บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือ

2.1.1 Varian techtron UV-Vis spectrophotometer
model 635
ผลิตโดย Varian techtron PTY Ltd., Australia.

2.1.2 Unicam sp.8000 UV-Vis spectrophotometer
ผลิตโดย Pye unicam Ltd., Cambridge, England.

2.1.3 Visible spectrophotometer (Spectronic 20)
ผลิตโดย Bausch & Lomb Inc. Ltd., U.S.A.

2.1.4 Fraction collector
ผลิตโดย LKB. Sweden

2.1.5 Freeze dryer (Lyophilizer)
ผลิตโดย The Virtis company, Gardiner, New York

2.1.6 pH-meter type PHM 26
ผลิตโดย Radiometer Copenhagen, Denmark

2.1.7 Shakerbath
ผลิตโดย Cenco, Netherland.

2.1.8 Refrigerated high speed centrifuge I.E.C. Model B
2015 Head I.E.C. number 870. International Equipment
company, Massachusette, U.S.A.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 สารเคมี

2.2.1 NaCl (Poulabo, Rhone Poulene)

2.2.2 Soluble Starch (E.Merck,, Germany)

2.2.3 $(NH_4)_2SO_4$ (May & Baker Ltd., Dagenham,England)

2.2.4 $Na_2HPU_4.12H_2O$ (May & Baker Ltd., Dagenham,England)

2.2.5 $Na_2HPO_4.2H_2O$ (E.Merck, Germany)

2.2.6 Citric acid (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.7 NaOH (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.8 I_2 (E.Merck, Germany)

2.2.9 KI (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.10 Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (E.Merck, Germany)

2.2.11 $CuSO_4.5H_2O$ (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.12 Na_2CO_3 (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.13 Albumin bovine (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)

2.2.14 Folin-Ciocalteu's reagent (Poolabo, Rhone Poulene)

2.2.15 Potassium tartrate (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.16 Sephadex G-50, G-100 (phamacia, Uppsala, Sweden)

2.2.17 Blue dextran (Sigma chemical company, U.S.A.)

2.2.18 DEAE-Cellulose, capacity 0.89 meq/g (Sigma chemical company, U.S.A.)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.19 $CaCl_2$ (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)

2.2.20 $CaSO_4.2H_2O$ (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.21 $MgCl_2.6H_2O$ (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.22 $MgSO_4$ (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)

2.2.23 $ZnCl_2$ (BDH Chemicals Ltd., Poole, England)

2.2.24 $ZnSO_4.7H_2O$ (E.Merck, Germany)

2.2.25 1,10-phenanthrolin (E.Merck, Germany)

2.2.26 β-Mercaptoethanol (BDH Chemical Ltd., Poole, England)

2.2.27 Glycine (Hopkin and William Ltd.)

2.2.28 Acrylamide (Fluka, A.G.Buch, Switzerland)

2.2.29 Ammonium persulfate (BDH Chemical Ltd., Poole, England)

2.2.30 N,N'-methylene bis(acrylamide) (BDH Chemical Ltd., Poole, England)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.31 TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) (BDH chemical Ltd., Poole, England)

2.2.32 Riboflavin (BDH chemical Ltd., Poole, England)

2.2.33 Bromophenol blue (BDH chemical Ltd., Poole, England)

2.2.34 Amido black (Fluka, A.G.Buch, Switzerland)

2.2.35 Glacial acetic acid (May & Baker Ltd., Dagenham, England)

2.2.36 Sucrose (E.Merck, Germany)

2.3 Sample : สารตัวอย่างต่าง ๆ ที่ใช้ทดลองซื้อจากตลาดวโรรส เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การทดลอง

2.4.1 การเตรียม Sephadex G-50

ชั่ง Sephadex G-50 มา 15 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 400 มล. ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง ในขณะที่แช่เจลหมั่นใช้แท่งแก้วคนบ่อย ๆ จากนั้นนำไป pack ใน column (2.5x20 ซม.) จำนวน 2 column

