ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

สารละลายป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant)

Tri-Sodium Citrate (0.45 M NaCl, 0.1 M Glucose, 30 mM Trisodium Citrate, 23 mM Citric Acid, 10 mM EDTA)

1. NaCl	0.6574	กรัม
2. Glucose	0.4504	กรัม
3. Tri-Sodium Citrate	0.1208	กรัม
4. EDTA	0.0931	กรัม
5. น้ำกลั่นปริมาตร	25	มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับเตรียมตัวอย่างเหงือก

Tris-HCl Buffer (50 mM Tris-HCl)

1. Tris-HCl	0.3028	มิลลิกรัม
2. น้ำกลั่นปริมาตร	50	มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับการวิเคราะห์ Lysosomal Stability

1. Neutral Red (Stock)

1.1 Neutral Red Dye	20	มิลลิกรัม
1.2 Dimethyl Sulphoxide	1	มิลลิลิตร

2. Crab Physiological Saline (0.5 M NaCl, 11 mM KCl, 12 mM $CaCl_2.6H_6O$, 26 mM $MgCl_2$, 45 mM Tris pH 7.4)

2.1 NaCl	2.922	กรัม
2.2 KCl	0.0821	กรัม
2.3 $CaCl_2.6H_2O$	0.1764	กรัม
2.4 $MgCl_2$	0.05281	กรัม
2.5 Tris	0.5451	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย HCl

3. Neutral Red (สำหรับใช้)

3.1 Neutral Red (Stock) (ข้อ 1.)	10	ไมโครลิตร
3.2 Crab Physiological Saline (ข้อ 2.)	5	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารละลายสำหรับการวัดการทำงานเอ็นไซม์คะตะเลส (Catalase Activity)

Na-Phosphate Buffer (100 mM Na_2HPO_4, 100 mM NaH_2PO_4)

1. Na_2HPO_4	1.7907	กรัม
2. NaH_2PO_4	0.7800	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร

สารละลายวัดการทำงานของเอ็นไซม์กลูตาไธโอน-เอส-ทรานเฟอเรส (Glutathione-S-Tranferase)

1. CDNB (20 mM 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene)

1.1 CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene)	0.0405	กรัม
1.2 Ethanol	10	มิลลิลิตร

2. Glutathione (100 mM Reduce Glutathion, GSH) เก็บในตู้เย็น

2.1 Reduce Glutathion	0.0307	กรัม
2.2 น้ำกลั่นปริมาตร	1	มิลลิลิตร

3. Phosphate Buffer (200 mM K_2HPO_4, 200 mM KH_2PO_4)

3.1 K_2HPO_4	1.7418	กรัม
3.2 KH_2PO_4	1.3609	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร

สารละลายวัดการทำงานของเอนไซม์อะซิติวโคลีนเนลเตอเรส (Acetylcholinesterase)

1. 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzene (0.01 mM 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzene)

5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzene	0.0396	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

2. Acetylthiocholine (0.1 M Acetylthiocholine)

Acetylthiocholine	0.0197	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

สารละลายสำหรับวัดความเข้มข้นของฮีโมไซยานิน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

Tris/ $CaCl_2$ Buffer (50 mM Tris/ 10 mM $CaCl_2$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. Tris	6.057	กรัม
2. $CaCl_2$	1.4702	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

สารเคมีสำหรับการทำ SDS-PAGE

1. Stacking Gel Buffer (0.5 M Tris-Cl pH 6.8)

Tris	3	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย HCl

2. Resolving Gel Buffer (1.5 M Tris-Cl pH 8.8)

Tris	36.3	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร และปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย HCl

3. 10% SDS

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

4. 10% Ammonium Persulfate (เตรียมทันทีที่ใช้)

Ammonium Persulfate	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร

5. Tank Buffer (0.025 M Tris-Cl pH 8.3 0.192 M Glycine 0.1%SDS)

Tris	6	กรัม
Glycine	28.8	กรัม
SDS จากข้อ 3.	20	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น เป็น 2 ลิตร

6. Bromophenol Blue

Bromophenol Blue	100	มิลลิกรัม
ปรับปริมาตรด้วย 10% EtOH เป็น	5	มิลลิลิตร

7. 2X Treatment Buffer

Tris จากข้อ 1.	2.5	มิลลิลิตร
SDS จากข้อ 3.	4	มิลลิลิตร
Glycerol	2	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร
Bromophenol Blue จากข้อ 6	0.5	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

