ภาคผนวก

DPU

การตรวจวัดระดับเอนไซม์ทำลายพิษของหนอนใยผัก

1) การเตรียมสารเคมีในการสกัดเอนไซม์

1.1 การเตรียม Potassium dihydrogen orthophosphate buffer (KH_2PO_4) 0.1 M ปริมาตร 1 ลิตร

- ชั่ง KH_2PO_4 13.609 กรัม
- ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.2 การเตรียม EDTA 0.001 M ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

- ชั่ง EDTA 0.0046 กรัม
- ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

1.3 การเตรียม Potassium dihydrogen orthophosphate buffer (KH_2PO_4) 0.1 M ปริมาตร 500 มิลลิลิตร pH 7.0 และ pH 7.5

- นำ EDTA 0.001 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงใน Potassium phosphate buffer 0.1 M ปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน
- นำมาปรับ pH 7 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และ pH 7.5 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.4 การเตรียมสารละลาย Glutathione reduced form 0.01 M ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง Glutathione reduced form 1.563 กรัม ละลายด้วย EDTA 0.001 M ใน Potassium phosphate buffer 0.1 M pH 7 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สารละลายนี้ควรใช้ที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ วันต่อวัน

1.5 การเตรียม Polyvinylpyrrolidone (PVPP)

- ชั่ง Polyvinylpyrrolidone (PVPP) 0.25 กรัม

1.6 การเตรียม Paranitrophenyl acetate (PNPA)

- ชั่ง Paranitrophenyl acetate (PNPA) 0.12 กรัม ใส่ใน 100% เอทานอล 5 มิลลิลิตร

1.7 การเตรียม Chlorodinitrobenzene (CDNB)

- ชั่ง Chlorodinitrobenzene (CDNB) 0.152 กรัม ใส่ใน 100% เอทานอล 5 มิลลิลิตร

2) การสกัดเอนไซม์จากหนอนใยผัก

2.1 ชั่งหนอนใยผักระยะที่ 4 ที่ทดสอบด้วยใบผักคะน้าชุบสารสกัดจากเปลือกว่านหาง จระเข้ 0.5 กรัม ใส่ลงในโกร่งบดที่แช่เย็น

2.2 ล้างตัวอย่างด้วย 0.1 M Potassium dihydrogen orthophosphate buffer pH 7.5

2.3 ทำการบดหนอนใยผักโดยใส่ GSH-reduced form 0.01 M ประมาณ 2 - 3 มิลลิลิตรและ Polyvinylpyrrolidone (PVPP) 0.25 กรัม บดจนละเอียด

2.4 กรองสารละลายที่ได้ด้วยผ้าขาวบางสะอาด 5 - 6 ชั้นใส่ใน Centrifuge tube ปรับน้ำหนักด้วยสารละลาย GSH-reduced form 0.01 M

2.5 นำไปเหวี่ยงปั่นแยกด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 10, 000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 4 นาที

2.6 ดูดส่วนใสของเอนไซม์ที่สกัดได้ใส่ใน Centrifuge tube เพื่อนำไปตรวจวัดระดับ เอสเทอเรส (esterase) และกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทุกขั้นตอนทำภายใต้อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

3) การตรวจวัดระดับเอนไซม์ทำลายพิษของหนอนใยผัก

3.1 การวัดระดับเอสเทอเรส (esterase) โดยวิธี PNPA assay ของ Mackness และคณะ (1983)

การตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Paranitrophenol โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา Hydrolysis ของ Paranitrophenyl acetate (PNPA) เปลี่ยนเป็น Paranitrophenol โดยมีเอสเทอเรส (esterase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Mackness *et al*., 1938)

หลอด Blank

- Potassium dihydrogen orthophosphate buffer 0.1 M pH 7.5 2.9 มิลลิลิตร
- PNPA 50 ไมโครลิตร
- สารละลาย GSH- reduced form 0.01 M 50 ไมโครลิตร

หลอดตัวอย่าง

- Potassium dihydrogen orthophosphate buffer 0.1 M pH 7.5 2.9 มิลลิลิตร
- PNPA 50 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ 50 ไมโครลิตร

3.2 การวิเคราะห์เอสเทอเรส (esterase)

Paranitrophenol produced = OD / min x 58.8235 x total volume of assay

แทนค่า OD / min ได้จากการวัดจากเครื่อง spectrophotometer ด้วย A

และปริมาตรรวมที่ใช้วิเคราะห์เอนไซม์ = 3.0

ดังนั้นปริมาตรเอนไซม์ที่วัดได้ = A x 58.8253 x 3.0 n mole

3.3 การวัดระดับกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase) โดยวิธี CDNB assay ของ Booth และคณะ (1961)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Chloromononitrobenzene โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา Conjugation ของ Chlorodinitrobenzene (CDNB) กับ Glutathione โดยมีกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Booth *et al*., 1961)

หลอด Blank

- Potassium dihydrogen orthophosphate buffer 0.1 M pH 7.5 2.15 มิลลิลิตร
- CDNB 10 ไมโครลิตร
- สารละลาย Glutathione reduced form 0.9 M 20 ไมโครลิตร

หลอดตัวอย่าง

- Potassium dihydrogen orthophosphate buffer 0.1 M pH 7.5 2.15 มิลลิลิตร
- CDNB 10 ไมโครลิตร
- เอนไซม์ 20 ไมโครลิตร

3.4 การวิเคราะห์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (glutathione S-transferase)

CDNB product = OD / min x1.31 / 9.6 x 1000

แทนค่า OD / min ได้จากการวัดจากเครื่อง Spectrophotometer ด้วย B

ดังนั้นปริมาตรเอนไซม์ที่วัดได้ = B x 1.31 / 9.6 x 1000 n mole