Check void volume โดยใช้ 0.2 % สารละลาย blue dextran

2.4.2 การเตรียม DEAE-Cellulose

1. ชั่ง DEAE-Cellulose มา 15 กรัม แช่ใน 250 มล. ของ 0.5M HCl คนด้วย Magnetic stirrer เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ค่อย ๆ รินเอาผงละเอียดที่อยู่ตอนบนออกไป
2. ล้างด้วยกรดเดิมหลาย ๆ ครั้งบน buchner funnel จนสารละลายมี pH ประมาณ 4
3. กวน Slurry ด้วย 0.4 M NaOH -0.4 M NaCl mixture ด้วย magnetic stirrer แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. ล้าง DEAE-cellulose ซ้ำหลาย ๆ ครั้งด้วย 0.4 M NaOH -0.4 M NaCl mixture บน buchner funnel
5. เติม 0.5 M HCl (acid component ของ buffer) ลงไปแล้ววัด pH ให้ต่ำกว่า 4.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. เติม 0.5 M Tris (basic component ของ buffer) จนมี pH 7.5

7. ทำการ equilibrate โดยแช่ใน 200 มล. ของ 0.0075 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 (starting buffer) ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเทเอา supernatant ออก

8. ทำการทดลองซ้ำจน supernatant มี pH 7.5 ตามที่ต้องการ

9. เท DEAE-Cellulose ลงใน column (2.5x30 ซม.) ใช้ starting buffer ผ่านหลาย ๆ ครั้ง จน DEAE-Cellulose อยู่ตัว

2.4.3 การเตรียม Sephadex G-100

ชั่ง Sephadex G-100 มา 20 กรัม แช่ใน 500 มล. 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 ที่ร้อน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไป pack ใน column (3.2x40 ซม.) เทบัฟเฟอร์ผ่าน column หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งเจลอยู่ตัว

Check void volume โดยใช้ 0.2 % สารละลาย blue dextran

2.4.4 การ purify α-Amylase จากน้ำลาย (18)

เก็บน้ำลายจากนักศึกษาปริญญาโทผู้ชายมา 22 มล. แช่ไว้ในตู้เย็น 1 คืน จากนั้นนำไปกรองด้วยใยแก้ว (glass wool) 2 ครั้ง แบ่งน้ำลายที่กรองได้มา 5.0 มล. ใช้ pasteur pipet ดูดน้ำลายมาแล้วค่อย ๆ หยดลงบนผิวหน้าของเจลใน Sephadex G-50 column ขนาด 2.5x20 ซม. ซึ่ง equilibrate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น elute น้ำลายด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ flow rate 145 มล./ชั่วโมง เก็บ fraction ของสารที่แยกออกมาจาก column หลอดละ 5.8 มล. ด้วยเครื่อง fraction collector

นำ fraction ต่าง ๆ ไปวัด Absorbance ที่ 280 nm ด้วยเครื่อง Varian Techtron UV-Vis spectrophotometer model 635

2.4.5 <u>การทดสอบ activity ของ α-Amylase ที่ purify ได้จากน้ำลาย</u> (4)

<u>การเตรียม</u>

1. 0.02 % สารละลายไอโอดีนใน 0.2 % KI จำนวน 1 ลิตร (เก็บในที่มืดไว้ใช้ตลอดการทดลอง)
2. สารละลายแป้งในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 250 มล. ประกอบด้วย

NaCl	=	1.5 มก.
Soluble starch	=	15 มก,
40 mM phosphate buffer, pH 6.9	=	2.5 มล.

<u>การทดลอง</u>

แบ่ง fraction ที่เก็บได้ในข้อ 2.4.4 มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 เท่า แล้วดูดสารละลายแต่ละหลอดที่เจือจางแล้วมา 0.1 มล. เติมลงไปใน 2.4 มล. ของสารละลายแป้งในบัฟเฟอร์ เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไป incubate ที่ 37 °ซ ใน shakerbath เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูดสารละลายมา 0.1 มล.เติมลงใน 5.0 มล. ของสารละลายไอโอดีนเขย่าให้เข้ากันนำไปวัด Absorbance ที่ 680 nm ด้วยเครื่อง Spectronic 20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำ blank เปรียบเทียบโดยไม่ต้องเติมสารละลายจาก fraction ต่าง ๆ

