

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารและสารเคมีต่าง ๆ

1. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมล (สำหรับ 1 ลิตร)

- NaCl 8.0 กรัม
- KCl 0.2 กรัม
- Na₂HPO₄ 1.15 กรัม
- KH₂PO₄ 0.2 กรัม
- นำสารทั้งหมดใส่รวมกันเติมน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับ pH เป็น 7.4

2. การเตรียมสับสเตรทสำหรับวัดกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์

2.1 สับสเตรท: *N*- α -Benzoylarginine-*p*-Nitroanilide (BAPNA) เข้มข้น 1 มิลลิโมล

- เตรียมสารละลาย Tris-HCl 0.05 M ที่มี CaCl₂ 0.02 M
- ละลายสับสเตรทลงในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (Dimethylformamide) ปริมาณ

5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมลงในสารละลาย Tris HCl Buffer

- ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.2 (pH 8.2)
- เก็บไว้ในช่องแช่แข็งจนกว่าจะเริ่มใช้งาน

2.2 สับสเตรท: *N*-Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-Nitroanilide (SAPNA)

0.1 mM.

- เตรียมสารละลาย Tris-HCl 0.1 M ที่มี CaCl₂ 0.01 M
- ละลายสับสเตรทลงในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ (Dimethylformamide) ปริมาณ

5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมลงในสารละลาย Tris HCl Buffer

- ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.8 (pH 7.8)
- เก็บไว้ในช่องแช่แข็งจนกว่าจะเริ่มใช้งาน

3. การเตรียมสารเคมีในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบอนุรักษ (Native Electrophoresis)

3.1 4X Tris/ glycerol Sample Buffer (เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณโปรตีนน้อย)

3.1.1 เตรียม Stock Bromphenol Blue 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายสี Bromphenol Blue 0.1 กรัมลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.1.2 เตรียมสารเคมีดังนี้

		ความเข้มข้นของสาร
- Tris-HCl	3.94 กรัม	0.250 โมล
- 2-Mercaptoethanol	10 มิลลิลิตร	10 เปอร์เซ็นต์
- Stock Bromphenol Blue	2 มิลลิลิตร	0.02 เปอร์เซ็นต์

- Glycerol 20 มิลลิลิตร 20 เปอร์เซ็นต์

■ นำสารทั้งหมดใส่รวมกันเติมน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8

■ เติมน้ำเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล.

■ ส่วนผสมนี้สามารถเก็บไว้ได้ 6 เดือน ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมตัวอย่างใน Sample Buffer

- จากผลการคำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่เข้มข้นขึ้นแล้วให้เปิดตัวอย่างในปริมาณที่มีโปรตีน 1,000 ไมโครกรัม มาใส่รวมกับ Sample Buffer จนได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

- เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลองขั้นต่อไป

3.3 การเตรียมสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250

3.3.1 การเตรียมผงสี เตรียมสารเคมี ดังนี้

- ผงสี Coomassie Brilliant Blue G-250	4	กรัม
- 7.5 เปอร์เซ็นต์ Acetic Acid	250	มิลลิลิตร
- Ammonium Sulfate	44	กรัม

■ ละลายผงสีลงใน Acetic Acid ให้ความร้อนถึง 70 องศาเซลเซียส เติม Ammonium Sulfate คนให้ละลายจนหมด แล้วทิ้งไว้จนเย็นลง

■ ทำการกรองหรือปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 นาน 10 นาที และดูดส่วนน้ำทิ้ง

■ ทิ้งไว้จนสีแห้งดี

3.3.2 การเตรียมสารละลายสีย้อม

- ผงสี Coomassie Brilliant Blue G-250	0.1	กรัม
- Ethanol	40	มิลลิลิตร
- Acetic Acid	10	มิลลิลิตร

■ ละลายผงสีกับส่วนผสมอื่น คนจนผงสีละลายหมด

■ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

■ ใช้ส่วนผสมเดียวกันยกเว้นผงสีเพื่อเตรียมสารละลายสำหรับล้างสี

3.4 5X Electrode Buffer สำหรับเตรียมสาร 500 มิลลิลิตร

- Tris-Base	7.5	กรัม
- Glycine	36	กรัม
- SDS	2.5	กรัม

■ ส่วนผสมนี้จะต้องเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 ก่อนใช้

3.5 สารเคมีในการเตรียม Polyacrylamide Gel

3.5.1 อะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซนต์

- Acrylamide 29.2 กรัม

- Bisacrylamide 0.8 กรัม

■ ผสมสารทั้งสองเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

■ กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

■ เก็บสารละลายไว้ในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนผสมนี้สามารถเก็บไว้ได้ 30 วัน หลังจากนั้นอะคริลาไมด์จะเปลี่ยนรูปไปเป็น กรดอะคลิริกและแอมโมเนีย