8. Stain Stock

Coomassie Blue R-250	2.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1

9. Stain

Coomassie Blue R-250	62.5	มิลลิลิตร
Methanol	125	มิลลิลิตร
Acetic Acid	50	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร

10. Destaining Solution I

Acetic Acid	100	มิลลิลิตร
Methanol	500	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

11. Destaining Solution II

Acetic Acid	70	มิลลิลิตร
Methanol	50	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. สี Coomasie Brilliant Blue G250 (0.01% Coomasie, 4.7% Ethanol and 8.5% Phosphoric Acid)

1.1 สี Coomasie Brilliant Blue	100	มิลลิกรัม
1.2 ละลายใน 95% Ethanol	50	มิลลิลิตร
1.3 เติม 85% Phosphoric Acid	100	มิลลิลิตร.

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

2. Bovine Serum Albumin

2.1 Bovine Serum Albumin	10	มิลลิกรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

วิธีคำนวณ Enzyme Activity

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

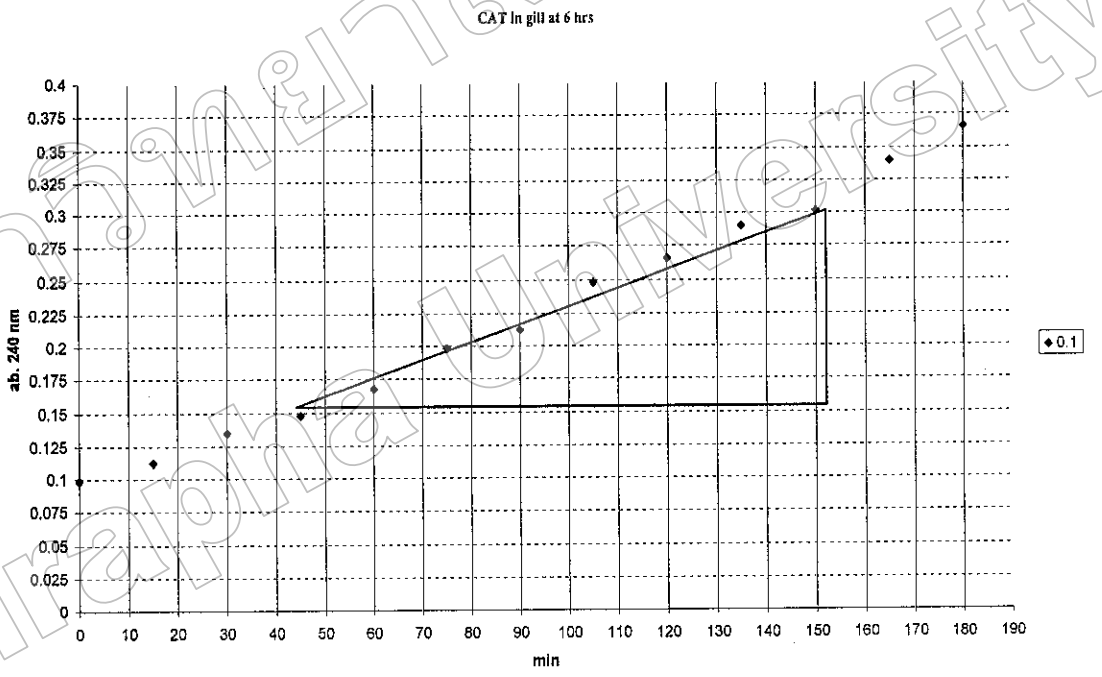
1. วิธีคำนวณการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส

CAT Activity = [△ OD/ min X □ H_2O_2]/ mg Protein

* โดยที่ □ H_2O_2 = 40 mM^{-1}

หน่วยที่ได้ = mM/ min/ mg Protein

ตัวอย่างการคำนวณ



ภาพที่ 47 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของการทำงานเอนไซม์คะตะเลส

△OD/ min = Slop/ min

= 0.9820

[Protein] = 0.7121

AChE Activity = (0.9820 x 1000)/ (0.7121 x 40 x 2)

= 17.24 mM/ min/ mg Protein

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

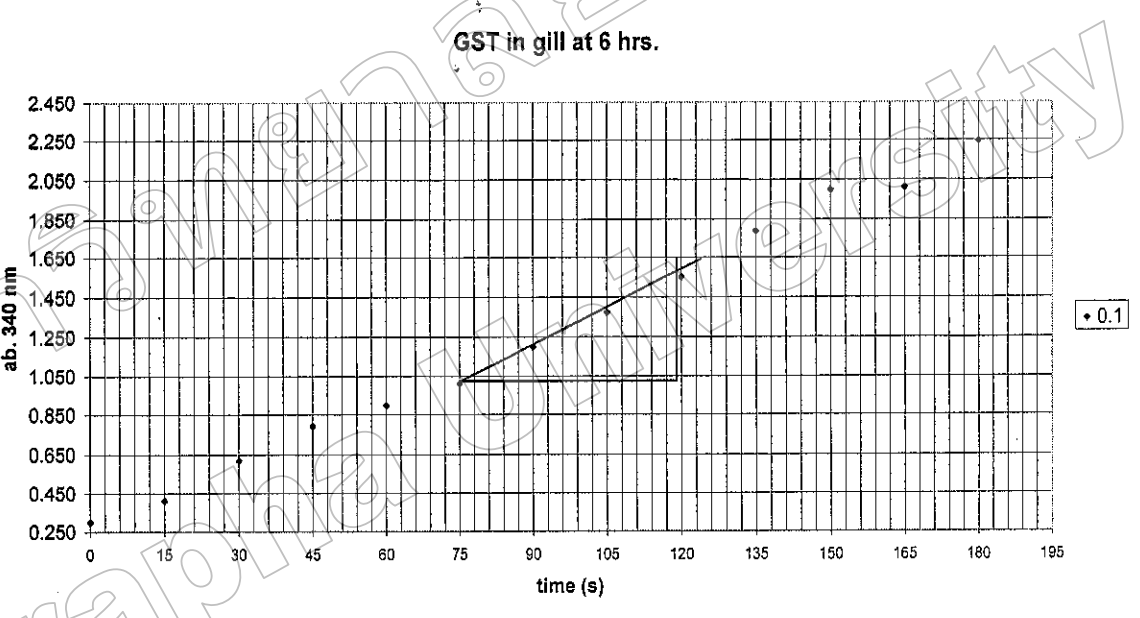
2. วิธีคำนวณการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส

GST Activity = [△ OD/ min x □ CDNB]/ mg Protein

*โดยที่ □ CDNB = 9.6 nM^{-1}

หน่วยที่ได้ = nM/ min/ mg Protein

ตัวอย่างการคำนวณ



ภาพที่ 48 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของการทำงานเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส

△ OD/ min = Slop/ min

= 0.6539

[Protein] = 0.8562

GST Activity = (0.6539 x 1000)/ (1.4323 x 9.6 x 5)

= 15.91 nM/ min/ mg Protein

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

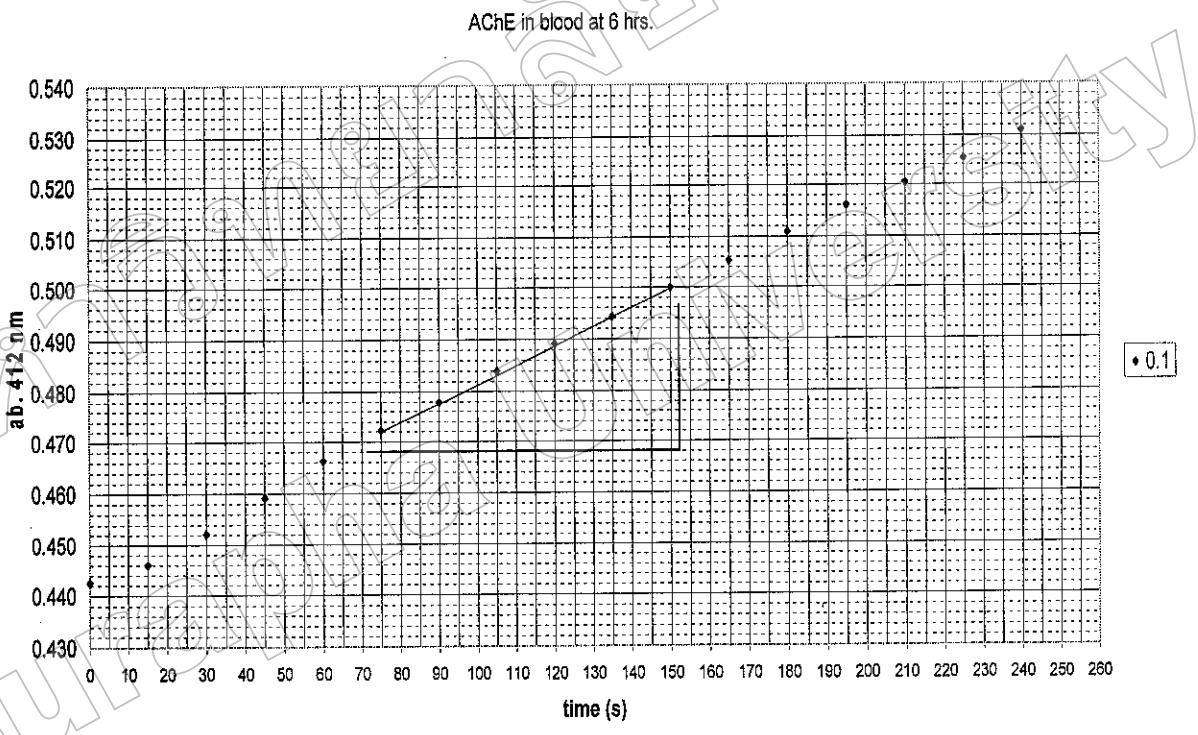
3. วิธีคำนวณการทำงานของเอนไซม์อะซิลทิลโคลีนเอสเตอเรส

AChE Activity = [△ OD/ min X □ ATIC]/ mg Protein

*โดยที่ □ATIC = 75 nM^{-1}

หน่วยที่ได้ = nM/ min/ mg Protein

ตัวอย่างการคำนวณ



ภาพที่ 49 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

△OD/ min = Slop/ min

= 0.0222

[Protein] = 1.4323

AChE Activity = (0.0222 x 1000)/ (1.4323 x 75 x 70)

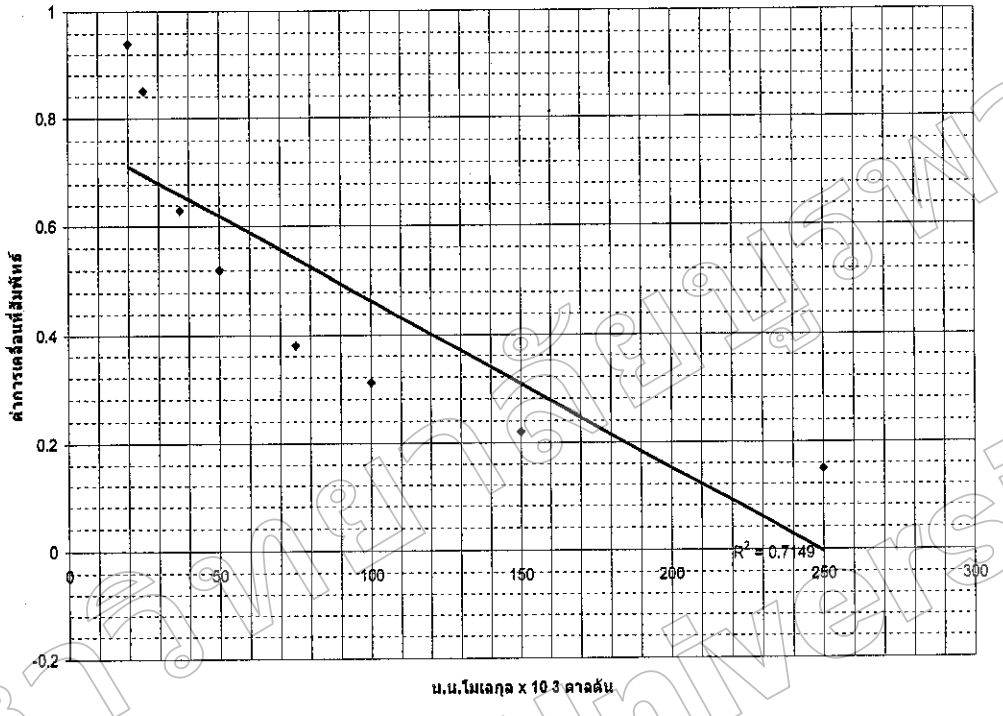
= 0.0029 nM/ min/ mg Protein

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานโปรตีน

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE



ภาพที่ 50 โปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าน้ำหนักโมเลกุล และค่าการเคลื่อนที่สัมพันธ์

หาค่า R_f = [ระยะการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน/ ระยะการเคลื่อนที่สุดของแถบโปรตีน]

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University