α-Amylase activity (mg/ml/min.) หาได้โดยวัดปริมาณของสับสเตรท (น้ำแป้ง) ที่เหลือโดยคำนวณจาก standard curve ของสารละลายแป้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงรูปที่ 3.1

เก็บ active fraction (No. 5-9) รูปที่ 3.2 ในตู้เย็น โดยเติม 2.0 มล. ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไว้ใช้ตลอดการทดลอง

2.4.6 <u>การหาปริมาณโปรตีนของ α-Amylase โดย Lowry method</u> (19)

<u>การเตรียม</u>

1. สารละลาย A ประกอบด้วย 2 % Na_2CO_3 ใน 0.1 N NaOH จำนวน 100 มล.
2. สารละลาย B ประกอบด้วย 0.5 % $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ใน 1.0 % sodium tartrate จำนวน 50 มล.
3. สารละลาย C ได้จากการผสมสารละลาย A : B = 50:1 จำนวน 1 ลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)
4. นำ Folin-Ciocalteau reagent ไปทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นหนึ่งเท่าจำนวน 50 มล.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. เตรียม standard protein โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) ขัน 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 มก./มล. อย่างละ 50 มล.

6. แบ่ง active fraction ของ α-Amylase มาทำให้เจือจาง 20 เท่า จำนวน 5 มล.

การทดลอง

ใส่ 5.0 มล. ของสารละลาย C ลงใน 1.0 มล. ของสารละลาย BSA มาตราฐานขัน 0.05 มก./มล. ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นจึงเติม 0.5 มล. ของ Folin-Ciocalteau reagent ที่เจือจางแล้วลงไปพร้อมกับผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วทันที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัด Absorbance ที่ 750 nm ด้วยเครื่อง Spectronic 20

เปลี่ยนสารละลาย BSA มาตราฐานเป็นขัน 0.1, 0.2 และ 0.3 มก./มล. ตามลำดับ แล้วทำการทดลองเหมือนเดิมทุกประการ

นำค่า Absorbance ที่วัดได้จากความเข้มข้นต่าง ๆ ไป plot standard curve

เปลี่ยนสารละลาย BSA มาตราฐานเป็น α-Amylase ที่ทำให้เจือจางแล้วไปทดลองเหมือนวิธีข้างต้น หาความเข้มข้นของโปรตีนจาก standard curve (รูปที่ 3.3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.7 การตรวจหาตัวยับยั้งเอ็นไซม์อัลฟา-อะมิเลสในพืชบางชนิด

นำข้าวเหนียว มันแกว หัวกลอย มันฝรั่ง มันเทศ และหัวเผือก มาชนิดละ 100 กรัม ผสมกับน้ำ 300 มล. แล้วปั่นในเครื่องปั่น กรอง suspension ด้วย glass wool เก็บส่วนที่เป็น supernatant ไว้

นำ supernatant มาทำให้เป็น 0-20 % sat.$(NH_4)_2SO_4$ และ centrifuge ที่ 5000 g ที่ 25°ซ เป็นเวลา 20 นาที เก็บ Supernatant ไว้ แล้วนำ supernatant ส่วนนี้ไปทำให้เป็น 20-75 % sat.$(NH_4)_2SO_4$ และ centrifuge ที่ condition เดิมเก็บตะกอน (precipitate) ไว้

ละลายตะกอนใน 30 มล. ของน้ำแล้วนำไป dialyse ในน้ำเย็น 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ condition เดิม เก็บส่วนที่เป็นน้ำจากการ dialyse (dialysate's supernatant) ไว้ใช้สำหรับการทดลอง

2.4.8 การทดสอบ α-Amylase inhibitory activity

การเตรียม

1. สารละลาย NaCl ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 500 มล. ประกอบด้วย

   NaCl = 1.5 มก.

   40 mM phosphate buffer pH 6.9 = 1.5 มล.

2. สารละลาย soluble starch ขัน 15 มก./มล. จำนวน 500 มล. (เก็บในตู้เย็นไว้ใช้ตลอดการทดลอง)

3. นำ α-Amylase (ข้อ 2.4.5) มาทำให้เจือจางด้วยน้ำ 20 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลอง	ผสม α-Amylase	=	0.1	มล.
	dialysate's supernatant ของพืชแต่ละชนิด	=	0.4	มล.
	NaCl ใน buffer	=	1.0	มล.

