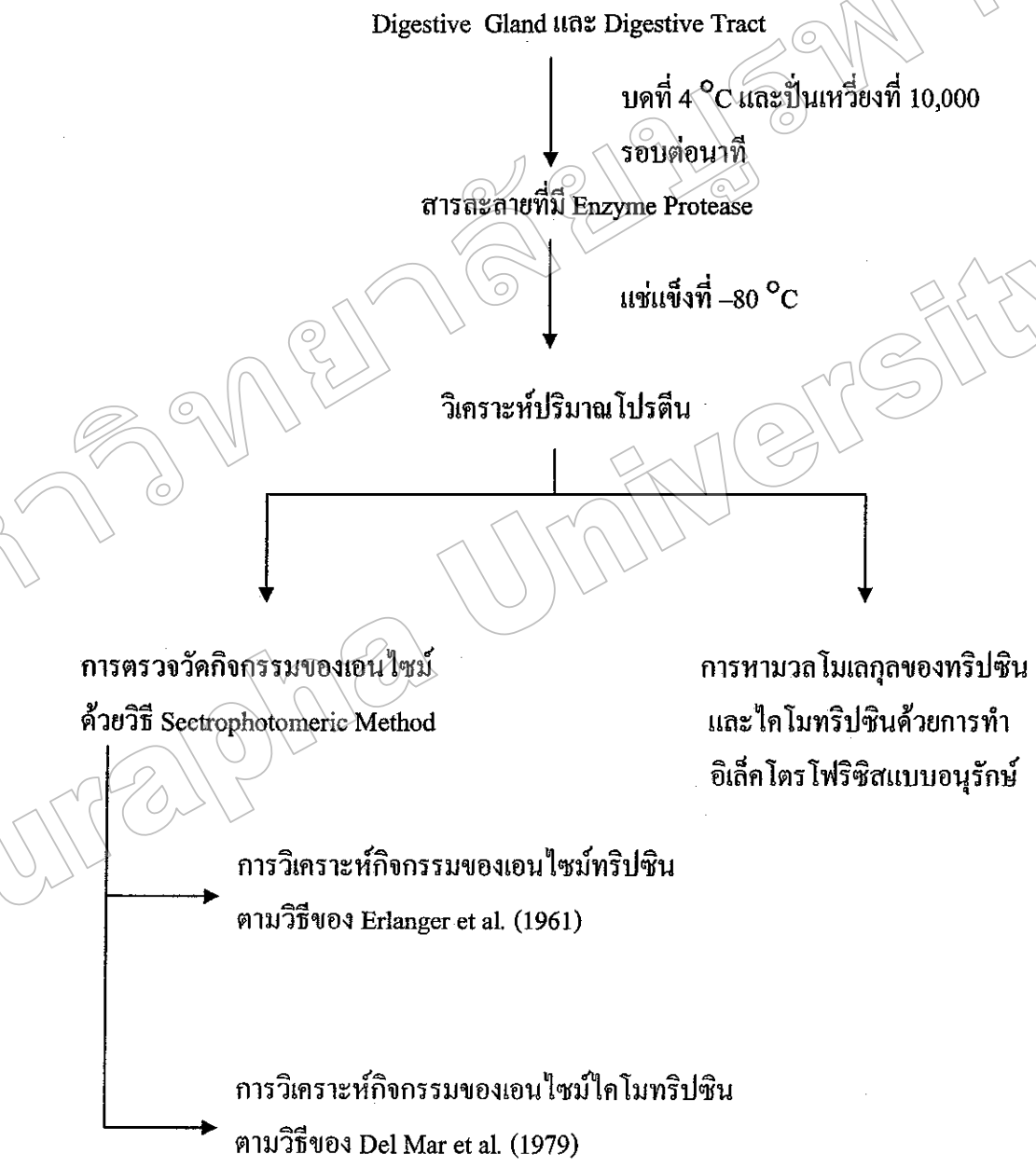
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

แบบแผนการวิจัย



ภาพที่ 21 แบบแผนการวิจัย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อุปกรณ์และสารเคมีในการวิจัย