3.5.2 1.5 M Tris

- Tris-HCl 3.692 กรัม

- Tris-Base 15.39 กรัม

- SDS 0.4 กรัม

■ ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ปรับค่า pH เป็น 8.8 และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.3 0.5 M Tris

- Tris-HCl 7.470 กรัม

- Tris-Base 0.315 กรัม

- SDS 0.4 กรัม

■ ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับ

ค่า pH เป็น 6.8 และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.4 10 เปอร์เซนต์ SDS

■ Ammoniumpersulfate (APS) 0.1 กรัม

■ เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันดี

■ ส่วนผสมนี้สามารถใช้ได้ภายใน 24 ชั่วโมงและควรเก็บในที่เย็น

3.5.5 10 เปอร์เซนต์ APS

- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0.1 กรัม

■ เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันดี เก็บส่วนผสมนี้ในที่เย็น

ภาคผนวก ข

รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำอิเล็กทรอนิกส์

รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (Walker, 1994)

1. Stock Acrylamide ที่จะใช้นั้นจะมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการทำ SDS Gel
2. เพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนทำการศึกษาจึงไม่ควรทำให้เจลร้อนเกินไป ดังนั้นจึงควรทำ Electrophoresis ในห้องที่เย็นหรือทำให้บัฟเฟอร์ที่ใช้นั้นเป็นระบบหมุนเวียนผ่านจุดจ่ายความเย็น (มีอุปกรณ์หลายชนิดที่ออกแบบมาเพื่อให้บัฟเฟอร์สามารถลดอุณหภูมิของแผ่นเจลได้) หรืออาจทำ Electrophoresis ในกระแสไฟฟ้าที่ต่ำหรือใช้เวลานานในการทำมากขึ้น
3. การแยกสารใน Separating Gel จะทำที่ pH 8.8 ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่จะมีประจุเป็นลบ และจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก อย่างไรก็ตาม Base Protein จะเคลื่อนที่ไปในทางตรงข้ามและออกจากเจลในที่สุด พวกโปรตีนทั่วไปจึงควรทำการแยกในสภาวะกรด
4. ความเข้มข้นของ Separating Gel อาจทำให้การจับตัวของโปรตีนแล้วตกตะกอนได้ แม้ว่า pH ของ Stacking Gel (6.8) อาจมีผลต่อกิจกรรมของโปรตีนที่ต้องการศึกษาได้ เช่น ไม่สามารถตรวจเจอโปรตีนบนเจล ก็ควรทำการเตรียมเจลโดยไม่ต้องมี Stacking Gel แต่จะทำให้ความคมของแถบโปรตีนที่แยกได้ไม่ค่อยดีนัก แต่ก็เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์สาร โดยทั่วไป
5. สับสเตรทที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะสามารถแพร่กระจายอยู่ในเจลและเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนสีหรือเรืองแสง (ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น) อย่างไรก็ตามสับสเตรทแบบนี้ไม่ได้มีสำหรับเอนไซม์ทุกชนิด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการออกแบบการทำ Assay ให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทสามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นสารที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่ง Assay ของส่วนที่สัมพันธ์กันนี้อาจต้องมีเอนไซม์อื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง 2-3 ชนิด เพื่อให้สร้างเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งในกรณีเช่นนี้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมักจะเกิดอยู่บนผิวของเจล เนื่องจากขณะที่เอนไซม์จับกับสับสเตรทอยู่จะไม่สามารถกระจายในแผ่นเจลได้โดยง่าย ดังนั้นจึงต้องใช้ Zymogram Technique โดยเติมสับสเตรทผสมลงในสารละลาย Agarose (1%) ที่เย็นแต่ยังไม่แข็งในบัฟเฟอร์ โดยจะต้องเทสารผสมสับสเตรทลงบนแผ่นเจลให้ทั่วแผ่นเจลที่แข็งแล้วอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะ Set ตัวเข้ากับแผ่นเจลด้านล่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำ Assay นี้จะเกิดในบริเวณที่สัมผัสกันของเจลทั้งสองชั้นซึ่งจะไม่สามารถล้างออกได้
6. ในการแยกสารโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE อาจเกิดความเสียหายได้ในหลายขั้นตอน และจากหลายสาเหตุ โดยสามารถแบ่งแยก และแก้ไขได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการเตรียม และการใช้ SDS-Gel (Walker, 1994)