นำไป preincubate ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำออกมาผสมกับ 1.0 มล. ของสารละลายแป้งแล้ว incubate ที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายมา 0.1 มล. ผสมใน 5.0 มล. ของสารละลายไอโอดีน เขย่าให้เข้ากันแล้วไปวัด absorbance ที่ 680 nm.

2.4.9 การ purify α-Amylase inhibitor จากหัวเผือก

การ purify นี้ได้ดัดแปลงจากวิธีของ shiankin และ Birk (3)

2.4.9.1 สกัดด้วยน้ำ (Aqueous extract)

นำหัวเผือกที่ปอกเปลือกแล้วมา 420 กรัม หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วผสมกับน้ำกลั่น 700 มล. นำไปบดให้ละเอียดในเครื่องปั่น (blender) นำ suspension ที่ได้ไปคนด้วย magnetic stirrer 15 นาที จึงเอาไปกรองด้วยใยแก้วบน Buchner funnel

นำกากที่เหลือไปคนกับน้ำอีก 200 มล. บน magnetic stirrer แล้วนำไปกรองอีกครั้งหนึ่ง

นำ Mixture (1045 มล.) ที่ได้ทั้งสองครั้งไป centrifuge ด้วยเครื่อง High speed centrifuge ที่อุณหภูมิ 20 °ซ ความเร็ว 5000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บ supernatant (aqueous extract) นี้ไว้ใช้ทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.9.1.1 หาปริมาณโปรตีนจาก aqueous extract โดยวิธี Lowry method

เตรียมสารละลาย C (ดูข้อ 2.4.6) มา 5.0 มล. เติมลงไปใน 1.0 มล. ของ aqueous extract ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปเติม 0.5 มล. ของ Folin-Ciocalteau reagent ที่เจือจางแล้วลงไปพร้อมกับผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วทันที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัด Absorbance ที่ 750 nm ด้วยเครื่อง Spectronic 20

จากค่า Absorbance ที่ได้นำไปหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับ Standard curve ในรูปที่ 3.3

2.4.9.1.2 ทดสอบ α-Amylase inhibitory activity (4)

การทดลอง			
ผสม α-Amylase	=	0.1	มล.
Aqueous extract	=	0.5	มล.
สารละลาย NaCl ในบัฟเฟอร์	=	0.9	มล.

นำสารผสมไป preincubate ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ใน shakerbath หลังจากนั้น เติมสารละลาย Soluble starch ลงไป 1.0 มล. แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 5 นาที จึงดูดสารละลายมา 0.1 มล. เติมลงใน 5.0 มล. สารละลายไอโอดีน ผสมให้เข้ากัน นำไปวัด Absorbance ที่ 680 nm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.9.2 <u>แยกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u> (Ammonium sulfate fractionation)

นำ aqueous extract (790 มล.) มาทำให้เป็น 0-20 % saturation ที่ 25 °ซ โดยเติม $(NH_4)_2SO_4$ ลงไป 90.06 กรัม (14) นำไปกวนให้ละลายด้วย magnetic stirrer จากนั้นนำไป centrifuge โดยใช้ความเร็ว 5000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บ supernatant ไว้

นำ Supernatant (757 มล.) มาทำให้เป็น 20-75 % Saturation โดยเติม $(NH_4)_2SO_4$ ลงไป 289.17 กรัม คนจน $(NH_4)_2SO_4$ ละลายหมดจึงนำไป centrifuge โดยใช้ความเร็ว 5000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอน (precipitate) ไว้

นำตะกอนนี้มาละลายในน้ำ 100 มล. และนำไป dialyse ด้วย dialysing tube เป็นเวลา 17 ชั่วโมง โดยให้น้ำกลั่นไหลผ่านอยู่ตลอดเวลา หลังจากนั้นนำไป dialyse ในน้ำกลั่นที่เย็นอีก 1 ชั่วโมง กำจัดตะกอนออกโดยนำไป centrifuge ที่ 5000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บ dialysate's supernatant นี้ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.4.9 <u>Heat treatment</u>