การเตรียมตัวอย่าง

1. อุปกรณ์

1.1 มีดผ่าตัด

1.2 กรรไกรผ่าตัด

1.3 ค้อน

1.4 คีมสำหรับบีบเปลือกหอย

1.5 เข็มเขี่ยปลายแหลม

1.6 เข็มหมุด

1.7 ถาดไข

1.8 ปากคีบ

1.9 กระบอกน้ำกลั่น

1.10 กะละมังขนาดเล็ก

1.11 ปิเปต (Auto Pipette) และทิปขนาด 5 มิลลิลิตร

1.12 หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับปั่นเหวี่ยง

1.13 หลอดเอพเพนดรอฟขนาด 500 ไมโครลิตร สำหรับเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำ

1.14 เครื่องบีบเปลือกหอย

1.15 อุปกรณ์บดเนื้อเยื่อแบบมือ

1.16 เครื่องปั่นเหวี่ยง

2. สารเคมี

2.1 น้ำกลั่น

2.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

2.3 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมล

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงและการสร้างกราฟ p-Nitro Anilide มาตรฐาน

1. อุปกรณ์

1.1 กระบอกน้ำกลั่น

1.2 กะละมังขนาดเล็ก

1.3 หลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร สำหรับเก็บสับสเตรท

1.4 ปิเปตและทิปขนาด 5 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.5 ปิเปตขนาด 10 และ 5 มิลลิลิตร

1.6 ลูกยางหรือเครื่องมือสำหรับดูดสารเคมี

1.7 บีกเกอร์

1.8 แท่งแก้วคน

1.9 เครื่องชั่งสาร

1.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงและคิวเวท

1.11 เครื่องปั่นผสม (Vortex)

1.12 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

1.13 อ่างน้ำแบบปรับอุณหภูมิได้

2. สารเคมี

2.1 น้ำกลั่น

2.2 เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์สำหรับล้างคิวเวท

2.3 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2.4 4-ไนโตรอะนิลิน (p-Nitro Anilide)

2.5 ไดเมททิลฟอร์มาไมด์ (Dimethylformamide)

2.6 สับสเตรทสำหรับทริปซิน: *N*-α-Benzoylarginine-*p*-Nitroanilide (BAPNA)

2.7 สับสเตรทสำหรับไคโมทริปซิน: *N*-Succynyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-Nitroanilide (SAPNA)

2.8 ทริสไฮโดรคลอริค (Tris-HCl)

2.9 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)

2.10 ทริปซินจาก Porcine Pancreas (93614 Fluka)

2.11 α-ไคโมทริปซิน TLCK Treated (27280 Fluka)

การศึกษาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

1. อุปกรณ์

1.1 กรวยแก้ว

1.2 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

1.3 ถาดสำหรับใส่สี

1.4 หลอดพลาสติกขนาด 200 ไมโครลิตร

1.5 ปิเปต (Auto pipette) และทิปขนาด 10 ไมโครลิตร

1.6 ปิเปตแบบหลายช่อง (Multi-Channel Pipette) และทิปขนาด 200 ไมโครลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.7 เครื่องปั่นผสมสาร (Vortex)

1.8 เครื่องเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate Reader)

1.9 ถาดสำหรับวัดค่าการดูกลืนแสงแบบ 96 หลุม

1.10 ถุงไดอะไลซิส (Snake Skin Pleated Dialysis Tubing) ขนาด 10,000 MWCO ของ PIERCE พร้อมอุปกรณ์

1.11 ตู้เย็น

2. สารเคมี

2.1 น้ำกลั่น

2.2 ตัวอย่างโปรตีนมาตรฐานของ Bio-Rad

2.3 สีย้อม BSA

2.4 โพลิเอทิลีไกลคอล (Polyethylene Glycol)

การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิส

1. อุปกรณ์

1.1 หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร

1.2 กะละมัง

1.3 กล่องพลาสติกสำหรับย้อมเจล

1.4 ปิเปต (Auto Pipette) และทิปขนาด 1,000 200 และ 20 ไมโครลิตร

1.5 เครื่องปั่นผสมสาร (Vortex)

1.6 ชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรโฟริซิส

1.7 เครื่องจ่ายไฟฟ้า

1.8 เครื่องเขย่าสาร

2. สารเคมี

2.1 ตัวอย่างโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล เช่น Bio-Rad Broad Range Molecular Weight

2.2 เจล

2.3 น้ำกลั่น

2.4 อะคริลาไมด์ เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (Acrylamide)

2.5 1.5 โมล ทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ (Tris-HCl pH 8.8)

2.6 0.5 โมล ทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์(Tris-HCl pH 6.8)

2.7 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammoniumpersulphate: APS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.8 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulphate: SDS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

2.9 TEMED

2.10 *N*-α-Benzoylarginine -*p*- Nitroanilide (BAPNA)

2.11 *N*-Succynyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-Nitroanilide (SAPNA)

2.12 สีย้อม

2.13 Coomassie Brillant Blue R-250 (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก 2.1)

2.14 สี Bromphenol Blue เพื่อใช้เป็น Marker

2.15 กรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์

2.16 บัฟเฟอร์ (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก 3.)

2.17 อิเล็คโทรดบัฟเฟอร์ 5x

2.18 เนทีฟแซมเปิลบัฟเฟอร์ 4x (Native Sample Buffer)

2.19 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer: PBS) 0.01 โมล

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารละลายเอนไซม์จากตัวอย่าง หอยหวานที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นหอยในระยะตัวเต็มวัย มีขนาดความยาวเปลือกประมาณ 5-7 เซนติเมตร ที่จับได้จากธรรมชาติที่จังหวัดระยอง โดยใช้เวลาในการรวบรวมประมาณ 2 เดือน หลังจากที่รวบรวมได้แล้วจึงนำมาคัดแยกเพศออกจากกันและเลี้ยงต่อในตะกร้าลอยน้ำที่มีการถ่ายเทน้ำตลอดเวลาภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพาจนกระทั่งนำไปทดลอง ในระหว่างการเลี้ยงจะให้อาหารเป็นปลาข้างเหลืองสดวันละหนึ่งครั้ง

นำหอยหวานเพศผู้หรือเมียที่ผ่านการอดอาหารมาเป็นเวลา 24 ชม. เนื่องจากเป็นเวลาที่สัตว์น้ำได้ใช้สารอาหารในเลือดจนเหลือต่ำสุด (Torrissen, 1994) และเริ่มเข้าสู่รอบของการกินอาหารครั้งใหม่ จำนวน 10 ตัว มาผ่าแยกเอาส่วนต่อมย่อยอาหาร (Digestive Gland: DG) และทางเดินอาหาร (Digestive Track: DT) ออก บดด้วยเครื่อง Homogenizer จนละเอียดที่ 4 องศาเซลเซียส ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมล (วิธีเตรียมในภาคผนวก 1) ปริมาณ 7 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ดูดส่วนน้ำออกโดยระวังไม่ให้มีเนื้อเยื่อและไขมันปะปนมา แบ่งออกเป็นส่วน ๆ นำมาแช่แข็งที่ –80 องศาเซลเซียส เก็บไว้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี Spectrophotometric Method กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในการศึกษานี้จะทำการตรวจวัดโดยการบ่มสารสกัดเอนไซม์กับสับสเตรท จำเพาะในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ เมื่อสับสเตรทถูกไฮโดรไลซ์เป็น *p*-Nitro Anilide จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปสับสเตรทที่ใช้เพื่อการวิเคราะห์กิจกรรมของทริปซินและไคโมทริปซิน คือ BAPNA และ SAPNA ตามลำดับ ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์นี้ควรทำภายในวันเดียวกับที่มีการเตรียมตัวอย่างและใช้สับสเตรทที่เตรียมใหม่ทุกครั้ง

2.1 การวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของทริปซิน (Guizani et al., 1992, Erlanger et al., 1961) ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงระหว่างตัวอย่างกับสับสเตรทที่จำเพาะได้แก่ *N*-α-Benzoylarginine -*p*- Nitroanilide (BAPNA) ทำโดยการเติมสารละลายสับสเตรท 2.8 มิลลิลิตร (ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก 2.1) ลงในสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร แล้ววัด *p*-Nitroanilide ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ค่าการดูดกลืนแสง 410 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 0.1 วินาทีเป็นระยะเวลา 1 นาที

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมจำเพาะของไคโมทริปซิน (Lemos et al., 2000, Del Mar et al., 1979) โดยใช้สารละลายสับสเตรท *N*-succynyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-Nitroanilide (SAPNA) (ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก 2.2) ปริมาณ 2.8 มิลลิลิตร มาเติมลงในตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทุก 0.1 วินาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส

กิจกรรมจำเพาะของทริปซิน และไคโมทริปซิน จะสามารถตรวจได้จากค่า *p*-Nitroanilide ที่เปลี่ยนไปต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมโปรตีนของสารสกัดเอนไซม์ (p-Nitro Anilide hr^{-1}. mg^{-1} of Protein)

3. การสร้างกราฟมาตรฐานของ *p*-Nitroanilide การทำกราฟมาตรฐานของ *p*-Nitroanilide เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบผลผลิต *p*-Nitroanilideที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน ทำโดย

3.1 ละลาย *p*-Nitroanilide 0.0255 กรัม ใน 0.2 โมล Tris-HCl pH 8.4 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:25 เพื่อนำมาใช้เป็นตัวอย่างมาตรฐานที่มีปริมาณ *p*-Nitroanilide เป็น 0.1477 ไมโครโมล/ มิลลิลิตร แล้วจึงนำตัวอย่างมาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 4

3.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ *p*-Nitroanilide กับค่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การดูดกลืนแสงเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณ *p*-Nitroanilide ที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ในตัวอย่าง

ตารางที่ 4 การเจือจาง *p*-Nitroanilide ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างที่	*u*l Buffer	*u*l Standard	*u*mol Standard
1	3.00	0.00	0.00000
2	2.70	0.30	0.01477
3	2.41	0.59	0.02954
4	2.11	0.89	0.04431
5	1.81	1.19	0.05908
6	1.51	1.49	0.07385
7	1.22	1.78	0.08862
8	0.92	2.08	0.10339
9	0.62	2.38	0.11816
10	0.33	2.67	0.13293

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของตัวอย่าง

4.1 เตรียมสีย้อม BSA โดยการเจือจางสีกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 4 แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 เพื่อกำจัดอนุภาคสีที่ไม่ละลายออก สารละลายสีที่ได้นี้สามารถเก็บได้นาน 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง

4.2 เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 5 ลำดับ คือ 1.4, 0.7, 0.35, 0.175 และ 0.0875

4.3 นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 10

4.4 ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาใส่ลงในแต่ละช่องของถาด 96 หลุม ช่องละ 10 ไมโครลิตร โดยทำเป็นจำนวน 2 ซ้ำ

4.5 เติมสีย้อม BSA ลงในช่องตัวอย่าง และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน ช่องละ 20 ไมโครลิตร ผสมสีและตัวอย่างให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที สังเกตได้ว่าจะมีสีเข้มขึ้นตามระยะเวลา

4.6 ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ค่าการดูดกลืนแสง 595 นาโนเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.7 นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนของตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐาน

5. การหาปริมาณผลผลิต *p*-Nitroanilide และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จากตัวอย่าง

5.1 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัด Spectrophotometer มาหาค่า *p*-Nitroanilide ที่เกิดขึ้นโดยใช้สมการจากกราฟ

p-Nitroanilide (umol) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร/ 0.1042