ข้อผิดพลาด	สาเหตุ	การแก้ปัญหา
1. สร้างเจลไม่ได้หรืออัตราการ Form Gel ช้าลง	1. มีก๊าซออกซิเจนในสารละลาย 2. Stock Solution โดยเฉพาะ Acrylamide และ Ammonium Persulfate ที่ใช้หมดอายุ	1. ทำการ degas ในสารละลาย 2. เตรียม stock solution ใหม่
1. ผิวหน้าของเจลเหนียว	1. มีสาร Butan-2-ol ซึมออกมาบนเจล	1. เทเจลทับลงบนสาร Butan-2-ol ทับลงไปบนสารละลายเจลโดยไม่ต้องคนหรือผสม และพยายามไม่ให้สารไหลผ่านขึ้นมาบนผิวเจล
2. ช่องตัวอย่างเสียหาย		
2.1 ร่องตัวอย่างบิดเบี้ยวหรือเสียหาย	1. ขณะนำแบบ (Comb) ออกนั้นเกิดการกระทบต่อ Stacking Gel ที่มากขึ้น	1. เอาแบบออกอย่างระมัดระวัง หรือใช้เจลที่มี % T ต่ำลง
2.2 แผ่นร่องชำรุดหรือโหว่ไป	2. แบบ (Comb) ที่ใช้นั้น หลวมเกินไป	2. เปลี่ยนไปใช้แบบที่พอดี
4. เกี่ยวกับลักษณะแถบที่ได้จากการย้อม		
4.1 สีตก	1. สีย้อมหลุดออกจากโปรตีนที่จับอยู่	1. ทำการย้อมเจลใหม่ โดยลดเวลาในการล้างหรือใช้สีย้อมที่ล้างออกยากขึ้น เช่น Procion Navy MXRB
4.2 สีย้อมติดแบบไม่จำเพาะ	2. มีก้อนสีในสารละลายย้อม	2. ในการเติมสารละลายสีควรตรวจสอบให้แน่ใจว่าละลายดี หรือกรองก่อนจะนำมาใช้

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ข้อผิดพลาด	สาเหตุ	การแก้ปัญหา
4.3 พบสิ่งปนเปื้อน	1. เครื่องมือหรือ Stock Solution มีการปนเปื้อน 2. สารที่ไม่ใช่โปรตีนในตัวอย่างถูกย้อมติดไปด้วย เช่น กรดนิวคลีอิก 3. ตัวอย่างปนเปื้อนข้ามกัน เพราะเติมมากเกินไป หรือเกิดการไหลซึมออกด้านข้างในระหว่างชั้นเจล	1. ทำความสะอาดหรือทดลองเฉพาะส่วนที่จำเป็น 2. ลองเปลี่ยนชนิดของสีย้อม เพื่อให้ติดสิ่งปนเปื้อนในตัวอย่างได้ 3. อย่าเติมตัวอย่างลงในช่องเติมมากเกินไป และตรวจสอบการผสมกันของชั้นเจล โดยทำการล้างเจลที่ Polymerize แล้วจึงเติมเจลอีกชั้นเข้าไป
5. แถบของโปรตีนเกิดน้อยกว่าที่ควรเป็น	1. ใช้ระยะเวลาในการ Run เจลน้อยเกินไป 2. ขนาดของอนุภาคใน Separating Gel ไม่เหมาะสมกับสารตัวอย่าง	1. Run เจลให้นานขึ้น 2. ปรับเปลี่ยน % T หรือ % C ในส่วนของ Separating Gel
6. แถบที่แยกได้มีลักษณะบิดเบือนไป		
6.1 แถบที่แยกออกได้มีรอยค่างหรือเป็นริ้ว	1. โปรตีนในตัวอย่างยังไม่ละลายดี หรือจับรวมกันอยู่ในสารทำละลายตัวอย่าง 2. มีสารที่ไม่ละลายหรือฟองอากาศในเจลสัมผัสกับแถบของโปรตีนที่เคลื่อนที่ผ่านไป	1. ใช้ตัวทำละลายตัวอย่างที่เตรียมใหม่ ๆ และ/หรือใช้ SDS ในปริมาณมากที่ประกอบด้วยสาร Reducing Agent โดยเฉพาะเมื่อทำการแยกสารละลายตัวอย่างที่เข้มข้นสูง 2. กรอง Stock Solution ก่อนการใช้และขจัดฟองอากาศออกจากส่วนผสมเจล

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ข้อผิดพลาด	สาเหตุ	การแก้ปัญหา
	3. ขนาดของรูพรุนในเจลนั้นไม่สม่ำเสมอ	3. การเตรียมส่วนผสมเจลควรแน่ใจว่าสารละลายนั้นเข้ากันได้ดีและการเกิด Polymerize นั้นไม่เร็วเกินไป (การลดปริมาณ Ammonium persulfate จะช่วยลดความเร็วของปฏิกิริยาได้)
6.2 การเคลื่อนที่ของโปรตีนบนแผ่นเจลไม่สม่ำเสมอ (แถบที่ได้หรือเบี่ยงไม่เป็นเส้นตรง)	1. ส่วนใดส่วนหนึ่งของเจลถูกขีดขวาง 2. เกิดการรั่วไหลของกระแสไฟฟ้า 3. ระบบทำความเย็นของเจลทำหน้าที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้บางส่วนของเจล Run ได้เร็วกว่าส่วนอื่นๆ 4. แถบที่ได้หรือช่วงที่อยู่ใกล้กันมาจากการเดิมตัวอย่างที่มากเกินไป 5. ตำแหน่งที่เดิมตัวอย่างในการวิเคราะห์ห้อยปลายๆ ของแถวที่เดิมตัวอย่าง (เกิด End Well Effect)	1. กำจัดฟองอากาศในเจลก่อนทำการ Run 2. ตรวจสอบว่า Side Spacer อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม 3. ปรับส่วนทำความเย็นหรือทำการลดความร้อนโดยกระแสไฟหรือลดความดัน Ionic ในบัฟเฟอร์ลง 4. ทำ Electrophoresis ใหม่ โดยเติมสารให้น้อยลง เพิ่มระยะห่างระหว่างเจลที่มีการเดิมตัวอย่างมาก ๆ มี ถ้าจำเป็นอาจปรับเปลี่ยนระบบเพื่อไม่ให้แถบใกล้เคียงเข้ามาผสมกัน 5. หลีกเลี่ยงการใช้ช่องเดิมตัวอย่างที่อยู่ด้านปลายมาก ๆ
6.3 ลักษณะความหนาของแถบนั้นไม่สม่ำเสมอ	1. เดิมตัวอย่างในการวิเคราะห์ลงในช่องอย่างไม่สม่ำเสมอ	1. ตรวจสอบว่าก้นของช่องเดิมตัวอย่างนั้นเป็นทางตรงตามแนวดิ่ง

ภาคผนวก ค

คำย่อของสัปดาห์ที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

คำย่อของสับสเตรตที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์

ATEE	คือ <i>N</i> -Acetyl-L-Tyrosine Ethyl Ester
BAEE	คือ Benzoyl-Arginine-Ethyl Ester
BAPA	คือ <i>N</i> - α -Benzoyl-Arginine-p-Nitroanilide
BAPNA	คือ <i>N</i> - α -Benzoyl-D-L-Arginine-p-Nitroanilide
BTEE	คือ Benzoyl-Tyrosine-Ethyl Ester
<i>L</i> -ZAPA	คือ <i>Z</i> -Arginine-p-Nitroanilide
SAAPFNA	คือ Succinyl-Alanine-Alanine-Proline-Phenylalanine-p-Nitroanilide
SAAPPNA	คือ Succinyl-Alanine-Alanine-Proline-Phenylalanine-p-Nitroanilide
SAPPA	คือ Succinyl-Alanine-Alanine-Proline-Phenylalanine-p-Nitroanilide
TAME	คือ Tosylarginine-Methyl Ester