นำ dialysate's supernatant (100 มล.) ไปต้มที่อุณหภูมิ 70 °ซ เป็นเวลา 10 นาที นำ centrifuge ที่ 5000 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บ supernatant ไว้ทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.9.3 Chromatography on DEAE-Cellulose

แบ่ง Supernatant หลังจากต้มแล้วมา 80 มล. ใช้ pasteur pipet ค่อย ๆ หยดลงบน DEAE-Cellulose column ขนาด 2.5x 40 ซม. ที่ equilibrate ด้วย starting buffer. elute สารออกจาก column โดยเพิ่มความเข้มข้นของ eluant เป็น 0.05 M , 0.5 M และ 1.0 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 ตามลำดับ โดยใช้ flow rate 75 มล./ชั่วโมง เก็บสารละลาย fraction ละ 10 มล. จากนั้นนำสารละลายแต่ละ fraction ไปวัด Absorbance ที่ 680 nm ด้วยเครื่อง Unicam sp.8000 UV-Vis spectrophotometer และวัด activity ของ α -Amylase inhibitor (รูปที่ 3.4)

เก็บรวบรวม fraction ที่สามารถยับยั้งเอ็นไซม์ α -Amylase (No.65-80) ไว้แล้วนำไป freeze dry (lyophilize) ด้วยเครื่อง freze dryer จนแห้งเป็นผง

2.4.9.4 ทำการทดลองเปรียบเทียบโดยนำ Supernatant ที่ไม่ได้ต้มไปผ่าน DEAE-Cellulose column chromatography (รูปที่ 3.5)

2.4.9.5 Chromatography on Sephadex G-100

แบ่ง freeze dry ของ active fraction มาครึ่งหนึ่ง (1.16 กรัม) ละลายใน 10 มล. ของ 0.5 M Tris-Hcl buffer, pH 7.5 นำไปใส่ใน column ที่บรรจุด้วย sephadex G-100 ขนาด 3.2x40 ซม.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

elute ด้วยบัฟเฟอร์เดิมและเก็บสารละลาย fraction ละ 5.0 มล. โดยใช้ flow rate 50 มล./ชั่วโมง นำสารละลายแต่ละ fraction ไปวัด activity ของ α-Amylase activity (รูปที่ 3.6)

2.4.9.5.1 หาปริมาณโปรตีนโดย Lowry method

แบ่งสารละลายมา 1.0 มล. นำไปทดลองเหมือนข้อ 2.4.6 แล้วหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับ standard curve (รูปที่ 3.3)

2.4.9.5.2 การศึกษา Spectrum

แบ่งสารละลายมา 2.0 มล. นำไปวัด spectrum โดยใช้เครื่อง Unicam sp8000 UV-Vis spectrophotometer (รูปที่ 3.7)

สรุปแสดงขั้นตอนต่าง ๆ ในการสกัดตัวยับยั้ง (inhibitor) จากหัวเผือก

หัวเผือก (Taro root) 420 กรัม

↓ ปั่นกับน้ำ 700 มล. ด้วยเครื่องปั่น

Suspension

↓ กรองด้วย glass wool

Solution 1045 มล.

↓ Centrifuge ที่ 20°ซ ความเร็ว 500c g, 20 นาที

Supernatant 790 มล.
(aqueous extract)*

↓ 0-20 % sat. $(NH_4)_2SO_4$ และ centrifuge

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

↓

Supernatant 757 มล.

↓ 20-75 % sat. $(NH_4)_2SO_4$ และ centrifuge

Precipitate

↓ ละลายในน้ำ 100 มล.

aqueous solution of $(NH_4)_2SO_4$ precipitate*

↓ dialyse 18 ชั่วโมง และ centrifuge

dialysate's supernatant* 118 มล.

↓ ต้มที่ 70 °ซ 10 นาที และ centrifuge

Supernatant* 94 มล.

↓ 80 มล.

DEAE-Cellulose column chromatography

↓

Active fraction* (No. 65-80) 130 มล.

↓ freeze dry

Protein 2.32 กรัม

↓ แบ่งมา 1.16 กรัม ละลายใน 10 มล. ของ 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 7.5

Sephadex G-100 column chromatography

↓

Active fraction (No. 15-21) 35 มล.