5.2 คำนวณค่า *p*-Nitroanilide ที่เกิดขึ้นจริง โดยนำค่าที่ได้ ณ วินาทีที่ 60 มาลบกับค่าที่เวลา 0

p-Nitroanilide (at 60st second) = p-Nitroanilide$_{60}$ – p-Nitroanilide$_{0}$

5.3 คำนวณปริมาณโปรตีนของตัวอย่างที่เติมลงไปในการวัดค่าการดูดกลืนแสง

Loaded Protein (mg) = Protein Content (mg/ ml) x Loaded Sample (ul)/ 1000

5.4 คำนวณค่า *p*-Nitroanilide ถ้าตัวอย่างที่ใช้มีโปรตีน 1 มก.

p-Nitroanilide (at 1 mg Protein) = p-Nitroanilide (at 60th Second)/ Loaded Protein

5.5 คำนวณค่า *p*-Nitroanilide ในหนึ่งชั่วโมง ค่าที่ได้นั้นคือค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ศึกษาสำหรับหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์ (Unit; U) ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ปริมาณ p-Nitro Anilide ที่เกิดขึ้น (ไมโครโมล) ต่อชั่วโมง

6. การทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีไดอะไลซิส (Dialysis) (ดัดแปลงจาก Harris & Angal, 1989) เนื่องจากตัวอย่างที่ได้นั้นมีปริมาณโปรตีนต่ำ จึงต้องทำไดอะไลซิสเพื่อให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้นจนสามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ในขั้นตอนการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลตัวอย่างด้วยการทำอิเล็คโตรโฟริซิสได้โดย

6.1 นำตัวอย่างมาใส่ในถุงไดอะไลซิส (Snake Skin Pleated Dialysis Tubing) แล้วหนีบด้วยกริพให้แน่นสนิทดี วางลงบนถาดที่รองไว้ด้วยกระดาษฟลอยด์

6.2 เทสารโพลิเอทิลีนไกลคอล (Polyethyleneglycol) ลงบนถุงไดอะไลซิสจนท่วม ทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างเหลือประมาณ 500 ไมโครลิตร

6.3 นำตัวอย่างที่ได้นี้มาแบ่งใส่ในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

6.4 จากนั้นทำการวัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่ทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วนี้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการทำอิเล็คโตรโฟริซิส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. การทำอิเล็คโตรโฟริซิสแบบอนุรักษ์ (Native Electrophoresis) และการทำไซโมแกรม (Zymogram) เพื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ (ดัดแปลงจาก Hames & Rickwood, 1990) การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยการเตรียมตัวอย่างนั้นศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธีอิเล็คโตรโฟริซิสอนุรักษ์ (Native Electrophoresis) (ดูได้จากภาคผนวก 3-5) และมีการทำอิเล็คโตรโฟริซิสแบบย้อมเจลด้วยสับสเตรทเรียกว่าไซโมแกรม (Zymogram) (ปรับปรุงจาก Lemos et al., 2000) และทำอิเล็คโตรโฟริซิสแบบไม่มีการย้อมด้วยสับสเตรท เพื่อนำมาเปรียบเทียบแถบของโปรตีนที่มีปฏิกิริยาต่อสับสเตรท โดยมีขั้นตอนดังนี้

7.1 ประกอบแผ่นกระจกขนาด 0.75 มิลลิเมตร ของชุดอิเล็คโตรโฟริซิส แล้วนำลงไปวางใน Stand ที่ใช้แยก หรือในกรณีที่เป็นชุดประกอบสำเร็จให้ประกอบตามคู่มือของอุปกรณ์

7.2 เตรียมส่วนผสมของสารละลายอะคริลาไมด์โดยให้มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ในส่วนของ Seperating Gel เป็น 12 เปอร์เซ็นต์ และกรณีที่เป็นเจลแบบไซโมแกรมที่ต้องเตรียมเพื่อที่จะทำการ Run คู่กันกับเจลธรรมดาให้เติมสับสเตรทที่จำเพาะต่อเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาในครั้งนั้น ๆ ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเจลส่วน Separating Gel โดยนำไปแทนที่กับน้ำกลั่น (ดูส่วนผสมดังตารางที่ 5)

7.3 เทสารละลายอะคริลาไมด์ส่วน Separating Gel ลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกของชุดอิเล็คโตรโฟริซิส โดยเผื่อพื้นที่บริเวณผิวของสารละลายในส่วนของซี่หวี (Comb) ประมาณ 1 ซม. จากนั้นจึงค่อย ๆ เทน้ำกลั่นหรือ Isobutanol ลงทับสารละลายอะคริลาไมด์ เพื่อป้องกันก๊าซออกซิเจนที่มีผลยับยั้งกระบวนการโพลิเมอไรเซชันและปรับผิวหน้าของอะคริลาไมด์เจลให้เรียบเสมอกัน แล้วจึงวางชุดเจลในแนวตั้งและปล่อยให้เกิดการโพลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 20-30 นาที

7.4 หลังจากเจลจับตัวกันดีแล้วจึงเทน้ำหรือสารละลายด้านบนออก แล้วทำการล้างเจล 3-4 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น และซับน้ำที่ติดอยู่ด้วยกระดาษทิชชู

7.5 เตรียมสารละลายอะคริลาไมด์เพื่อในส่วนของ Stacking Gel (ดูส่วนผสมดังตารางที่ 5) แล้วเทส่วนผสมของ Stacking Gel ลงทับบน Seperating Gel ที่แข็งตัวดีแล้ว ล้างหวีด้วยน้ำกลั่นและเอทานอลแล้วจึงวางลงในสารละลายเจลอย่างระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ให้เกิดการโพลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 10 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 5 สูตรในการเตรียม Polyacrylamide Seperating และ Stacking Gel (Coligan, 1995)

Separating Gel	ปริมาณที่เตรียม (มิลลิลิตร)							
	5	10	15	20	25	30	40	50
• H_2O	1.7	3.3	5.0	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
• 30 % Acrymide Mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	14.0	20.0
• 1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
• 10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
• 10% APS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
• TEMED (ใส่ท้ายสุด)	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
Stacking Gel	1	2	3	4	5	6	8	10
• H_2O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
• 30 % Acrymide Mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
• 0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
• 10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
• 10% APS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
• TEMED (ใส่ท้ายสุด)	0.001	0.004	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

7.6 หลังจาก Stacking Gel จับตัวกันดีแล้วค่อย ๆ นำหวีออกอย่างตรง ๆ จากเจล ล้างช่องเติมตัวอย่างทันทีด้วยน้ำกลั่น เพื่อกำจัดอะคริลาไมด์ที่ไม่พอลิเมอไรซ์ออก แล้วประกอบเจลลงในชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรโฟริซิส เติมสารละลาย Electrode Buffer ลงในช่องด้านบนของชุดอุปกรณ์ให้สารละลายท่วมช่องเติมตัวอย่าง พร้อมทั้งตรวจหาจุดรั่วในช่องดังกล่าว ถ้าไม่มีการรั่วจึงค่อยเติม Electrode Buffer ลงในช่องด้านล่างของชุดอุปกรณ์จากนั้นจึงเอียงเพื่อไล่ฟองอากาศที่อาจติดอยู่ในเจลออกไปหรือฉีดไล่ด้วยบัฟเฟอร์

7.7 เติมโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลปริมาณ 3 ไมโครลิตร และตัวอย่างลงในช่องเจลด้วย Micro Syringe หรือ Micro Pipette โดยให้ปลายเข็มจุ่มผ่านชั้นบัฟเฟอร์และอยู่เหนือส่วนก้นของช่องเติมตัวอย่างเล็กน้อย แล้วค่อย ๆ ฉีดตัวอย่างที่เตรียมแล้ว (ภาคผนวก 3.2) ลงไปในช่องเติมตัวอย่าง โดยให้มีปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่เติมเป็น 50 ไมโครกรัม (ช่องเติมตัวอย่างมีความจุประมาณ 20 ไมโครลิตร) การเติมตัวอย่างนี้จะต้องทำเป็นคู่ในชุดอิเล็คโตรโฟริซิสเดียวกัน สารละลายตัวอย่างที่หนาแน่นจะจมลงสู่ก้นของช่องเติมตัวอย่าง พร้อมทั้งบันทึกชนิดของตัวอย่างที่ได้เติมลงไปในแต่ละช่อง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7.8 ต่ออุปกรณ์จ่ายไฟฟ้าเข้ากับชุดทดลอง ตรวจดูขั้วไฟทั้งสองด้านให้ถูกต้อง เนื่องจากโปรตีนในตัวอย่างจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ตั้งกระแสไฟให้อยู่ที่ 120โวลต์ ทำการ Run นาน 30 นาทีแล้วจึงลดกระแสไฟจนเหลือ 50 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อสังเกตเห็นว่าสีของ Bromphenol Blue เคลื่อนที่เข้าถึงส่วนล่างของเจลจึงหยุดจ่ายไฟฟ้าเข้าสู่ระบบ ตัดมุมของเจลส่วนที่อยู่ใกล้กับช่องเติมตัวอย่างช่องแรกออก จากนั้นจึงค่อย ๆ แยกส่วน Stacking Gel ออก นำส่วน Seperating Gel จุ่มลงในสาละลายสีย้อม (ภาคผนวก 3.3) หรือทำตามขั้นตอนที่ใช้เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

7.9 คู่แผ่นเจลที่ได้จากการทำอิเล็คโตรโฟริซิสนี้จะแบ่งไปทำการย้อมสี (ดัดแปลงจาก Bradford, 1976) และทำไซโมแกรมโดยแผ่นเจลแรกที่เป็นเจลธรรมดานั้นให้นำไปแช่ในสารละลาย Trichloroacetic Acid 12.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมสีพร้อมทั้งเขย่าเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จึงล้างเอาสีออกด้วยน้ำยาล้างสี (Destain) จะปรากฏแถบเข้มขึ้นทันทีส่วนแถบจางจะค่อยปรากฏภายหลัง (ภาพที่ 22)

ส่วนเจลของไซโมแกรมจะต้องนำไปแช่ในสารละลายสับสเตรทกับบัฟเฟอร์ BAPNA หรือ SAPNA ที่ต้องการวิเคราะห์เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินตามลำดับ (การเตรียมสับสเตรททำเช่นเดียวกับบัฟเฟอร์ที่ใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ในการทดลองก่อนหน้านี้) โดยจะต้องแช่เจลพร้อมทั้งเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีเพื่อให้สับสเตรทซึมเข้าสู่เนื้อเจล แล้วจึงแช่ต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 90 นาทีเพื่อให้เอนไซม์ในเนื้อเจลทำงาน จากนั้นจึงนำมาแช่ในสารละลาย Trichloroacetic Acid 12.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมสีพร้อมทั้งเขย่าเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จึงล้างเอาสีออกด้วยน้ำยาล้างสี (Destain) จะเห็นแถบใสในพื้นสีเข้มซึ่งบ่งชี้ถึงกิจกรรมของเอนไซม์ในเจล

7.10 นำคู่เจลที่ได้ผ่านการทำไซโมแกรมและเจลธรรมดามาเปรียบเทียบกันเพื่อหาแถบเจลที่ตรงกันแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในแถบเจลนั้น

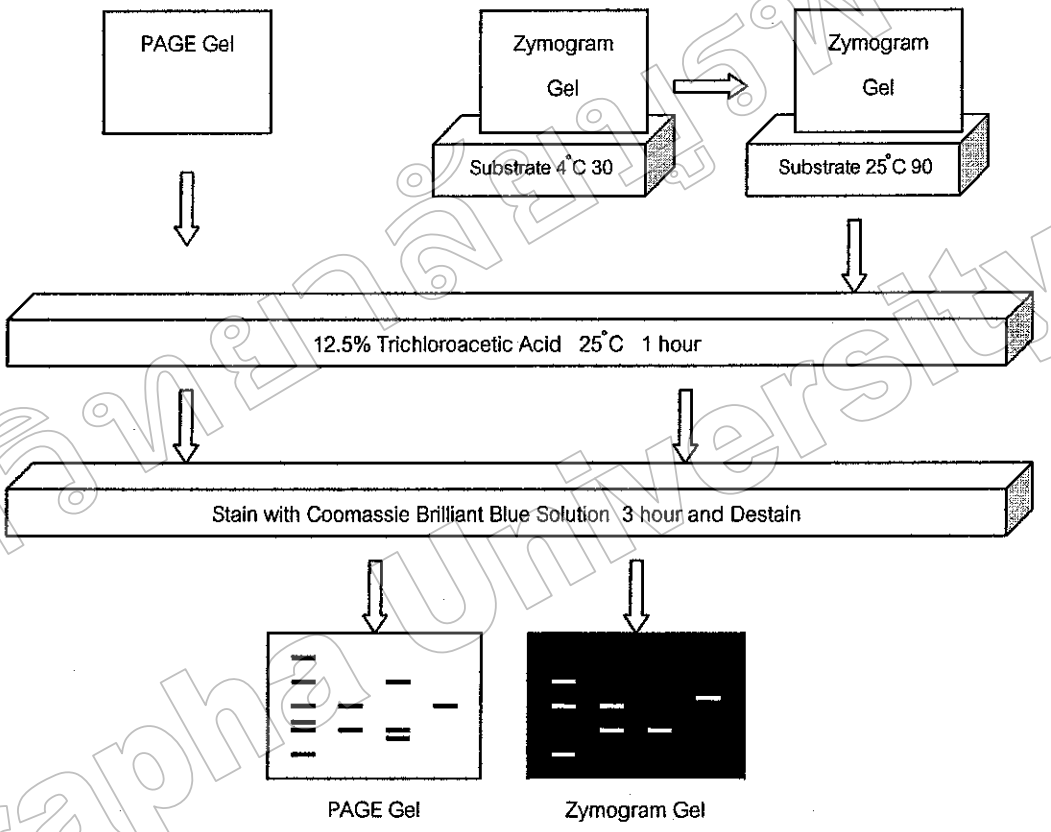
7.11 การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในแถบเจลที่ต้องการนั้นสามารถคำนวณได้จากค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของระยะทางที่เคลื่อนที่ต่อระยะทางสี (Relative Mobility Factor, Rf) กับน้ำหนักโมเลกุลของมวลโมเลกุลมาตรฐาน ดังสมการ

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่สนใจ (มิลิเมตร)}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของสี Bromphenol Blue (มิลลิเมตร)}}$$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7.12 นำค่าน้ำหนักโมเลกุลของมวลโมเลกุลมาตรฐานกับ (ดัลตัน, Da) มาคำนวณเป็นค่าลอการิทึมฐานสิบแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์กับระหว่างค่า Rf ของมวลโมเลกุลมาตรฐาน พร้อมทั้งเส้นแนวโน้มตรง

7.13 นำค่า Rf ของแถบโปรตีนที่สนใจในตัวอย่างมาคำนวณกับสูตรที่ได้จากกราฟแล้วจึงเปลี่ยนค่าลอการิทึมฐานสิบที่ได้ให้เป็นค่าน้ำหนักโมเลกุล (ดัลตัน ; Da)



ภาพที่ 22 การทำอิเล็คโตรโฟริซิสและไซโมแกรมเพื่อใช้ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ข้อมูลประสิทธิภาพของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS Version 13 โดยมีรายละเอียด ดังนี้

8.1 ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ระหว่างเพศ โดยให้อวัยวะที่ทำการศึกษา, สับสเตรท และอุณหภูมิเป็นปัจจัยคงที่ด้วย One-Way ANOVA

8.2 ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ในเพศเดียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยให้อวัยวะที่ทำการศึกษาและสับสเตรท และเป็นปัจจัยคงที่ด้วย One-Way ANOVA

8.3 ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ระหว่างเพศและอุณหภูมิโดยให้อวัยวะและสับสเตรทเป็นปัจจัยคงที่ ANOVA แบบ Univariate (Two-way ANOVA)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University