↓ dialyse 7 ชั่วโมง

Inhibitor *

*หมายถึงได้ทำการทดลอง 1. หาปริมาณโปรตีน

2. Assay α-Amylase inhibitory activity

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.9.6 การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของตัวยับยั้งที่สกัดได้

2.6.1 ผลของเวลา preincubation ต่อการทำงานของตัวยับยั้ง

ผสม α-Amylase = 0.1 มล.
inhibitor = 0.2 มล.
สารละลาย NaCl ในบัฟเฟอร์ = 1.2 มล.

นำไป preincubate ที่อุณหภูมิ 25° และ 37°ซ. ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน แล้วจึงนำไปวัด activity ของ α-amylase (รูปที่ 3.8)

2.4.9.7 ผลของ pH

เตรียม - 10 mM Citrate-phosphate buffer pH 4.5, 5.0, 6.0, 6.5 และ 7.0
- 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, 8.0 และ 8.5
และในทุก ๆ pH buffer เติม 1.5 มก./มล. ของ NaCl

การทดลอง ผสม α-Amylase = 0.1 มล.
inhibitor = 0.2 มล.
บัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ = 1.2 มล.

นำไป preincubate ใน shakerbath ที่ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายแป้งแล้วไป incubate เป็นเวลา 5 นาที จึงดูดสารละลายมา 0.1 มล. เติมลงไปใน 5.0 มล. ของสารละลายไอโอดีน นำไปวัด absorbance ที่ 680 nm (รูปที่ 3.9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.9.8 การทนต่อความร้อน (Temperature stability) ของตัวยับยั้ง 0.1 มล.

แช่สารละลายตัวยับยั้งที่อุณหภูมิ 20°, 30°, 50°, 70° และ 90°ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นโดยแช่น้ำแข็ง แล้วดูดสารละลายมาอย่างละ 0.2 มล. ผสมกับ α-Amylase ใน 1.2 มล. ของบัฟเฟอร์ของแต่ละหลอด นำไป preincubate ที่ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทดลองเหมือนข้อ 2.4.8 (รูปที่ 3.10)

2.4.9.9 ผลของ metal ions และ chelating compound ต่อตัวยับยั้ง

เตรียม 20 mM

20 mM ของ $CaCl_2$, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $MgSO_4$, $ZnCl_2$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ Ethylenediaminetetraacetic acid (disodium salt), 1,10-phenanthrolin , 2-Mercaptoethanol

การทดลอง ผสม			
	α-Amylase	= 0.1	มล.
	inhibitor	= 0.2	มล.
	$CaCl_2$	= 0.2	มล.
	buffer, pH 6.9	= 1.0	มล.

นำไปวัดการยับยั้ง α-Amylase activity เปลี่ยนจาก $CaCl_2$ เป็นสารประกอบอื่น ๆ ที่เหลือ แล้วทดลองเหมือนเดิม นำ blank เปรียบเทียบโดยไม่ใส่สารประกอบต่าง ๆ ข้างต้น โดยผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

α -Amylase	=	0.1	มล.
inhibitor	=	0.2	มล.
buffer, pH 6.9	=	1.3	มล.

จากนั้นนำไปทดลองเหมือนเดิม ได้ทำ control โดยใช้ α-Amylase กับปฏิกริยากับ metal ion ต่าง ๆ

2.4.9.10 <u>การทดสอบความบริสุทธิ์ของตัวยับยั้งโดย Disc polyacrylamide gel electrophoresis</u> (21)

<u>การเตรียม</u>

1. Reagent A (1 N HCl 48 ml, TRIS 36.3 gm, TEMED 0.46 ml ละลายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.9)
2. Reagent B (1 M H_3PO_4 25.6 ml, TRIS 5.7 gm, TEMED 0.46 ml ละลายเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.7)
3. Reagent C (Acrylamide 30 gm , Bis(N,N'-methylene-bis (acrylamide) 0.8 gm เติมน้ำกลั่นเป็น 100 ml
4. Reagent D (Acrylamide 10 gm, N,N'-methylene-bis (acrylamide) 2.5 gm. เติมน้ำกลั่นเป็น 100 ml.
5. Ammonium persulfate 140 mg เติมน้ำกลั่นเป็น 100 ml เตรียมใหม่ทุกครั้งที่มีการเตรียม gel
6. Riboflavin 4 mg ในน้ำกลั่น 100 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. TRIS-Glycine buffer, pH 8.6 (TRIS 12 gm, glycine 57.6 gm เติมน้ำกลั่นเป็น 2 ลิตร)

8. set เครื่องมือดังรูป (รูปที่ 2.1)

9. จุกยางสำหรับเสียบ glass tube

การทดลอง

1. เก็บ stock solution ตั้งแต่ข้อ 1-7 ในตู้เย็น

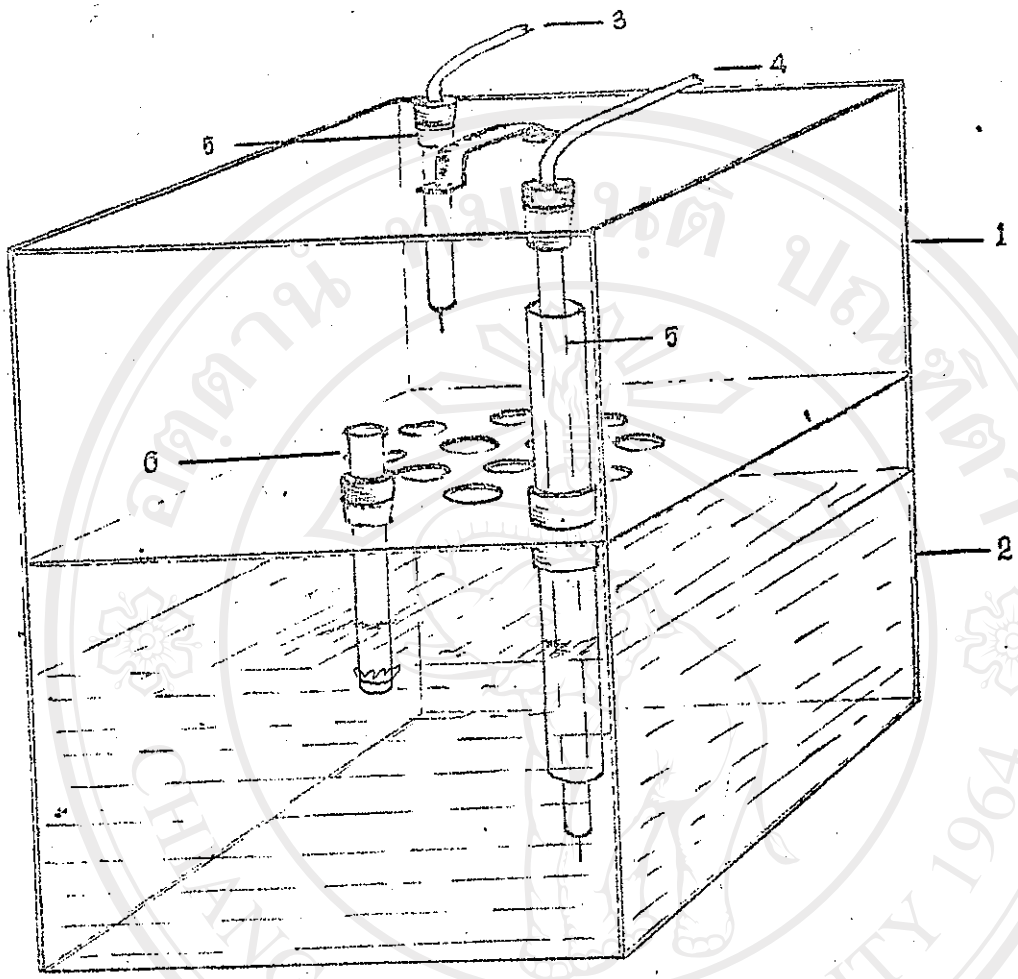
2. เตรียม glass tube ที่มีจุกยางเสียบตรงกลางสำหรับเสียบบนเครื่องมือ electrophoresis ขนาดความยาว 3 นิ้ว เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 ซม. 8 อัน โดยเอาปลายข้างหนึ่งเสียบบนจุกยางแล้วจัดให้ตั้งตรงบนโต๊ะ

3. เตรียม running gel, 7.5 % acrylamide gel ประกอบด้วย

Reagent A	1 ส่วน
Reagent C	2 ส่วน
Water	1 ส่วน
Ammonium persulfate	4 ส่วน

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ pasteur pipet ใส่สารละลายที่ผสมได้ลงไปในหลอดสูง 2 นิ้ว จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงไปบนผิวของ gel แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 2.1 แสดง Electrophoresis apparatus

1. Upper chamber
2. Lower chamber
3. ต่อกับขั้วลบของ power supply
4. ต่อกับขั้วบวกของ power supply
5. platihum electrode
6. หลอดแก้วบรรจุเจล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เตรียม stacking gel, 3.75 % acrylamide gel ประกอบด้วย

Reagent B	1 ส่วน
Reagent D	2 ส่วน
Riboflavin	1 ส่วน
Water	4 ส่วน

ผสมให้เข้ากัน ดูดน้ำออกจากส่วนบนของ running gel (จากข้อ 3) แล้วล้างด้วยส่วนผสมที่ได้เตรียม stacking gel

5. เติมส่วนผสมของ stacking gel ลงบนส่วนบนของ running gel หลอดละครึ่งนิ้ว เติม riboflavin ลงไปให้สูง 2-3 มม. นำไปส่องด้วยแสง fluorescence 30 นาที เพื่อให้เกิด polymerize แล้วใช้ภายใน 60 นาที

6. ดูดเอา Riboflavin ที่อยู่ส่วนบนของ stacking gel ออก

7. เอาจุกยางออกหุ้มปลายนี้ด้วย stocking แล้วใช้ยางรัด

8. เอาหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่องมือสำหรับ electrophoresis อัดให้แน่นไม่ให้รั่วได้ เติม Tris-glycine buffer, pH 8.6 ลงใน chamber ล่างให้เลยระดับปลายล่างของหลอด

9. เติม Tris-glycine buffer, pH 8.6 ใน chamber บน มิให้มีฟองอากาศอยู่ในแต่ละหลอดที่เตรียม gel ไว้

10. ใส่ 0.5 มล. ของสารละลาย 1 % Bromophenol blue ใน chamber บนเพื่อทำหน้าที่เป็น Marker

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11. ตัวยับยั้งที่ freeze dry แล้ว 0.02 กรัม ใน 1.0 มล. ของ 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 และผสม 1.0 มล. ของ 40 % sucrose ลงไป จากนั้นใช้ pasteur pipet ดูดมาแล้วหยดลงบน stacking gel 3 หยด

ทำ standard โดยชั่ง Bovine serum albumin มา 0.3 กรัม ละลายใน 1.0 มล. ของน้ำ และผสม 1.0 มล. ของ 40 % sucrose ลงไป จากนั้นนำไปหยดบน stacking gel 3 หยด เหมือนกับตัวยับยั้งที่สกัดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12. Run electrophoresis จาก - ——→ + ใช้กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 1.5 ชั่วโมง จน marker วิ่งถึงก้นหลอด

13. เอา gel ออกจากหลอดแต่ละหลอดโดยใช้ syringe และค่อย ๆ ฉีดน้ำเข้าไป gel ก็จะค่อย slide ออกจากหลอด

<u>การย้อมสีและล้างสีย้อม</u> (Staining and Destain)

<u>การย้อม</u> (Staining)

<u>การเตรียม</u>

Staining solution โดยใช้ 0.5 มล. ของ Amido black ใน 7 % (V/V) acetic acid 100 มล.

<u>การทดลอง</u>

นำ gel ที่ slide ออกจากหลอดมาย้อมใน staining solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

<u>การล้างสีย้อม</u> (Destain)

<u>การเตรียม</u>

Destaining solution โดยใช้ 7 % (V/V) acetic acid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลอง

นำ gel ที่ย้อมสีแล้วมาแช่ใน Destaining solution เป็นเวลา 1 คืน สีที่ติดอยู่ตาม gel จะละลายสู่ solution เฉพาะส่วนที่เป็นโปรตีนที่ติดอยู่บน gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved