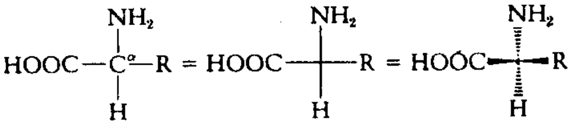
บทที่ 3
กรดอะมิโนและโปรตีน

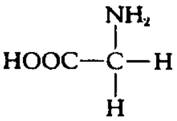
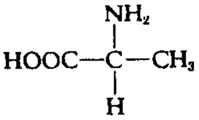
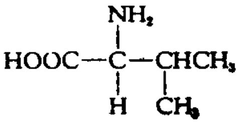
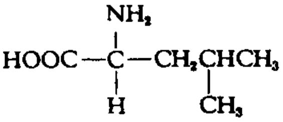
กรดอะมิโนเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลภายในโมเลกุลเดียวกัน ทำให้มีคุณสมบัติเป็นทั้งกรดและด่าง กรดอะมิโนที่พบในโปรตีนทั่ว ๆ ไปมี 20 ชนิด ทั้งหมดเป็นกรดอะมิโนชนิดอัลฟา (α-amino acid) กล่าวคือหมู่อะมิโนจะเกาะอยู่ที่อัลฟาคาร์บอน

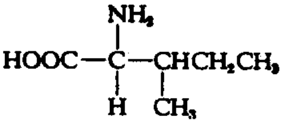
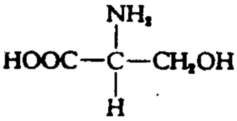
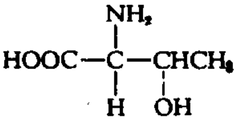
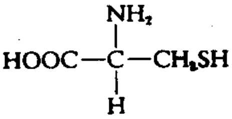
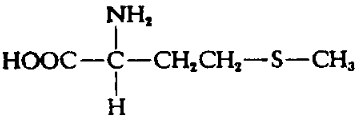
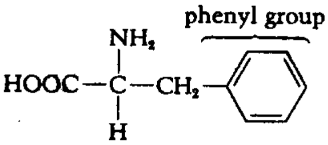
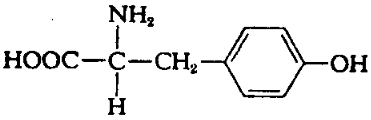


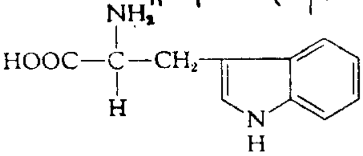
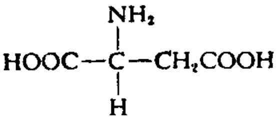
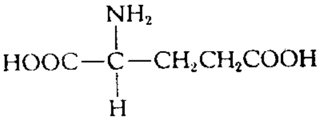
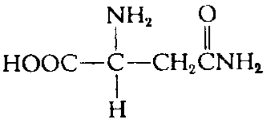
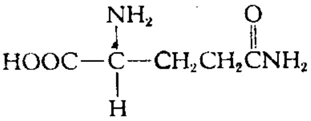
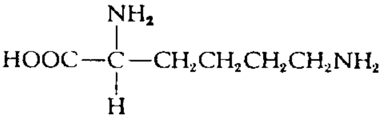
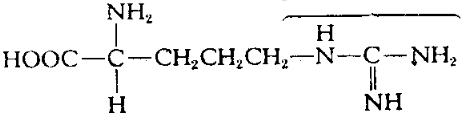
$$HOOC-\overset{NH_2}{\underset{H}{C^{\alpha}}}-R = HOOC-\overset{NH_2}{\underset{H}{+}}-R = HOOC-\overset{NH_2}{\underset{H}{+}}-R$$

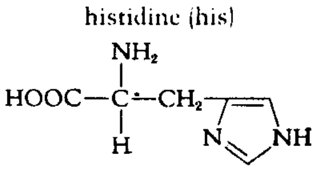
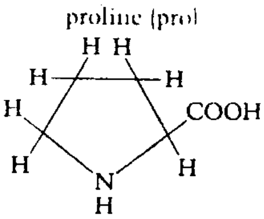
โครงสร้างทั่วไปของกรดอะมิโน

ตารางที่ 3.1 การแบ่งประเภทกรดอะมิโนโดยพิจารณาจากหมู่ R ที่แตกต่างกัน

ประเภท	ชื่อ สัญลักษณ์ โครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุล	
1. Aliphatic amino acid	ไกลซีน MW 75	glycine (gly)  $HOOC-\overset{NH_2}{\underset{H}{C}}-H$
	อะลานีน MW 89	alanine (ala)  $HOOC-\overset{NH_2}{\underset{H}{C}}-CH_3$
	วาลีน MW 117	valine (val)  $HOOC-\overset{NH_2}{\underset{H}{C}}-\underset{CH_3}{CH}CH_3$
	ลูซีน MW 131	leucine (leu)  $HOOC-\overset{NH_2}{\underset{H}{C}}-CH_2\underset{CH_3}{CH}CH_3$

ประเภท	ชื่อ สัญลักษณ์ โครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุล	
	ไอโซลูซีน MW 131	isoleucine (ile)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-\underset{CH_3}{CH}CH_2CH_3$
2. Hydroxyl amino acid	เซอรีน MW 105	serine (ser)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2OH$
	ธรีโอนีน MW 119	threonine (thr)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-\underset{OH}{CH}CH_3$
3. Sulphur amino acid	ซีสเตอีน MW 121	cysteine (cySH or cys)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2SH$
	เมไธโอนีน MW 149	methionine (met)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2CH_2-S-CH_3$
4. Aromatic amino acid	เฟนิลอะลานีน MW 165	phenylalanine (phe) 
	ไทโรซีน MW 181	tyrosine (tyr) 

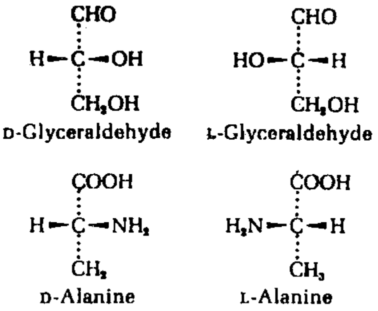
ประเภท	ชื่อ สัญลักษณ์ โครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุล
	ทริปโตแฟน MW 204 tryptophan (trp) 
5. Acidic amino acid และ amide ที่เกี่ยวข้อง	กรดแอสปาติค MW 133 aspartic acid (asp)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2COOH$
	กรดกลูตามิค MW 147 glutamic acid (glu)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2CH_2COOH$
	แอสปาราจีน MW 132 asparagine (asn)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}NH_2$
	กลูตามีน MW 146 glutamine (gln)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2CH_2\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}NH_2$
6. Basic amino acid	ไลซีน MW 146 lysine (lys)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$
	อาร์จินีน MW 174 arginine (arg)  $HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2CH_2CH_2-\overbrace{\overset{H}{N}-\underset{\underset{NH}{\Vert}}{C}-NH_2}^{\text{guanidine group}}$

ประเภท	ชื่อ สัญญลักษณ์ โครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุล	
	ฮีสติดีน MW 155	
7. Imino acid	โพรลีน MW 115	

สเตอริโอเคมีของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนทุกตัวยกเว้นไกลซีนจะมีอะซิมเมตริกคาร์บอนอะตอม (asymmetric carbon atom) หรือไคราลคาร์บอนอะตอม (chiral carbon atom) ซึ่งหมายความว่าหมู่ที่มาแทนไฮโดรเจนทั้งสี่ที่คาร์บอนอะตอมนั้นไม่เหมือนกันเลย โมเลกุลเหล่านี้จะสามารถหมุนระนาบของ polarised light ได้ สามารถตรวจสอบโดยใช้polarimeterอัลฟาคาร์บอนของไกลซีนเป็นซิมเมตริกคาร์บอนอะตอม (symmetric carbon atom) หรืออะไคราลคาร์บอนอะตอม (achiral carbon atom) ดังนั้นไกลซีนจึงไม่มีสเตอริโอไอซอมเมอร์ (stereoisomer) จำนวนสเตอริโอไอซอมเมอร์ของสารใดก็ตามจะเท่ากับ 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนอะซิมเมตริกคาร์บอนอะตอม เช่น ธริโอนีนและไอโซลูซีน มีจำนวนอะซิมเมตริกคาร์บอน 2 อะตอม ดังนั้นจำนวนสเตอริโอไอซอมเมอร์เท่ากับ $2^2 = 4$ กรดอะมิโนอื่นนอกเหนือไปจากไกลซีน ธริโอนีนและไอโซลูซีนที่กล่าวมาแล้ว จะมีค่า $n = 1$ ซึ่งจำนวนสเตอริโอไอซอมเมอร์จะเท่ากับ $2^1 = 2$

กลีเซอราลดีไฮด์ (glyceraldehyde) น้ำตาลที่มีคาร์บอนเพียง 3 อะตอมจัดว่าเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กสุดที่มีอะซิมเมตริกคาร์บอนอยู่ในโครงสร้าง เป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐานสำหรับพวกสเตอริโอไอซอมเมอร์ของกรดอะมิโน



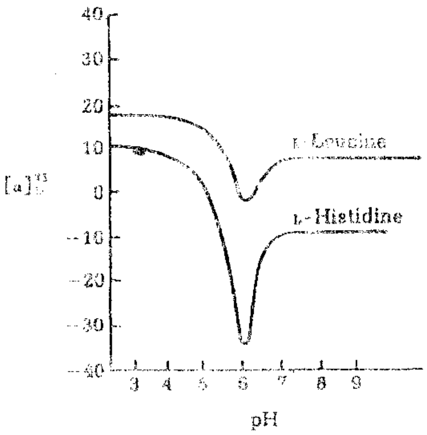
รูปที่ 3.1 Configurations แสดงสเตอริโอไอซอมเมอร์ของกลีเซอราลดีไฮด์และกรดอะมิโนอะลานีน

กลีเซอราลดีไฮด์มีจำนวนสเตอริโอไอซอมเมอร์เท่ากับสอง ใช้สัญญลักษณ์ L–และ D– โปรดสังเกตว่าใช้ตัวพิมพ์ใหญ่แต่ขนาดเท่ากับตัวเขียนธรรมดา สัญญลักษณ์ L– หรือ D– หมายถึง absolute configuration เป็นสำคัญ ไม่เกี่ยวข้องกับการหมุนระนาบของ polarised light แต่อย่างใด ไอซอมเมอร์ L– และ D– นี้มีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนกันและความว่องไวในปฏิกริยาเคมีเท่ากัน ที่ต่างกันก็คือ 1) หมุนระนาบของ polarised light ไปด้วยมุมที่เท่ากันแต่ทิศทางตรงข้าม 2) อัตราเร็วของปฏิกริยาต่อสารอื่นที่เป็นประเภทอะซิมเมตริกนั้นอัตราเร็วแตกต่างกัน

กรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นไอซอมเมอร์ L– ส่วนไอซอมเมอร์ D– นั้นมักจะไม่ค่อยพบในโมเลกุลของโปรตีน แต่จะพบตามผนังเซลล์ของพวกจุลินทรีย์หรือในโครงสร้างของพวกยาปฏิชีวนะ เช่น gramicidin และ actinomycin D เป็นต้น ถ้าเป็นกรดอะมิโนที่สังเคราะห์ขึ้นเองจากปฏิกริยาเคมีในห้องปฏิบัติการมักจะได้เป็น racemate หรือ racemic mixture หมายถึงว่ามีจำนวนโมลของไอซอมเมอร์ L– เท่ากับจำนวนโมลของไอซอมเมอร์ D– อาจจะเขียนรวมเป็น DL -mixture ก็ได้ สารสังเคราะห์ประเภทนี้ไม่สามารถหมุนระนาบของ polarised light ได้ (optically inactive)

ตารางที่ 3.2 ค่า Specific rotation ของสารละลาย aqueous ของกรดอะมิโนบางชนิด

Amino acid	Specific rotation $[\alpha]_D^{25}$
L-Alenine	+1.8
L-Argioine	+12.5
L-Leucine	−11.0
L-Isoleucine	+12.4
L-Phenylalanine	−34.5
L-Glutamic acid	+12.0
L-Histidine	−38.5
L-Aspartic acid	+5.0
L-Methionine	−10.0
L-Lysine	+13.5
L-Serine	−7.5
L-Proline	−86.2
L-Threonine	−28.5
L-Tryptophan	−33.7
L-Valine	+5.6



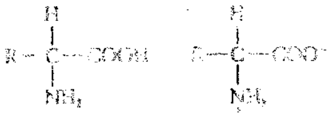
รูปที่ 3.2 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ต่อ optical rotation ของกรดอะมิโน

ความสามารถของสารในการหมุนระนาบ polarised light (optical activity) แสดงออกในรูป specific rotation $\left[\alpha\right]_D^{25}$ (การคิดคำนวณค่า specific rotation ให้ดูรายละเอียดในเรื่องคาร์โบไฮเดรท หน้า 28) กรดอะมิโนที่พบในธรรมชาติมักจะเป็นไอซอมเมอร์ L – ซึ่งจะหมุนระนาบของ polansed light ไปทางซ้ายหรือทางขวาก็ได้ ถ้าหมุนระนาบของ polarised light ไปทางขวา ใช้สัญญลักษณ์(+)และจัดให้เป็นสารประเภทdextrorotatory ถ้าหมุนระนาบของ polarised light ไปทางซ้ายใช้สัญญลักษณ์(−) และจัดให้เป็นสารประเภท levorotatory การหมุนระนาบ polarised light ของกรดอะมิโนที่ pH หนึ่ง ๆ ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของหมู่ R ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 3.2 ค่า

optical rotation หรือ specific rotation จะเปลี่ยนไปตามการเปลี่ยนแปลงของ pH ดังแสดงไว้ใน รูปที่ 3.2

คุณสมบัติความเป็นกรดเป็นด่างของกรดอะมิโน

ผลึกกรดอะมิโนละลายน้ำได้ดีกว่าในตัวทำละลายนอน-โพลาร์ จุดหลอมเหลวค่อนข้างสูง กรดอะมิโนทั่ว ๆ ไปมักมีจุดหลอมเหลวสูงกว่า 200°ซ การที่จุดหลอมเหลวของกรดอะมิโนสูงนั้นเนื่องมาจากว่าโครงสร้างรูปผลึกของกรดอะมิโนมีแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic forces) ระหว่างประจุตรงข้ามค้ำจุนอยู่ ถึงแม้ว่ากรดอะมิโนจะอยู่ในสภาพสารละลาย aqueous ที่เป็นกลางก็ตาม ก็ยังคงมีประจุ โดยที่หมู่อะมิโนจะมีประจุบวก หมู่คาร์บอกซิลจะมีประจุลบภายในโมเลกุลเดียวกัน เราเรียกว่า dipolar ion หรือ zwitterion



Undissociated form   Zwitterion or dipolar form

ถ้านำกรดอะมิโนอะลานีนมาละลายน้ำ กรดอะมิโนอะลานีนจะทำหน้าที่เป็นทั้งกรดและด่าง สารที่มีคุณสมบัติทั้ง 2 อย่างภายในโมเลกุลเดียวกัน เราเรียกว่าแอมโฟไลท์ (ampholytes) ซึ่งย่อมาจาก amphoteric electrolytes

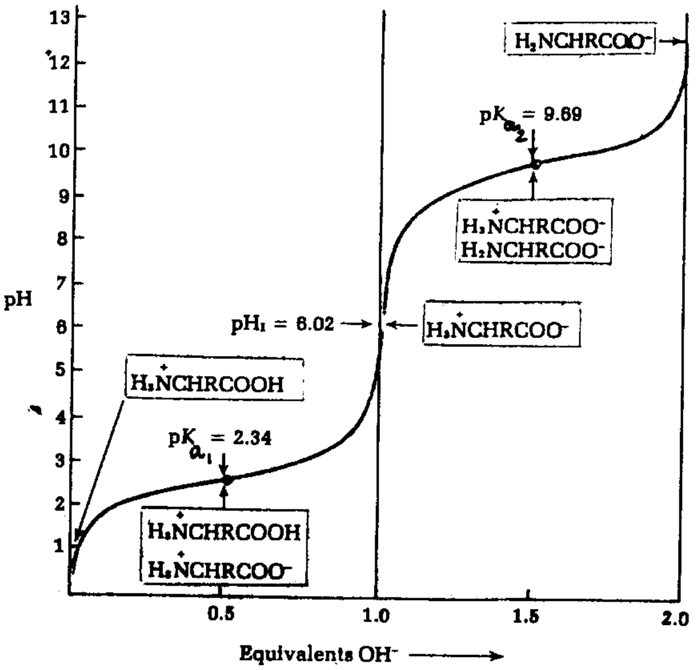
แสดงความเป็นกรด : $H_3\overset{+}{N}CH(CH_3)COO^- \rightleftharpoons H^+ + H_2NCH(CH_3)COO^-$

แสดงความเป็นด่าง : $H^+ + H_3\overset{+}{N}CH(CH_3)COO^- \rightleftharpoons H_3\overset{+}{N}CH(CH_3)COOH$

อะลานีนที่ pH ต่ำ ๆ จะอยู่ในสภาพที่เป็นประจุบวก เมื่อนำไปไตเตรทกับด่างจะเป็นตัวให้โปรตอนถึงสองครั้งดังสมการ

(1) $H_3\overset{+}{N}CHRCOOH + OH^- \longrightarrow H_3\overset{+}{N}CHRCOO^- + H_2O$

(2) $H_3\overset{+}{N}CHRCOO^- + OH^- \longrightarrow H_2NCHRCOO^- + H_2O$



รูปที่ 8.3 กราฟเส้นโค้งไตเตรชั่นของอะลานีน หมู่ R คือ หมู่เมธิล

กราฟที่ได้เป็นแบบ biphasic เริ่มต้นที่ pH ต่ำอะลานีนจะมีประจุบวก เมื่อไตเตรทกับด่าง ปฏิกริยาจะเกิดขึ้นดังสมการ (1) จนกระทั่งถึงจุด pK_{a_1} = 2.34 ซึ่งเป็นจุดกึ่งกลางของกราฟช่วงแรก ณ จุดนี้ความเข้มข้นของอะลานีนที่มีประจุบวกจะเท่ากับความเข้มข้นของอะลานีนที่เป็น zwitterion เมื่อไตเตรทกับด่างต่อไปจนกระทั่งได้ pH ประมาณ 6.02 ค่า pH 6.02 นี้เป็น isoelectric pH หรือ isoelectric point เขียนย่อว่า pH_I หรือ pI ที่ pI กรดอะมิโนใด ๆ ก็ตามจะมีประจุสุทธิภายในโมเลกุลเป็นศูนย์ ไม่มีการเคลื่อนที่แต่อย่างใดในสนามไฟฟ้า คุณสมบัติในการละลายลดลงมามากจนบางครั้งถึงกับตกตะกอนลงมา ดังนั้นที่ pI 6.02 ในกราฟจึงมีแต่อะลานีนที่เป็น zwitterion เพียงอย่างเดียว ถ้าไตเตรทกับด่างต่อไปอีกปฏิกริยาจะเกิดขึ้นดังสมการ (2) จนกระทั่งถึงจุด pK_{a_2} = 9.69 ซึ่งเป็นจุดกึ่งกลางของกราฟช่วงที่สอง ที่ pH นี้ความเข้มข้นของอะลานีนที่เป็น zwitterion เท่ากับความเข้มข้นของอะลานีนที่มีประจุลบ เมื่อไตเตรทต่อจนถึง pH ประมาณ 12 กว่า ๆ ก็จะเหลือแต่อะลานีนที่เป็นประจุลบแต่เพียงอย่างเดียว

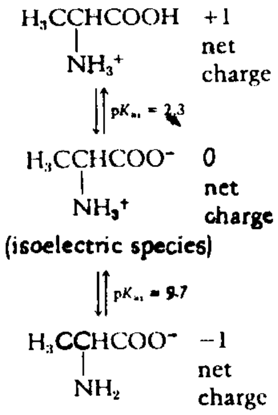
ตารางที่ 3.3 ค่า pK_a ของหมู่ R ที่แตกตัวได้ของกรดอะมิโนที่ 25°ซ

Amino acid	pK'_1 α-COOH	pK'_2 α-NH_3^+	pK'_R R group
Glycine	2.34	9.6	
Alanine	2.34	9.69	
Leucine	2.36	9.60	
Serine	2.21	9.15	
Threonine	2.63	10.43	
Glutamine	2.17	9.13	
Aspartic acid	2.09	9.82	3.86
Glutamic acid	2.19	9.67	4.25
Histidine	1.82	9.17	6.0
Cysteine	1.71	10.78	8.33
Tyrosine	2.20	9.11	10.07
Lysine	2.18	8.95	10.53
Arginine	2.17	9.04	12.48

ตัวอย่างการแตกตัวของกรดอะมิโนและการหาค่า pI :

1) **กรดอะมิโนที่เป็นกลาง เช่น อะลานีน**

Ionization of neutral amino acid (e.g., alanine)


H₃CCHCOOH
NH₃⁺
+1 net charge
pKₐ₁ = 2.3
H₃CCHCOO⁻
NH₃⁺
0 net charge
(isoelectric species)
pKₐ₂ = 9.7
H₃CCHCOO⁻
NH₂
−1 net charge

$$H_3C\underset{NH_3^+}{\underset{|}{C}}HCOOH \;(+1 \text{ net charge}) \underset{pK_{a_1}=2.3}{\rightleftharpoons} H_3C\underset{NH_3^+}{\underset{|}{C}}HCOO^- \;(0 \text{ net charge}) \underset{pK_{a_2}=9.7}{\rightleftharpoons} H_3C\underset{NH_2}{\underset{|}{C}}HCOO^- \;(-1 \text{ net charge})$$

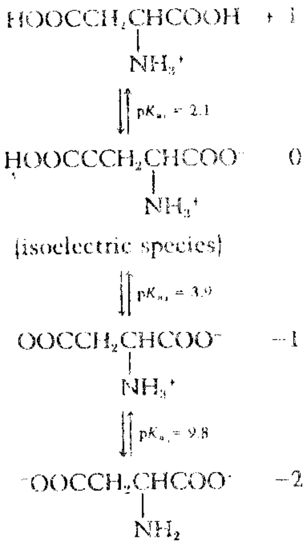
$$pI = \frac{pK_{a_1} + pK_{a_2}}{2} \text{ หรือ } \frac{pK_{a_{\alpha\text{-}NH_3}} + pK_{a_{\alpha\text{-}COOH}}}{2}$$

$$= \frac{2.34 + 9.69}{2}$$

$$= 6.02$$

2) **กรดอะมิโนประเภทแอซิดิค เช่น กรดแอสปาติค**

Ionization of
acidic amino
acid (e.g., aspartic acid)



HOOCCH2CHCOOH +1
NH3+
pKa1 = 2.1
HOOCCCH2CHCOO- 0
NH3+
(isoelectric species)
pKa2 = 3.9
-OOCCH2CHCOO- -1
NH3+
pKa3 = 9.8
-OOCCH2CHCOO- -2
NH2

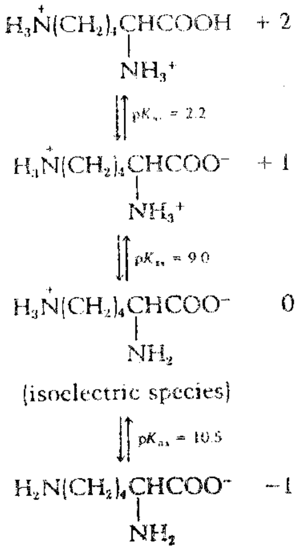
$$pI = \frac{pK_{a_1} + pK_{a_2}}{2} \text{ หรือ } \frac{pK_{a_{\alpha\text{-COOH}}} + pK_{a_R}}{2}$$

$$= \frac{2.09 + 3.86}{2}$$

$$= 2.98$$

3) กรดอะมิโนประเภทเบสิค เช่น ไลซีน

Ionization of
basic amino
acid (e.g., lysine)



H3N+(CH2)4CHCOOH +2
NH3+
pKa1 = 2.2
H3N+(CH2)4CHCOO- +1
NH3+
pKa2 = 9.0
H3N+(CH2)4CHCOO- 0
NH2
(isoelectric species)
pKa3 = 10.5
H2N(CH2)4CHCOO- -1
NH2

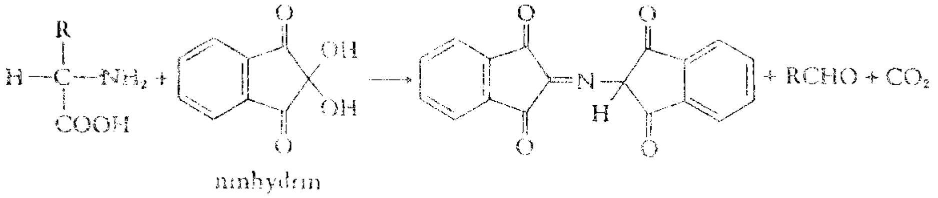
$$pI = \frac{pK_{a_2} + pK_{a_3}}{2} \text{ หรือ } \frac{pK_{a_{\alpha\text{-NH}_3}} + pK_{a_R}}{2}$$

$$= \frac{8.95 + 10.53}{2}$$

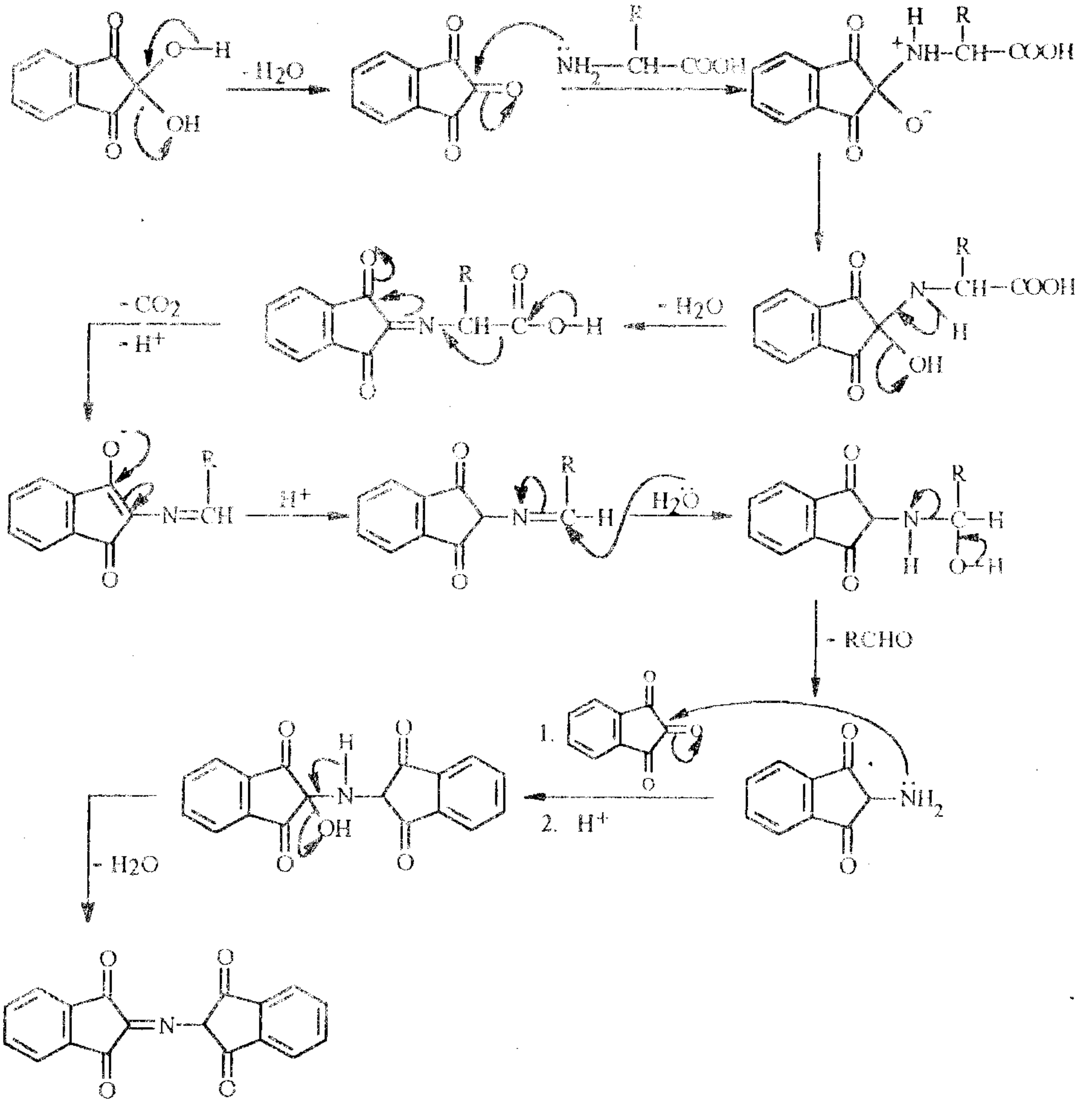
$$= 9.74$$

ปฏิกริยาเคมีของกรดอะมิโน

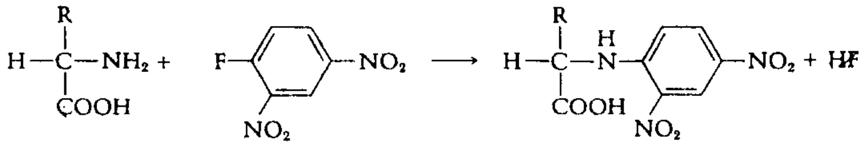
1. ปฏิกริยากับนินไฮดริน (ninhydrin)


R
H—C—NH₂ +
COOH
OH
OH
ninhydrin
N
H
+ RCHO + CO₂

สี Ruheman's blue ซึ่งเป็นสีน้ำเงินม่วง มีค่า λ_{max} ที่ 540 นาโนเมตรยกเว้นกรดอะมิโนโพรลีน ให้สีเหลืองซึ่งมีค่า λ_{max} ที่ 440 นาโนเมตร

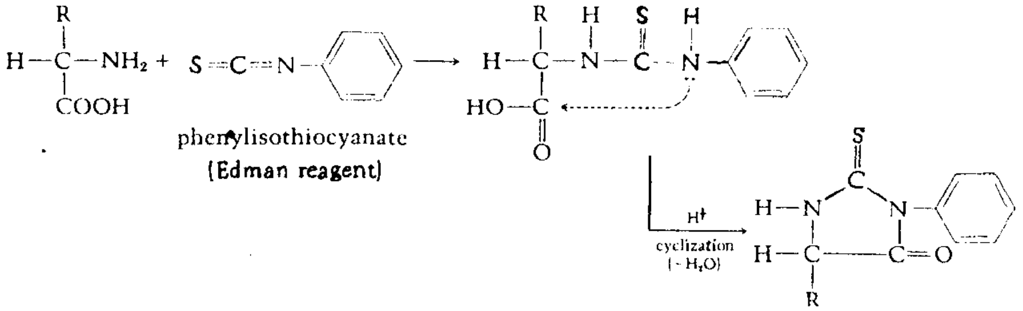

- H2O
NH2—CH—COOH
R
+NH—CH—COOH
H R
O⁻
- H2O
- CO2
- H+
H+
H2O
- RCHO
1.
2. H+
- H2O

2. ปฏิกริยากับ 2, 4-dinitrofluorobenzene หรือแซงเกอร์รีเอเจนต์ (Sanger reagent)


2,4-dinitrofluorobenzene
(Sanger's reagent)

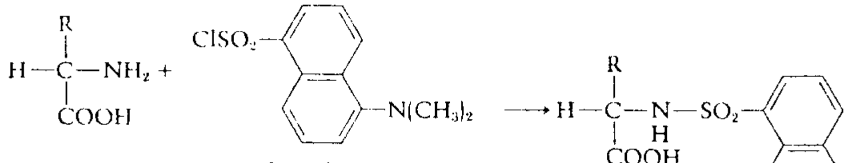
นอกจากจะทำปฏิกริยากับหมู่อัลฟาอะมิโนแล้วแซงเกอร์รีเอเจนต์ยังสามารถทำปฏิกริยากับหมู่ R ของกรดอะมิโนไลซีน อาร์จินีน ซีสเตอีน ไทโรซีนและฮีสติดีนอีกด้วย จากปฏิกริยานี้จะได้อนุพันธ์ dinitrophenyl (DNP) ของกรดอะมิโนซึ่งมีสีเหลือง เมื่อนำไปทำเปเปอร์หรือธินเลย์โครมาโตกราฟฟีเทียบกับอนุพันธ์ (DNP-กรดอะมิโน) มาตรฐาน จะทำให้สามารถบอกได้ว่ากรดอะมิโนนั้นเป็นกรดอะมิโนใด

3. ปฏิกริยากับ phenylisothiocyanate หรือเอ็ดมานรีเอเจนต์ (Edman's reagent)



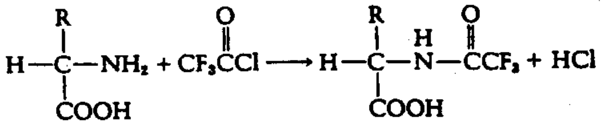
ปฏิกริยานี้ให้อนุพันธ์ phenylthiohydantoin (PTH) ของกรดอะมิโน เมื่อนำไปทำเปเปอร์หรือธินเลย์โครมาโตกราฟีเทียบกับอนุพันธ์ (PTH-กรดอะมิโน) มาตรฐาน ทำให้บ่งชี้ถึงชนิดของกรดอะมิโนชนิดนั้น ๆ ได้

4. ปฏิกริยากับ dansyl chloride


5-*d*imethylamino-
*n*aphthalenesulfon*yl* chloride
(*dansyl* chloride)

ปฏิกริยาระหว่างกรดอะมิโนกับ dansyl chloride จะให้อนุพันธ์ dansyl ของกรดอะมิโน เมื่อนำไปทำเปเปอร์หรือธินเลย์โครมาโตกราฟีเทียบกับอนุพันธ์ (dansyl-กรดอะมิโน) มาตรฐาน จะทำให้ทราบถึงชนิดของกรดอะมิโนนั้น ๆ ได้เช่นเดียวกัน

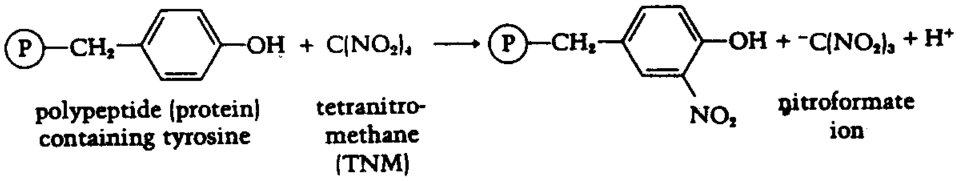
5. ปฏิกริยากับ trifluoroacetyl chloride



$$H-\overset{\overset{R}{|}}{\underset{\underset{COOH}{|}}{C}}-NH_2 + CF_3\overset{\overset{O}{\|}}{C}Cl \longrightarrow H-\overset{\overset{R}{|}}{\underset{\underset{COOH}{|}}{C}}-\overset{H}{N}-\overset{\overset{O}{\|}}{C}CF_3 + HCl$$

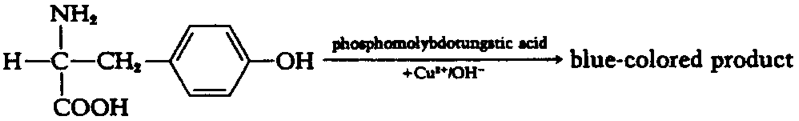
วิธีการนี้เหมาะสำหรับก๊าซ-ลิควิดโครมาโตกราฟี (gas-liquid chromatography) เพราะอนุพันธ์ trifluoroacetyl ของกรดอะมิโนสามารถกลายเป็นไอได้โดยไม่สลายตัว (decompose) ต่างจากกรดอะมิโนอิสระที่จะเกิดการสลายตัวได้ถ้าอยู่ในสถานะที่เป็นไอ

6. ปฏิกริยาของกรดอะมิโนไทโรซีนกับ tetranitromethane (TNM)


P
CH₂
OH
+ C(NO₂)₄
P
CH₂
OH
+ ⁻C(NO₂)₃ + H⁺
NO₂
polypeptide (protein) containing tyrosine
tetranitromethane (TNM)
nitroformate ion

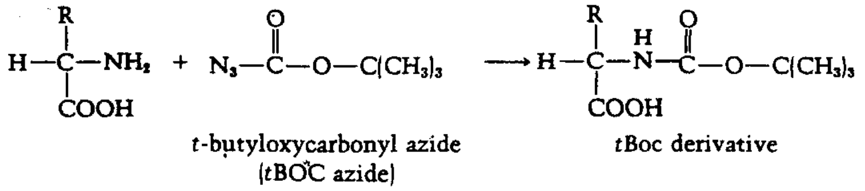
ปฏิกริยานี้จำเพาะต่อกรดอะมิโนไทโรซีนมาก TNM จะเลือกทำปฏิกริยาไนเตรชั่น (nitration) กรดอะมิโนไทโรซีนของเปปไทด์หรือโปรตีน ซึ่งอาจทำให้เปปไทด์หรือโปรตีนทำหน้าที่ต่อไปได้หรือไม่ได้แล้วแต่ว่ากรดอะมิโนไทโรซีนมีความสำคัญมากน้อยเพียงใดต่อโครงสร้างของเปปไทด์หรือโปรตีนนั้น ๆ

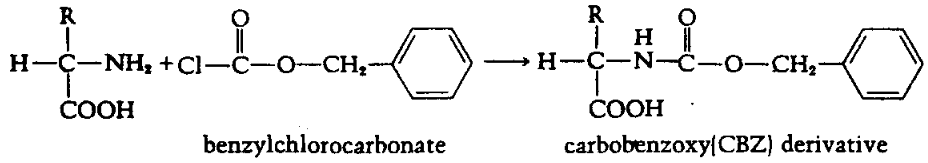
7. ปฏิกริยาของกรดอะมิโนไทโรซีนกับ phosphomolybdotungstic acid


NH₂
H
C
CH₂
OH
COOH
phosphomolybdotungstic acid
+Cu²⁺/OH⁻
blue-colored product

ปฏิกริยานี้ให้สารสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถติดตามโดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

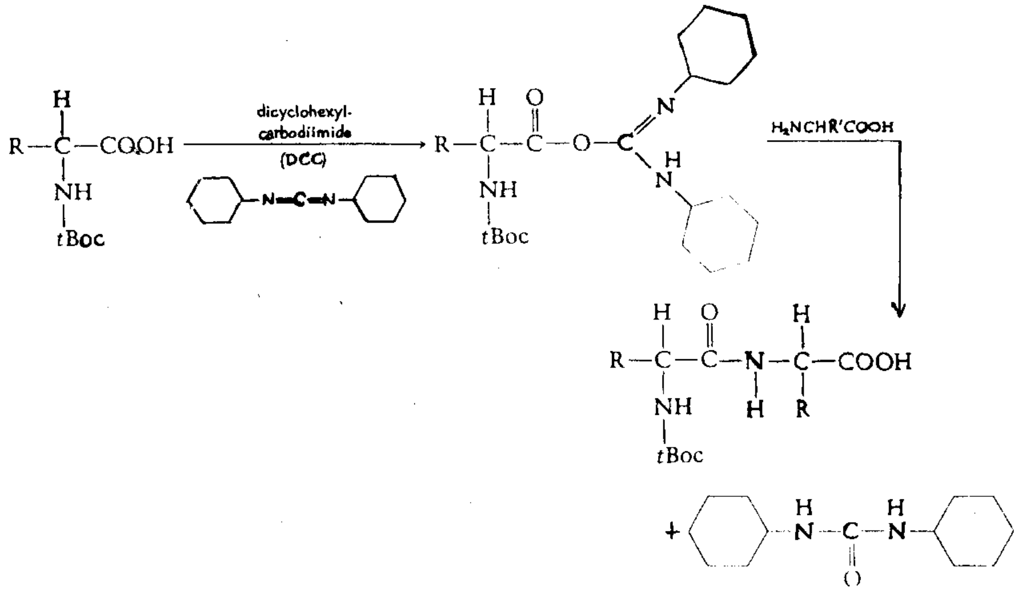
8. ปฏิกริยาที่จะกัน (block) หมู่อะมิโนอิสระ โดยใช้สารเคมีบางอย่างไปทำปฏิกริยากับหมู่อะมิโนนั้น ๆ ปฏิกริยานี้เป็นประโยชน์มากเวลาทำการสังเคราะห์เปปไทด์ด้วยวิธีทางเคมีในห้องปฏิบัติการ


t-butyloxycarbonyl azide
(tBOC azide)
tBoc derivative


benzylchlorocarbonate
carbobenzoxy(CBZ) derivative

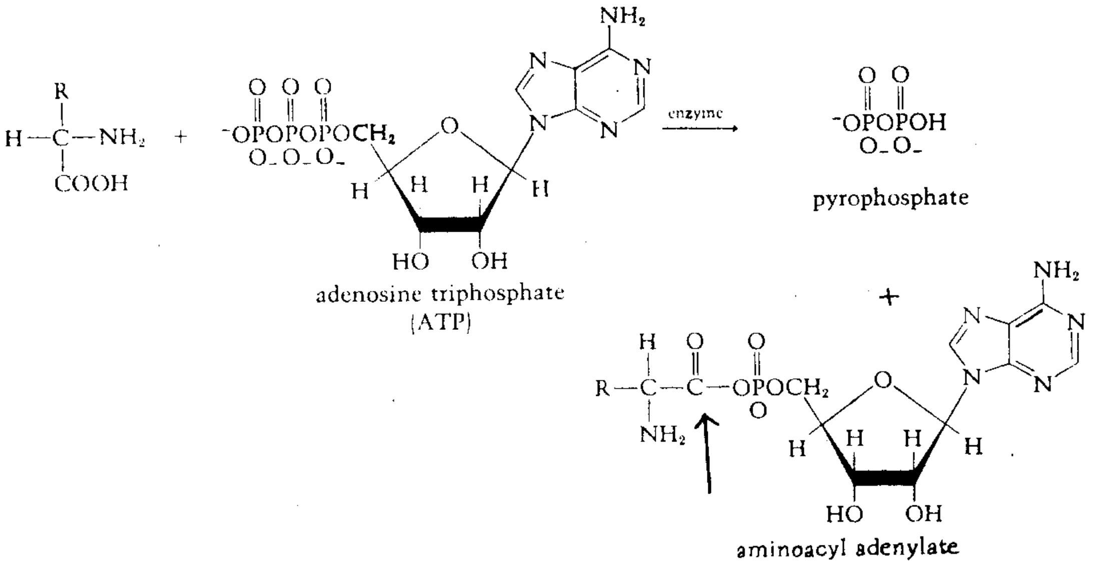
จะเห็นว่าอนุพันธ์ t-BOC หรืออนุพันธ์ CBZ ของกรดอะมิโนไม่มีหมู่อะมิโนอิสระเหลืออยู่ เป็นวิธีการหนึ่งในการที่จะกันมิให้หมู่อัลฟาอะมิโนเข้ามายุ่งเกี่ยวเวลาทำการสังเคราะห์พันธะเปปไทด์ อย่างไรก็ตามหมู่ t-BOC และหมู่ CBZ นี้เราสามารถที่จะขจัดออกภายหลังได้โดยที่ไม่มีผลต่อพันธะเปปไทด์แต่อย่างใด

๙. ปฏิกริยาระหว่างอนุพันธ์ t-BOC ของกรดอะมิโนกับกรดอะมิโนอื่น


dicyclohexyl-
carbodiimide
(DCC)
H₂NCHR'COOH
tBoc

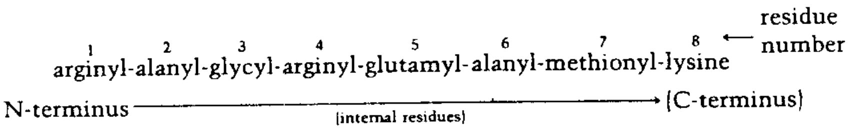
ปฏิกริยานี้เป็นการเชื่อมกรดอะมิโนสองตัวด้วยพันธะเปปไทด์ ใช้สาร dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ไปกระตุ้น (activate) หมู่คาร์บอกซิลเสียก่อน แล้วจึงไปทำปฏิกริยากับกรดอะมิโนตัวที่สองให้ได้ไดเปปไทด์ (dipeptide) ซึ่งยังคงมีหมู่ t-BOC ติดอยู่ ถ้าทำการแยกไดเปปไทด์นี้ออกมาได้ นำไปทำปฏิกริยากับ DCC และกรดอะมิโนตัวที่สามในรอบ (cycle) ต่อไปก็จะได้ไตรเปปไทด์ (tripeptide) ทำไปเช่นนี้เรื่อย ๆ ก็จะได้เปปไทด์ที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้นตามลำดับ

10. ปฏิกริยากับ adenosine triphospnate (ATP)


enzyme
adenosine triphosphate
(ATP)
pyrophosphate
aminoacyl adenylate

ปฏิกริยานี้เป็นการกระตุ้นกรดอะมิโน เกิดขึ้นในขั้นตอนแรกของขบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด คาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลตรงลูกศรชี้ในโมเลกุล aminoacyl adynylate นั้นจะว่องไวต่อปฏิกริยาเคมีมากกว่ากรดอะมิโนในรูปอิสระ

กรดอะมิโนเป็นหน่วยย่อยของเปปไทด์ ถ้ากรดอะมิโนสองตัวมาเชื่อมต่อกันด้วยหนึ่งพันธะเปปไทด์ เรียกว่าไดเปปไทด์ กรดอะมิโนสามตัวมาเชื่อมต่อกันด้วยสองพันธะเปปไทด์ เรียกว่าไตรเปปไทด์ กรดอะมิโนสี่ตัวมาเชื่อมต่อกันด้วยสามพันธะเปปไทด์ เรียกว่า เตทตระเปปไทด์ (tetrapeptide) ใช้คำนำหน้าเป็นได-, ไตร-, เตทตระ-, เปนตะ- (penta-), เฮกซะ- (hexa-), เฮปตะ- (hepta-), อ็อกตะ- (octa-), นาโน- (nano-), และเดกคะ- (deca-) บอกจำนวนกรดอะมิโนไปด้วยในตัวเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนระหว่างสองถึงสิบหน่วย รวมเรียกว่าโอลิโกเปปไทด์ (oligopeptide) กรดอะมิโนมากกว่าสิบหน่วยขึ้นไป รวมเรียกว่าโปลีเปปไทด์ (polypeptide) ปลายที่มีหมู่อะมิโนอิสระเรียกว่าปลาย N (N-terminus หรือ amino terminus) ปลายที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระเรียกว่าปลาย C (C terminus หรือ carboxyl terminus) การนับจำนวนหน่วยของกรดอะมิโนเริ่มต้นนับจากทางปลาย N เป็นหน่วยที่หนึ่ง


residue number
1 2 3 4 5 6 7 8
arginyl-alanyl-glycyl-arginyl-glutamyl-alanyl-methionyl-lysine
N-terminus
(internal residues)
(C-terminus)

หรือ

arg-ala-gly-arg-glu-ala-met-lys

การเขียนแบบข้างบนนี้เป็นการเขียนที่รู้ลำดับการเรียงตัว (sequence) ของกรดอะมิโนในเปปไทด์แล้ว หากยังไม่รู้ถึงการเรียงตัวให้ใช้เครื่องหมายลูกน้ำ (,) แทนเครื่องหมายขีด (–)

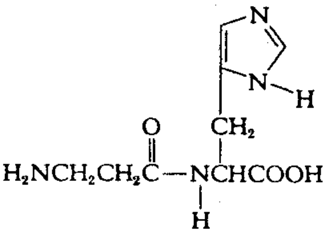
$\overset{1}{\text{arginyl}}\text{-(}\overset{2,3,4}{\text{alanyl,arginyl,glycine}}\text{)-}\overset{5}{\text{glutamyl}}\text{-(}\overset{6,7}{\text{alanyl,methionyl}}\text{)-}\overset{8}{\text{lysine}}$

หรือ

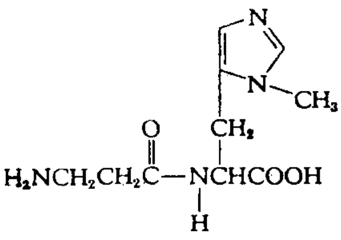
arg-(ala,arg,gly)-glu-(ala,met)-lys

เปปไทด์ประเภทต่าง ๆ

1. เปปไทด์ที่มิได้อยู่ในโมเลกุลของโปรตีน ได้แก่ คาร์โนซีน (carnosine) และแอนเซอรีน (anserine) ทั้งสองชนิดนี้ต่างก็เป็นเปปไทด์ที่เล็กที่สุดกล่าวคือเป็นไดเปปไทด์ พบในกล้ามเนื้อพวกสัตว์มีกระดูกสันหลัง บทบาทและหน้าที่ของสารสองชนิดนี้ยังไม่เป็นที่กระจ่างนัก

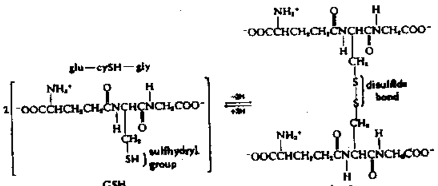


carnosine
(β-alanyl-L-histidine)



anserine
(β-alanyl-N^3-methyl-L-histidine)

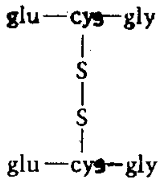
กลูตาไธโอน (glutathione) เป็นไตรเปปไทด์ พบได้ทั่วไปในพวกพืช สัตว์ และบักเตรี มี 2 รูปแบบ รูปแบบออกซิไดซ์และรูปแบบรีดิวซ์ มีความสำคัญเกี่ยวกับการขนส่งกรดอะมิโนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ช่วยทำให้เหล็กของโมเลกุลฮีโมโกลบินอยู่ในรูป Fe^{+2} รูปแบบรีดิวซ์จะเป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่สารอื่นโดยเฉพาะโปรตีน



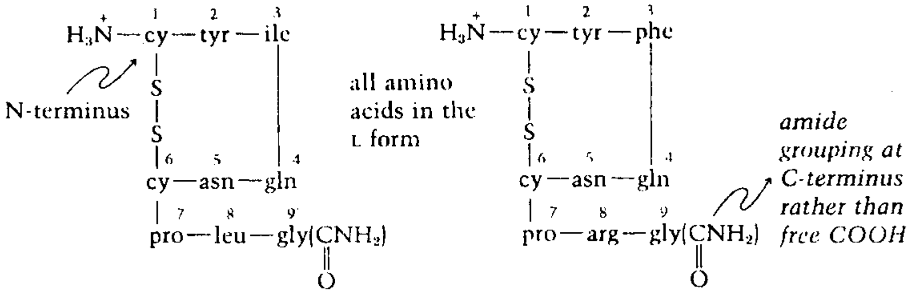
CSH
(reduced glutathione)

GSSG
(oxidized glutathione)

GSSG อาจเขียนเป็นสัญลักษณ์ได้เป็น


glu—cys—gly
S
S
glu—cys—gly

2. เปปไทด์ฮอร์โมน ได้แก่ ออกซีโทซิน (oxytocin) และวาโซเปรสซิน (vasopressin) ฮอร์โมน 2 ชนิดนี้โครงสร้างคล้ายคลึงกันมาก เป็นนาโนเปปไทด์เหมือนกัน ฮอร์โมนออกซีโทซินกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกในสตรีมีครรภ์และกระตุ้นการหลั่งน้ำนมของมารดา ฮอร์โมนวาโซเปรสซินกระตุ้นการดูดน้ำกลับเข้าไต (water reabsorption) และกระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบโดยเฉพาะหลอดเลือด ทำให้มีผลต่อการควบคุมความดันเลือด

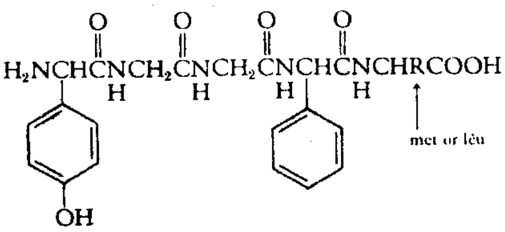

H₃N—cy—tyr—ile
1 2 3
N-terminus
S
S
6 5 4
cy—asn—gln
7 8 9
pro—leu—gly(CNH₂)
O
all amino acids in the L form
H₃N—cy—tyr—phe
1 2 3
S
S
6 5 4
cy—asn—gln
7 8 9
pro—arg—gly(CNH₂)
O
amide grouping at C-terminus rather than free COOH

human oxytocin human vasopressin

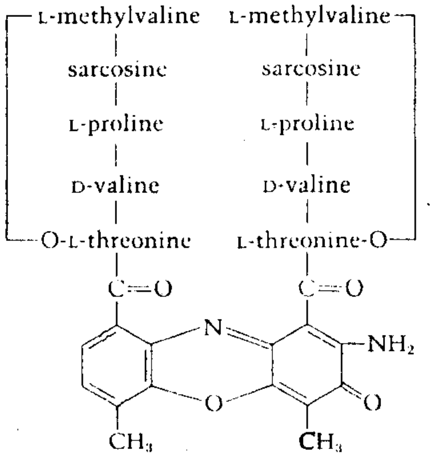
3. เปปไทด์ที่เป็นสารควบคุมการส่งความรู้สึกทางประสาท (neurotransmitter) มีการค้นพบสาร enkephalins ในเซลล์สมอง หน้าที่เกี่ยวข้องกับการส่งความรู้สึกเจ็บปวด (pain) และการแสดงออกทางอารมณ์ (emotional behavior) มีสองชนิดเป็นเปนตะเปปไทด์ทั้งคู่โครงสร้างต่างกันที่กรดอะมิโนตัวสุดท้ายเพียงตัวเดียว

tyr—gly—gly—phe—met
methionine-enkephalin

tyr—gly—gly—phe—leu
leucine-enkephalin

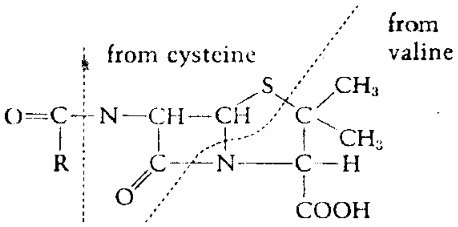

O O O O
H₂NCHCNCH₂CNCH₂CNCHCNCHRCOOH
H H H H
OH
met or leu

4. เปปไทด์ที่เป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotics) โครงสร้างของยาปฏิชีวนะโดยมากจะเป็นเปปไทด์ทั้งโมเลกุลหรืออาจจะประกอบด้วยเปปไทด์เพียงบางส่วนเท่านั้น ตัวอย่างเช่น


L-methylvaline
L-methylvaline
sarcosine
sarcosine
L-proline
L-proline
D-valine
D-valine
O-L-threonine
L-threonine-O
C=O
C=O
N
O
NH2
O
CH3
CH3

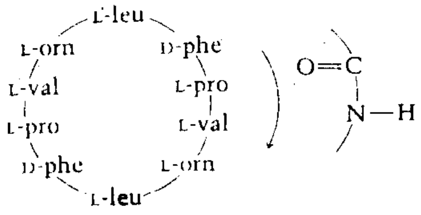
actinomycin D

Actinomycin D ได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ streptomyces จะไปจับกับโมเลกุล DNA ทำให้มีผลยับยั้งขบวนการ transcription ไม่สามารถสังเคราะห์ RNA จากแม่พิมพ์ DNA ได้


from cysteine
from valine
O=C
R
N
CH
CH
S
C
CH3
CH3
C
N
C
H
O
COOH

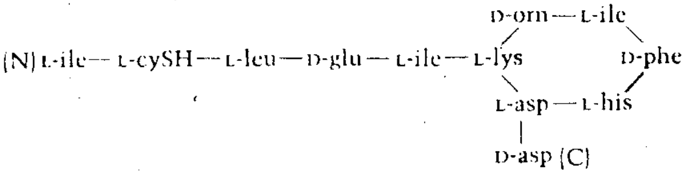
penicillin

Penicillin ได้มาจากเชื้อรา Penicillium สามารถยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์บางจำพวกทำให้เชื้อจุลินทรีย์นั้นไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้


L-leu
L-orn
D-phe
L-val
L-pro
L-pro
L-val
D-phe
L-orn
L-leu
O=C
N—H

gramicidin S

Gramicidin S ผลิตมาจากเชื้อแบคทีเรีย Bacillus brevis โครงสร้างเป็นวงกลม มีทั้งกรดอะมิโนไอซอมเมอร์ D– และ L– อยู่ภายในโมเลกุล


(N) L-ile — L-cySH — L-leu — D-glu — L-ile — L-lys
D-orn — L-ile
D-phe
L-asp — L-his
D-asp (C)

bacitracin A

Bacitracin A ผลิตมาจากเชื้อแบคทีเรีย Bacillus licheniformis

หน้าที่ของโปรตีน

1. เร่งปฏิกริยาภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอ็นไซม์ทั่ว ๆ ไป

2. เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้างอวัยวะต่าง ๆ เช่น คอลลาเจน (collagen) เป็นโปรตีนที่พบตามเนื้อเยื่อคอนเนคตีฟ (connective tissue) มีประมาณหนึ่งในสามของโปรตีนทั้งหมดทั่วร่างกาย

3. ช่วยเกี่ยวกับการยืดหดของกล้ามเนื้อ ได้แก่ โปรตีนแอคติน (actin) และไมโอซิน (myosin)

4. ป้องกันอันตรายจากสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ แอนติบอดี้ (antibodies) เป็นโปรตีนซึ่งจะพบในส่วนของแกมม่ากลอบูลิน (gamma globulin) ในเลือด

5. ช่วยย่อยอาหาร ได้แก่ เอ็นไซม์ต่าง ๆ ในทางเดินอาหาร

6. ช่วยในการขนส่ง เช่น ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนในเลือดที่ช่วยขนส่งออกซิเจน หรือโปรตีนที่อยู่ตามเยื่อหุ้มเซลล์ จะช่วยในการขนส่งโมเลกุลต่าง ๆ จากด้านหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ไปยังอีกด้านหนึ่ง

7. ช่วยในการแข็งตัวของเลือด เช่น โปรตีนไฟบริโนเจน (fibrinogen)

8. ควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ โปรตีนที่เป็นฮอร์โมน เช่น อินสุลิน

9. ช่วยในการส่งผ่านอิเล็คตรอนไปยังตัวรับที่เหมาะสม ได้แก่ โปรตีนในลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain) คือไซโตโครม (cytochromes)

10. ควบคุมเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน (gene) ในโครโมโซม (chromosomes) คือโปรตีนกดดัน (repressor protein)

11. ทำหน้าที่ต้อนรับ ได้แก่ โปรตีนที่อยู่ตามเยื่อหุ้มเซลล์จะรวมตัวกับโมเลกุลจำเพาะภายนอกเซลล์ แล้วส่งข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้รับเข้าไปภายในเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ขึ้นมากมายภายในเซลล์

12. รวมตัวอยู่กับโมเลกุล RNA (Ribonucleic acid) เป็นไรโบโซม (ribosome) ไรโบโซมมีหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีน

13. โปรตีนจากสัตว์เลื้อยคลานบางชนิดเป็นพิษต่อระบบประสาทของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น พิษงูต่าง ๆ

การจำแนกประเภทของโปรตีน มี 2 วิธี คือ

1. **จำแนกตามองค์ประกอบ** (composition) การจำแนกแบบนี้แบ่งโปรตีนออกเป็น 2 ประเภท

1.1 โปรตีนเชิงเดียว (simple protein) โปรตีนชนิดนี้ถ้านำไปไฮโดรไลซ์จะได้สารประเภทกรดอะมิโนอย่างเดียว

1.2 โปรตีนคอนจูเกต (conjugated protein) ถ้านำไปทำไฮโดรไลซีสจะได้กรดอะมิโนสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ปนออกมาด้วย บางครั้งเรียกสารที่ปนออกมานั้นว่าหมู่พรอสเธติค (prosthetic group) หมู่พรอสเธติคนี้จะจับกับโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนท์หรือไม่ก็ได้

โปรตีนเชิงเดียว	โปรตีนคอนจูเกตและหมู่พรอสเธติค	
albumin	lipoprotein	lipid
globulin	glycoprotein	carbohydrate
collagen	metalloprotein	metal ion
protamine	phosphoprotein	phosphate
histone	hemoprotein	heme
	flavoprotein	flavine

2. การจำแนกตามโครงสร้างสามมิติ (3-Dimensional structure, conformation) การจำแนกแบบนี้แบ่งโปรตีนออกได้เป็น 2 ประเภทเช่นกัน

2.1 โปรตีนเส้นใย (fibrous protein) เป็นโปรตีนที่โมเลกุลใหญ่รูปร่างยาวคล้ายเส้นด้าย ประกอบด้วยโปลีเปปไทด์ตั้งแต่สองสายขึ้นไป ไม่ค่อยจะละลายในน้ำ ตัวอย่างเช่น คอลลาเจน

2.2 โปรตีนก้อนกลม (globular protein) โปรตีนชนิดนี้โครงสร้างอัดแน่นกว่าโปรตีนเส้นใย สายโปลีเปปไทด์จะคดโค้งหรือบิดงออย่างมีระเบียบแบบแผน อาจจะประกอบด้วยโปลีเปปไทด์ตั้งแต่หนึ่งสายหรือสองสายขึ้นไป รูปร่างจะเป็นทรงกลม (sphere) หรือรูปไข่ (ellipse) ละลายน้ำได้ดีกว่าโปรตีนเส้นใยมาก ตัวอย่างเช่น พวกเอ็นไซม์ต่าง ๆ

โครงสร้างของโปรตีน (Conformation of protein)

โครงสร้างโปรตีนแบ่งออกเป็น 4 ระดับคือ

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) จะบอกให้ทราบถึงองค์ประกอบของโปลีเปปไทด์ว่าประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดใดบ้าง จำนวนอย่างละเท่าใด และกรดอะมิโนเหล่านั้นมีการเรียงตัว (sequence) อย่างไร

2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) บอกให้ทราบถึง geometrical orientation ของโปลีเปปไทด์

3. โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) บอกให้ทราบถึงโครงสร้างสามมิติอย่างสมบูรณ์แบบ ครอบคลุมไปถึง orientation และหมู่พรอสเธติค

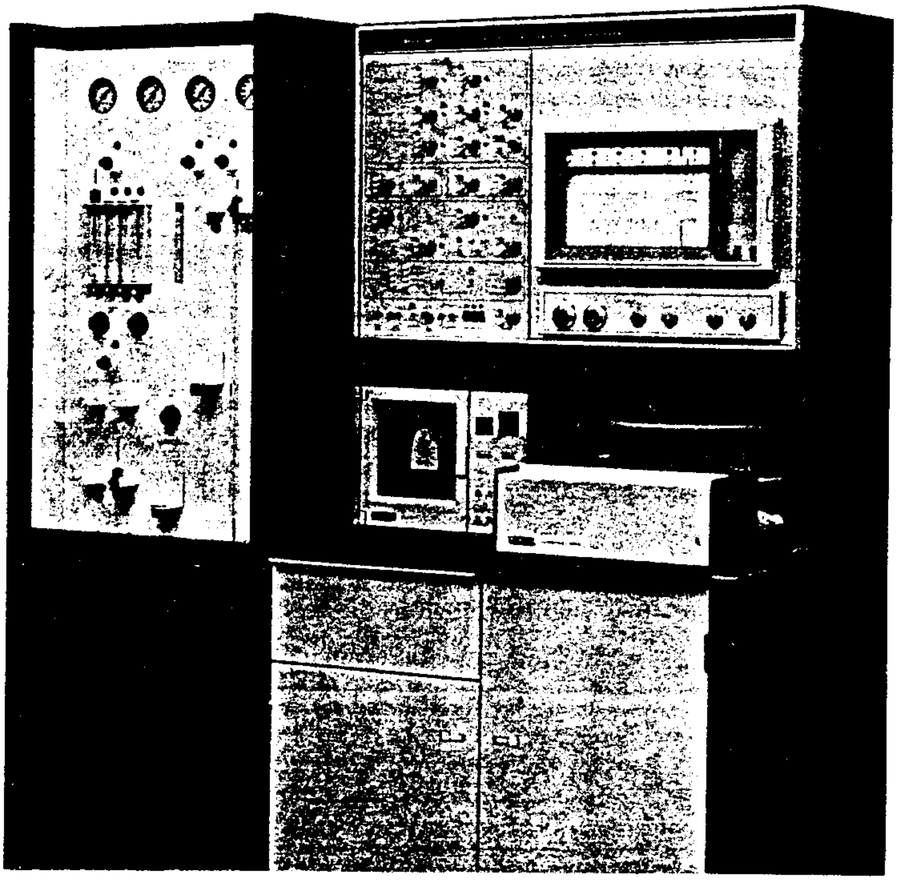
4. โครงสร้างจตุรภูมิ (quarternary structure) บอกให้ทราบถึงการรวมตัวกันของโปลีเปปไทด์ตั้งแต่สองสายขึ้นไป การรวมตัวนี้ไม่ต้องอาศัยพันธะโควาเลนท์

โมเลกุลโปรตีนทุกชนิดจะมีโครงสร้างแบบที่หนึ่ง แบบที่สองและแบบที่สาม ส่วนโครงสร้างแบบที่สี่นั้นจะมีเฉพาะกับโปรตีนบางชนิดเท่านั้น

โครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure)

แสดงถึงองค์ประกอบและการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายของโปลีเปปไทด์

การหาองค์ประกอบของกรดอะมิโน



รูปที่ 3.4 เครื่องมือวิเคราะห์กรดอะมิโน

กระทำได้โดยการย่อยสลายเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระหลาย ๆ ตัวรวมกัน แล้วนำไปวิเคราะห์โดย โครมาโตกราฟีแบบ ion-exchange อีกทีหนึ่ง วิธีมาตรฐานทั่ว ๆ ไปที่ใช้ย่อยโปลีเปปไทด์ คือการใช้กรดย่อยสลาย (acid hydrolysis) ปรกติใช้ 6 N HCl 12-36 ชม. ที่ 100-110°ซ

ภายใต้สูญญากาศ สภาวะเช่นนี้จะทำลายพันธะเปปไทด์หรือพันธะแอมีดทุกพันธะจนหมดสิ้น ข้อดีของวิธีนี้ก็คือไม่เกิด racemization ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไอซอมเมอร์ D– เป็น L– หรือ L– ไปเป็น D– แต่ก็มีข้อเสียตรงที่ว่ากรดอะมิโนทริปโตแฟนถูกทำลายจนหมด ปัจจุบันนี้มีการใช้กรด methanesulfonic แทนกรด HCl ซึ่งเป็นที่นิยมเพราะทริปโตแฟนไม่ถูกทำลาย

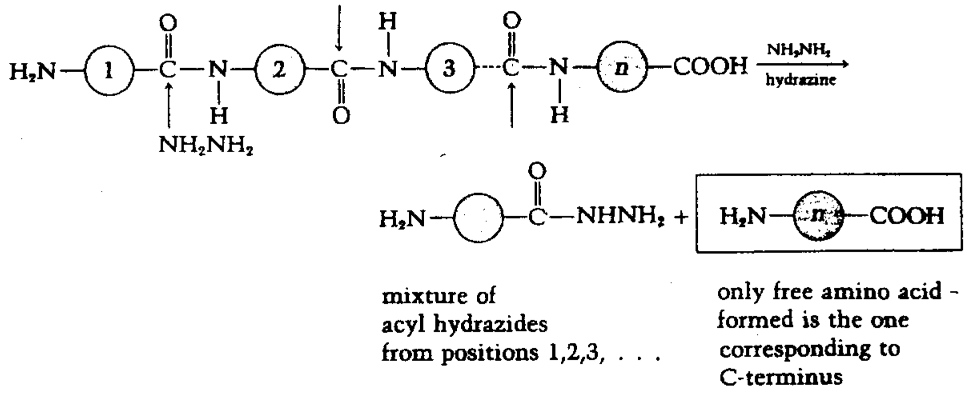
วิธีที่สองเป็นการใช้ด่างในการย่อยสลาย (base hydrolysis) ปรกติใช้ 2 N NaOH ข้อดีวิธีนี้คือไม่ทำลายกรดอะมิโนทริปโตแฟน ข้อเสียคือทำให้เกิด racemization และทำลายกรดอะมิโนอื่นบางตัว ส่วนวิธีที่สามการย่อยสลายโดยใช้เอ็นไซม์ประเภท proteolytic หรือ protease หรือ peptidase ที่ใช้กันมากคือเอ็นไซม์ pronase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ วิธีนี้ดีเพราะไม่มีการทำลายใด ๆ ทั้งสิ้น แต่ก็ควรจะระวังเกี่ยวกับการปลอมปนของสารอื่นที่มากับเอ็นไซม์ (contamination) กรดอะมิโนต่าง ๆ ที่ได้จากการย่อยไม่ว่าวิธีใดก็ตามก็จะถูกนำไปวิเคราะห์ทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพโดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์กรดอะมิโน (amino acid analyzer) เครื่องมือนี้อาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีแบบ ion-exchange และปฏิกริยานินไฮดรินทำให้เราทราบถึงองค์ประกอบและการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายโปลีเปปไทด์

การหาการเรียงตัวของกรดอะมิโน

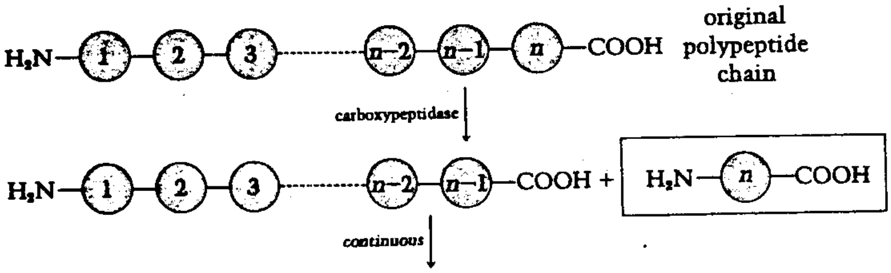
เริ่มต้นด้วยการหาปลายข้างใดข้างหนึ่งก่อน

วิธีการหาปลายคาร์บอกซิล, C_t (carboxyl terminus determination) มี 3 วิธีด้วยกันคือ

1. ให้ hydrazine ทำปฏิกริยากับสายโปลีเปปไทด์ตรงหมู่คาร์บอนิลของพันธะเปปไทด์ทุก ๆ พันธะ ได้ผลิตผลเป็นอนุพันธ์แอซิลไฮดราไซด์ของกรดอะมิโนแต่ละตัว ยกเว้นกรดอะมิโนตัวสุดท้ายทางปลายคาร์บอกซิลหรือปลาย C ที่จะเป็นกรดอะมิโนอิสระเพียงตัวเดียว ทั้งนี้เพราะหมู่อัลฟาคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวสุดท้ายมิได้อยู่ในรูปพันธะเปปไทด์ แยกและสกัดเอากรดอะมิโนอิสระนั้นออกมาทำโครมาโตกราฟีเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐาน ก็จะทราบว่ากรดอะมิโนที่ปลาย C เป็นกรดอะมิโนตัวใด


H₂N
1
2
3
n
COOH
NH₂NH₂
hydrazine
NH₂NH₂
NHNH₂
H₂N
COOH
mixture of acyl hydrazides from positions 1,2,3, . . .
only free amino acid formed is the one corresponding to C-terminus

2. ใช้เอ็นไซม์ carboxypeptidase A เอ็นไซม์นี้จัดเป็น exopeptidase จำเพาะต่อการไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ทางด้านปลาย C ถ้ามีกรดอะมิโนทั้งหมด n หน่วยในสายเปปไทด์นั้น ๆ นำไปย่อยด้วยเอ็นไซม์ carboxypeptidase A จะได้ผลิตผลเป็นสายเปปไทด์ซึ่งมีความยาวเท่ากับกรดอะมิโน n-1 หน่วยกับกรดอะมิโนอิสระตัวสุดท้ายที่อยู่ที่ตำแหน่ง n วิธีนี้มีความยุ่งยากตรงที่ว่าเมื่อเหลือสายเปปไทด์ n 1 หน่วย เอ็นไซม์มิได้หยุดเพียงแค่นั้นแต่จะย่อยพันธะเปปไทด์ทางด้านปลาย C ต่อไปอีกให้เหลือ n-2, n-3, n-4, ... เช่นนี้เรื่อยไปตามลำดับจนกระทั่งสายเปปไทด์สั้นลง ๆ แยกกรดอะมิโนอิสระออกไปทำโครมากราฟีเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐานก็จะทราบว่ากรดอะมิโนในหน่วยที่ n หรือที่ปลาย C เป็นกรดอะมิโนอะไร วิธีการนี้ถ้าควบคุมอัตราเร็วการไฮโดรไลซีสให้ดีพอจะทำให้ทราบการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์นั้น ๆ ได้เลย



3. ใช้สารเคมี Lithium borohydride, LiBH$_4$ รีดิวซ์หมู่คาร์บอกซิลที่ปลาย C ให้กลายเป็นอัลกอฮอลล์ แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรด เปปไทด์สายนั้นก็จะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนอิสระยกเว้นกรดอะมิโนตัวสุดท้ายจะอยู่ในรูปอะมิโนอัลกอฮอลล์ แยกอะมิโนอัลกอฮอลล์นั้นออกมาแล้วนำไปวิเคราะห์ดูก็จะทราบว่ากรดอะมิโนทางปลาย C เป็นกรดอะมิโนตัวใด

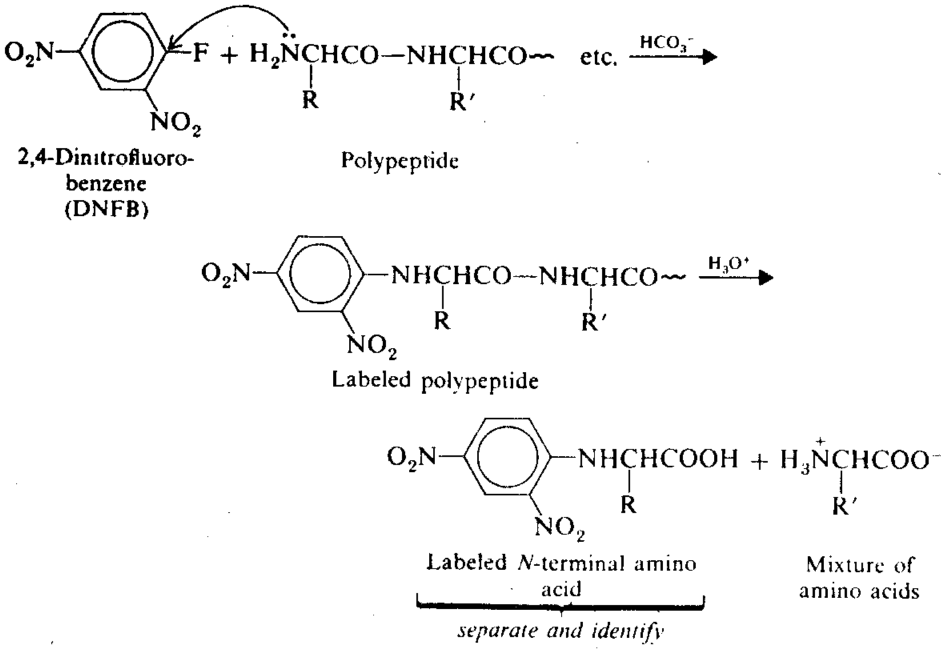
วิธีการหาปลายอะมิโน, N$_t$ (amino terminus determination)

มี 4 วิธี ดังนี้

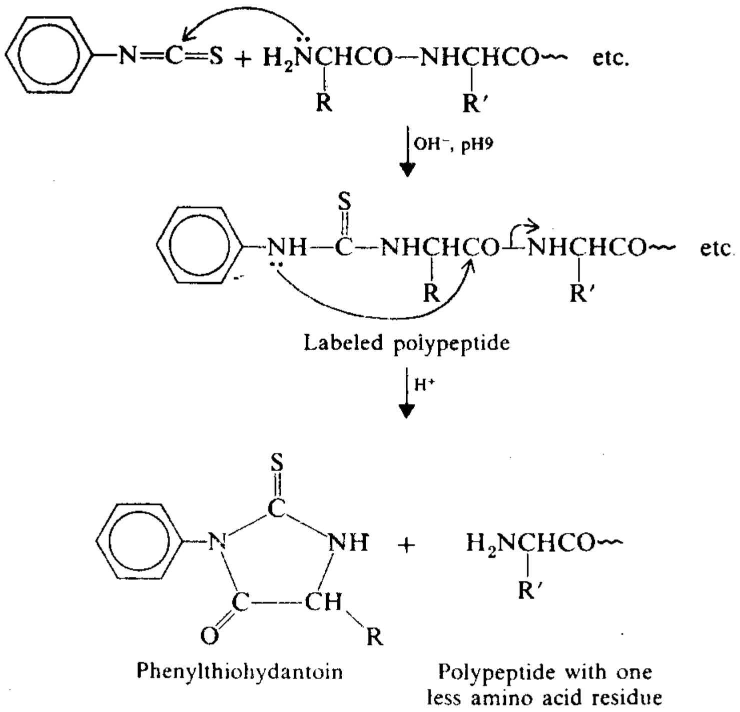
1. วิธีการ dansylation ใช้สาร dansyl chloride (ดูหน้า 74)

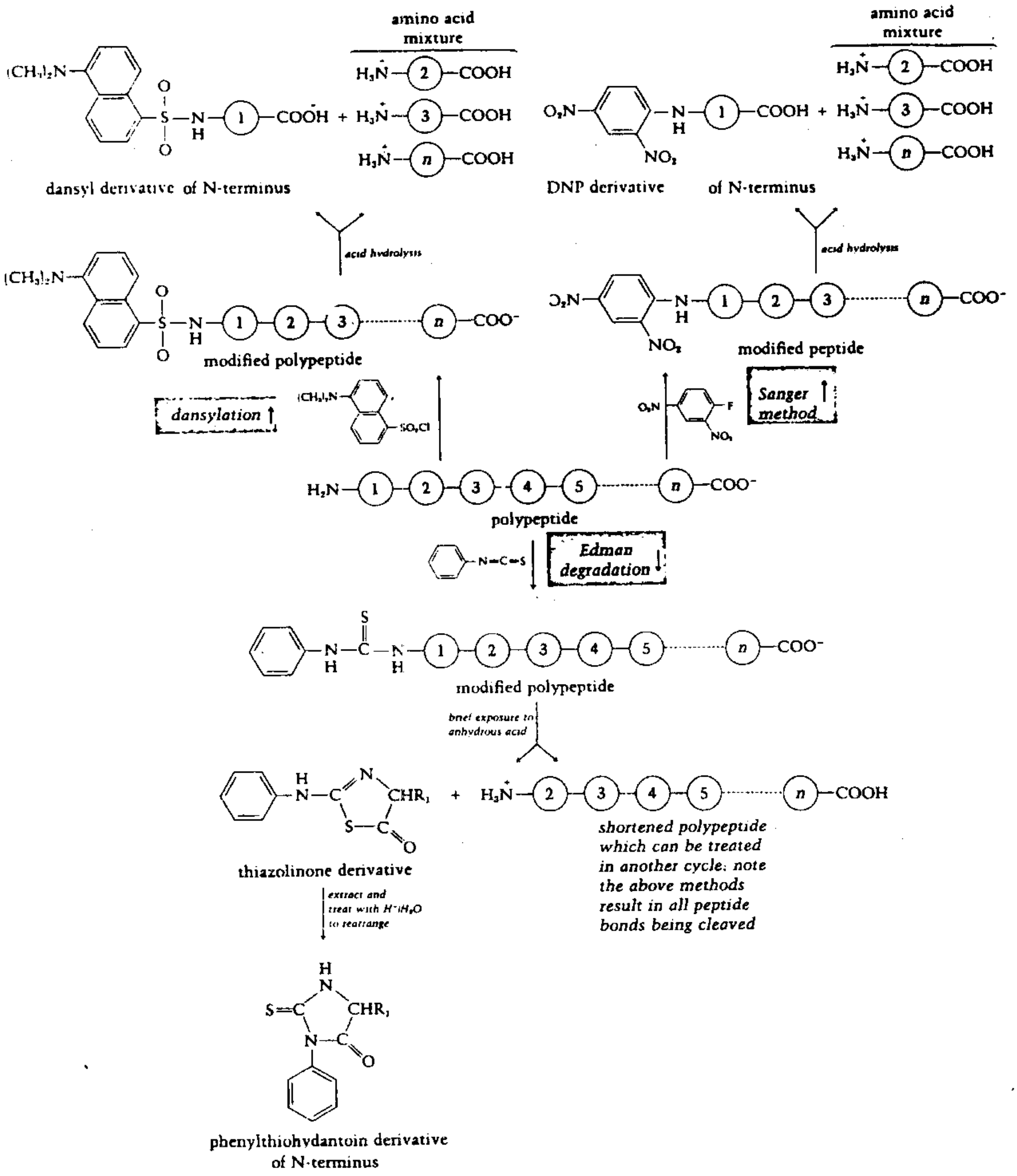
2. วิธีของ Sanger ใช้สาร 2, 4-dinitrofluorobenzene (ดูหน้า 74) เทคนิคนี้ F Sanger เป็นคนริเริ่มขึ้น เขาใช้วิธีการดังกล่าวหาการเรียงตัวของกรดอะมิโนในฮอร์โมนอินสุลินเป็นผลสำเร็จในปี 1955 ฮอร์โมนอินสุลินเป็นโปรตีนตัวแรกที่เราทราบถึงการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยสมบูรณ์ ทำให้ F Sanger ได้รับรางวัลโนเบลสำหรับเทคนิคที่เขาได้คิดค้นขึ้นมานี้

วิธีที่หนึ่งและวิธีที่สองนี้หลักการคล้ายคลึงกัน หลังจากที่ได้อนุพันธ์ DNP และอนุพันธ์ dansyl แล้วต้องนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเพื่อทำลายพันธะเปปไทด์


2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB)
Polypeptide
HCO_3^-
etc.
Labeled polypeptide
H_3O^+
Labeled N-terminal amino acid
Mixture of amino acids
separate and identify

3. Edman Degradation เป็นวิธีของ F. Edman ใช้สาร phenylisothiocyanate (ดูหน้า 73 ด้วย)

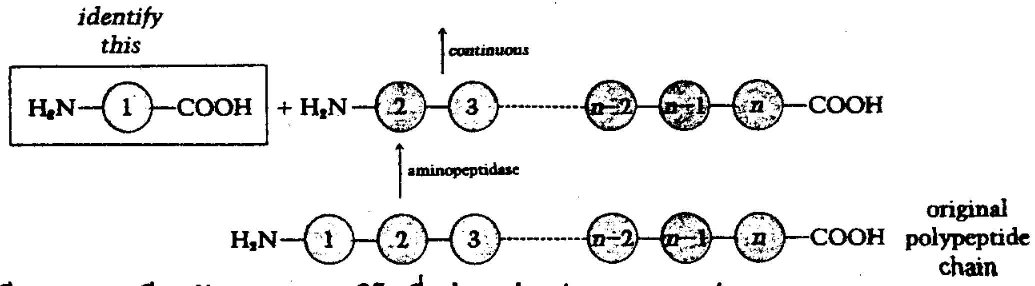

etc.
OH^-, pH9
Labeled polypeptide
H^+
Phenylthiohydantoin
Polypeptide with one less amino acid residue


amino acid mixture
dansyl derivative of N-terminus
amino acid mixture
DNP derivative of N-terminus
acid hydrolysis
acid hydrolysis
modified polypeptide
modified peptide
dansylation
Sanger method
polypeptide
Edman degradation
modified polypeptide
brief exposure to anhydrous acid
thiazolinone derivative
shortened polypeptide which can be treated in another cycle; note the above methods result in all peptide bonds being cleaved
extract and treat with H⁺/H₂O to rearrange
phenylthiohydantoin derivative of N-terminus

รูปที่ ๓.๕ เปรียบเทียบวิธีการหา N_t ทั้งสามแบบ

วิธีของ Edman เป็นวิธีการหาปลาย N ที่ดีที่สุด หลังจากได้อนุพันธ์ PTH แล้ว นำไปทำโครมาโตกราฟีเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐาน ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ ไม่ต้องทำการไฮโดรไลซีสด้วยกรดไม่มีการทำลายพันธะเปปไทด์ส่วนที่ไม่เกี่ยวข้อง เปปไทด์ยังคงเป็นสายเหมือนเดิมเพียงแต่สั้นลงไป สามารถนำไปทำปฏิกริยาในรอบต่อไปได้อีกเรื่อย ๆ ซึ่งต่างไปจากสองวิธีแรก วิธีของ Edman นี้ใช้หาการเรียงตัวของโปลีเปปไทด์สั้น ๆ ประมาณ 10-20 หน่วยของกรดอะมิโน

4. ใช้เอ็นไซม์ aminopeptidase ซึ่งเป็น exopeptidase เช่นเดียวกับเอ็นไซม์ carboxypeptidase A ต่างกันที่ว่าเอ็นไซม์นี้จำเพาะในการไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ทางด้านปลาย N ได้กรดอะมิโนอิสระออกมาจากทางปลาย N ทีละหน่วย ๆ สายเปปไทด์ก็สั้นลง ๆ ไปเรื่อย ข้อดีของการใช้เอ็นไซม์นี้ก็คือ ถ้าควบคุมอัตราเร็วการไฮโดรไลซีสให้พอเหมาะจะทำให้ทราบการเรียงตัวของสายเปปไทด์นั้นได้เลยมีข้อเสียตรงที่ว่า ปฏิกริยาการไฮโดรไลซีสนี้เป็นปฏิกริยาต่อเนื่อง (continuous) กรดอะมิโนอิสระที่ปลาย N อาจจะปะปนกับกรดอะมิโนอิสระตัวอื่นถ้าไม่มีการควบคุมอัตราเร็วปฏิกริยาให้ดีพอ

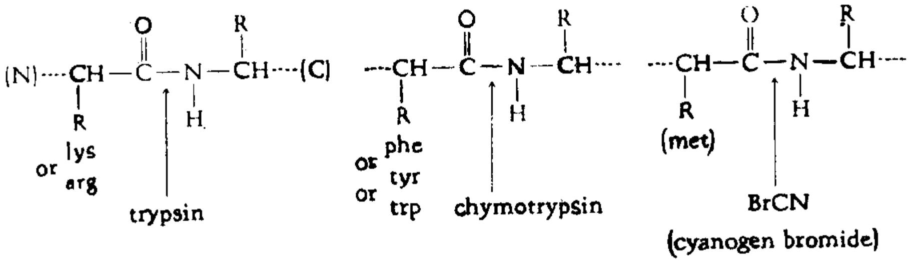

identify this
H_2N—1—COOH
+ H_2N—2—3——n−2—n−1—n—COOH
continuous
aminopeptidase
H_2N—1—2—3——n−2—n−1—n—COOH
original polypeptide chain

วิธีการหาการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างปลาย N และปลาย C (internal residues determination)

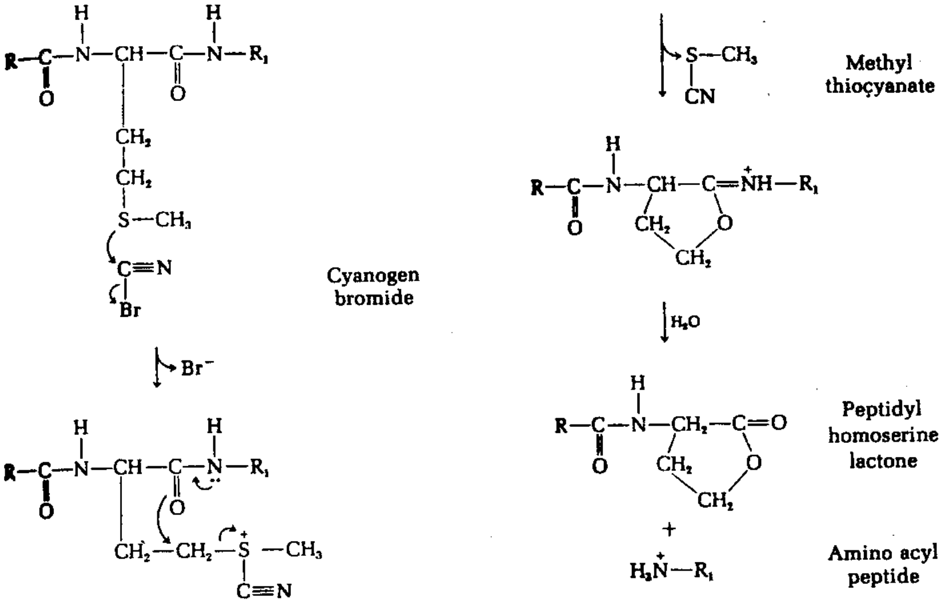
เปปไทด์สายสั้นประมาณ 10-20 หน่วยกรดอะมิโนก็สามารถใช้เทคนิค Edman Degradation หาการเรียงตัวได้เลย แต่ถ้าเป็นโปลีเปปไทด์สายยาว จำเป็นจะต้องตัดให้เป็นสายสั้น ๆ เสียก่อนแยกแต่ละสายออกจากกันแล้วจึงนำไปหาการเรียงตัวของแต่ละสายโดยใช้วิธีของ Edman อีกทีหนึ่ง สำหรับขั้นตอนที่จะตัดเปปไทด์ให้เป็นสายสั้น ๆ หลายสายนั้นจำเป็นต้องเป็นปฏิกริยาที่จำเพาะ เพื่อที่ว่าเมื่อหาการเรียงตัวของเปปไทด์สายสั้น ๆ เหล่านั้นได้แล้ว จะได้นำเปปไทด์แต่ละสายนั้นมาเรียงต่อกันในตำแหน่งและลำดับที่ถูกต้อง ปฏิกริยาการตัดเปปไทด์ที่จำเพาะนี้ต้องอาศัยเอ็นไซม์ประเภท proteolytic ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่นิยมใช้กันมากคือ เอ็นไซม์ trypsin และเอ็นไซม์ chymotrypsin เอ็นไซม์สองชนิดนี้เป็น endopeptidase ทำการไฮโดรไลซ์ภายในสายโปลีเปปไทด์ต่างกับ carboxypeptidase A และ aminopeptidase ซึ่งเป็น exopeptidase ไฮโดรไลซ์จากทางปลายสายเข้าไป เอ็นไซม์ trypsin ไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ภายในสายตรงหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนไลซีนและอาร์จินีน ส่วนเอ็นไซม์ chymotrpsin จะไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ภายใน

สายตรงหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนประเภท aromatic ซึ่งได้แก่กรดอะมิโนเฟนิลอะลานีน ไทโรซีน และทริปโตแฟน

นอกจากเอ็นไซม์ proteolytic แล้ว สารเคมี cyanogen bromide, CNBr ก็เป็นที่นิยมใช้ เนื่องจากว่าสารนี้มีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ภายในสายตรงหมู่คาร์บอนิลของกรดอะมิโนเมไธโอนีน


(N)
(C)
lys
or arg
trypsin
phe
or tyr
or trp
chymotrypsin
(met)
BrCN
(cyanogen bromide)

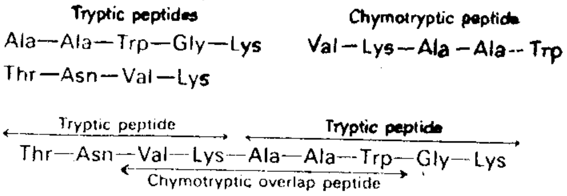
การย่อยของเอ็นไซม์ต่าง ๆ


Cyanogen bromide
Br⁻
Methyl thioçyanate
H₂O
Peptidyl homoserine lactone
Amino acyl peptide

กลไกของ CNBr ที่จำเพาะต่อเมไธโอนีน

การหาการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์หนึ่ง ๆ บางครั้งต้องใช้ทั้งเอ็นไซม์ trypsin chymotrypsin และสารCNBr เพื่อให้ได้เปปไทด์สายสั้น ๆ ซึ่งเกิดเนื่องจากการตัดพันธะเปปไทด์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ กันภายในสายเปปไทด์อันนั้น นำเปปไทด์สั้น ๆ เหล่านั้นไปหาการเรียงตัว เมื่อทราบลำดับกรดอะมิโนในเปปไทด์สายสั้นแต่ละสายแล้ว พิจารณาหาตำแหน่งที่เชื่อมระหว่าง

เปปไทด์แต่ละสายโดยดูส่วนที่ล้ำเกิน (overlapping region) **กันอยู่ เพื่อที่จะต่อเปปไทด์สายสั้น ๆ เหล่านั้นกลับไปเป็นเปปไทด์ดั้งเดิม** (original)


Tryptic peptides
Ala—Ala—Trp—Gly—Lys
Thr—Asn—Val—Lys
Chymotryptic peptide
Val—Lys—Ala—Ala—Trp
Tryptic peptide
Tryptic peptide
Thr—Asn—Val—Lys—Ala—Ala—Trp—Gly—Lys
Chymotryptic overlap peptide

ส่วนที่ล้ำเกินกันอยู่ระหว่างเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยของเอ็นไซม์ chymotrypsin **และเอ็นไซม์** trypsin

ตารางที่ 3.4 สารเคมีและเอ็นไซม์ที่ทำปฏิกริยาอย่างจำเพาะกับเปปไทด์

Reagent	*Cleavage site*
Chemical cleavage	
Cyanogen bromide	Carboxyl side of methionine residues
Hydroxylamine	Asparagine-glycine bonds
2-Nitro-5-thiocyanobenzoate	Amino side of cysteine residues
Enzymatic cleavage	
Trypsin	Carboxyl side of lysine and arginine residues
Clostripain	Carboxyl side of arginine residues
Staphylococcal protease	Carboxyl side of aspartate and glutamate residues (glutamate only under certain conditions)

ตัวอย่างการหาการเรียงตัวของกรดอะมิโนในโมเลกุลของเฮปตะเปปไทด์

กำหนดให้เฮปตะเปปไทด์ชนิดหนึ่ง ประกอบด้วย val (1), lys (1), leu (2), phe (1) และ gly (2) ถ้านำเฮปตะเปปไทด์นี้ไปทำปฏิกริยากับ 2,4-dinitrofluorobenzene (2, 4-FDNB) แล้วไฮโดรไลซ์ด้วย 6 N HCl จะได้อนุพันธ์ DNP-val กับกรดอะมิโนอื่นอีก 6 ตัว เมื่อนำเฮปตะเปปไทด์ไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอ็นไซม์ trypsin จะได้ออกมาสองส่วน คือไดเปปไทด์ที่ประกอบด้วย lys และ val กับเปนตะเปปไทด์ที่สามารถให้อนุพันธ์ DNP-gly ถ้าหากว่านำไปทำปฏิกริยากับ 2, 4-FDNB เปนตะเปปไทด์ส่วนนี้เมื่อนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอ็นไซม์ chymotrypsin จะได้ส่วนหนึ่งเป็นไดเปปไทด์ ถ้านำเอาเฮปตะเปปไทด์เริ่มต้นไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอ็นไซม์ carboxypeptidase A ปรากฏว่าได้ gly ออกมาอย่างรวดเร็ว ให้หาการเรียงตัวของเฮปตะเปปไทด์นี้

วิธีการคิด

- การที่ได้อนุพันธ์ DNP-val แสดงว่า val อยู่ที่ปลาย N

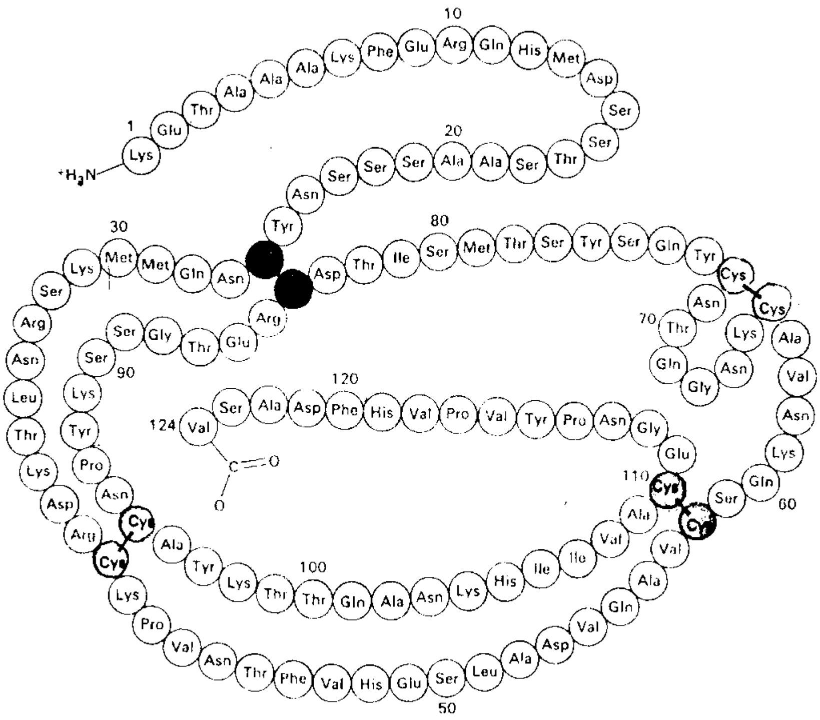
- เมื่อนำไปทำปฏิกริยากับเอ็นไซม์ trypsin จะได้ไดเปปไทด์ที่มี lys และ val แสดงว่า lys อยู่ต่อจาก val ซึ่งอยู่ที่ปลายN อีกส่วนหนึ่งเป็นเปนตะเปปไทด์ที่ให้อนุพันธ์ DNP-gly แสดงว่า

gly อยู่ที่ปลาย N ของเปนตะเปปไทด์ ถ้าไฮโดรไลซ์เปนตะเปปไทด์ต่อไปด้วยเอ็นไซม์ chymotrypsin จะได้ไดเปปไทด์ แสดงว่าปลาย C ของไดเปปไทด์หรือไตรเปปไทด์เป็น phe

- ถ้านำเฮปตะเปปไทด์เริ่มต้นไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอ็นไซม์ carboxypeptidase A จะได้ gly แสดงว่า gly อยู่ที่ปลาย C

จากข้อมูลที่ได้ นำมาเขียนเป็นแผนผังได้ดังนี้

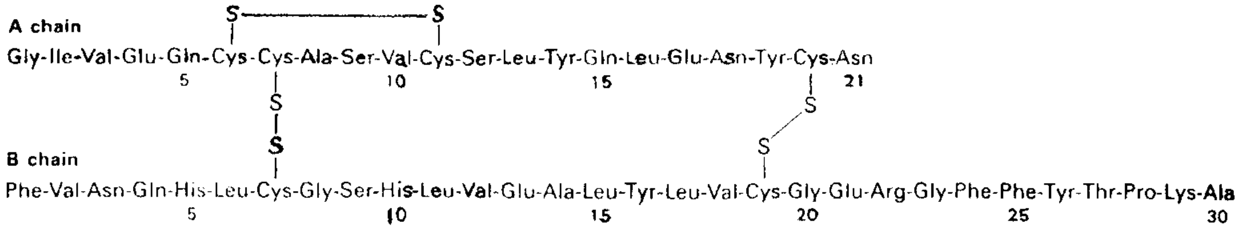
1 2 3 4 5 6 7
ปลาย N val-lys, gly — — — gly ปลาย C
phe



1
10
20
30
50
60
70
80
90
100
110
120
124
+H$_3$N
C=O
O
Lys
Glu
Thr
Ala
Ala
Ala
Lys
Phe
Glu
Arg
Gln
His
Met
Asp
Ser
Ser
Thr
Ser
Ala
Ala
Ser
Ser
Ser
Asn
Tyr
Asn
Gln
Met
Met
Lys
Ser
Arg
Asn
Leu
Thr
Lys
Asp
Arg
Cys
Lys
Pro
Val
Asn
Thr
Phe
Val
His
Glu
Ser
Leu
Ala
Asp
Val
Gln
Ala
Val
Cys
Ser
Gln
Lys
Asn
Val
Ala
Cys
Lys
Asn
Gly
Gln
Thr
Asn
Cys
Tyr
Gln
Ser
Tyr
Ser
Thr
Met
Ser
Ile
Thr
Asp
Arg
Glu
Thr
Gly
Ser
Ser
Lys
Tyr
Pro
Asn
Cys
Ala
Tyr
Lys
Thr
Thr
Gln
Ala
Asn
Lys
His
Ile
Ile
Val
Ala
Cys
Glu
Gly
Asn
Pro
Tyr
Val
Pro
Val
His
Phe
Asp
Ala
Ser
Val

รูปที่ 3.6 โครงสร้างปฐมภูมิของเอ็นไซม์ ribonuclease จากวัว

ในที่นี้ phe อาจจะอยู่ที่ตำแหน่ง 4 หรือ 5 ก็ได้ ถ้า phe อยู่ตำแหน่งที่ 4 การเรียงตัวก็เป็น val-lys-gly-phe-leu-leu-gly ถ้า phe อยู่ที่ตำแหน่งที่ 5 การเรียงตัวก็จะเป็น val-lys-gly-leu-phe-leu-gly


A chain
Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Ala-Ser-Val-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
5
10
15
21
S
S
B chain
Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala
5
10
15
20
25
30

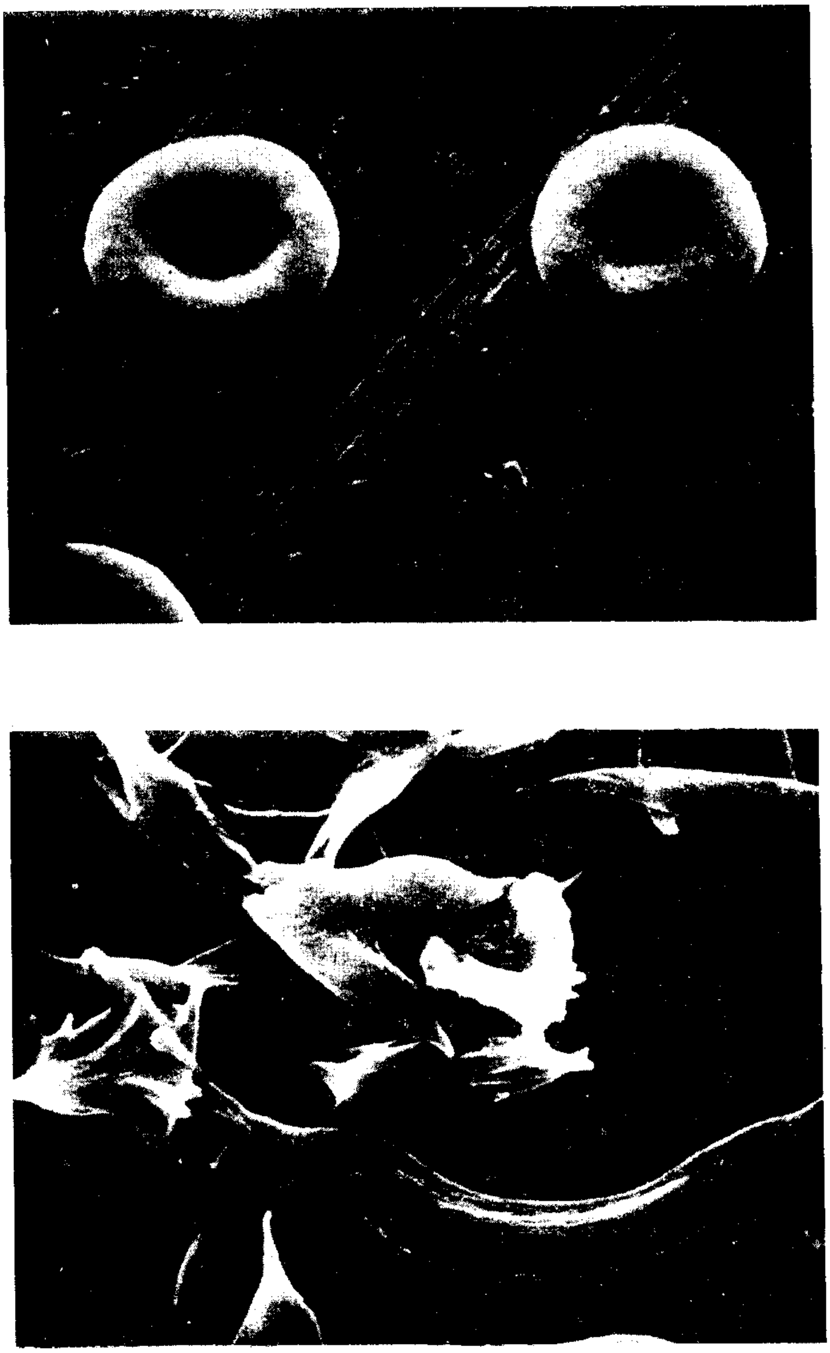
รูปที่ 3.7 โครงสร้างปฐมภูมิของฮอร์โมนอินสุลินจากวัว

นัยสำคัญทางชีววิทยาของการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Biological Significance of amino acid sequence)

การเรียงตัวของกรดอะมิโนมีความสำคัญต่อโครงสร้างและกิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ของโปรตีนเป็นอย่างมาก จะเห็นได้จากการสังเคราะห์เอ็นไซม์ ribonuclease ของนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Merrifield เขาทำการสังเคราะห์เอ็นไซม์ขึ้นมาให้การเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกับเอ็นไซม์ตัวจริง (native enzyme) ที่เกิดตามธรรมชาติทุกประการ ปรากฏว่าเอ็นไซม์สังเคราะห์นี้สามารถทำหน้าที่และมีกิจกรรมทางชีววิทยาได้ทุกอย่างเหมือนเอ็นไซม์ตัวจริง เป็นข้อสนับสนุนว่าผลิตผลที่สังเคราะห์ขึ้นมา มีองค์ประกอบและการเรียงตัวของกรดอะมิโนถูกต้อง ตลอดจนโครงสร้างสามมิติเหมือนกับเอ็นไซม์ตัวจริงทุกประการ จึงทำให้มีกิจกรรมและหน้าที่ต่าง ๆ ได้เหมือนกัน

หลักพยานอีกอย่างหนึ่งซึ่งแสดงถึงความสำคัญของการเรียงตัวของกรดอะมิโนก็คือในกรณีคนที่เป็นโรคโลหิตจาง (sickle cell anemia) โรคนี้สามารถถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ได้ เม็ดเลือดแดงมีความสามารถในการนำก๊าซออกซิเจนได้น้อยลง ทั้งนี้ก็เพราะโมเลกุลของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ผิดปรกติไป โดยปรกติแล้วโมเลกุลฮีโมโกลบินจะประกอบด้วยโปรตีนกลอบิน (globin) และสารฮีม (heme) โปรตีนกลอบินมีทั้งหมด 4 สายเป็นแบบอัลฟา (α-chain) 2 สาย แบบบีต้า (B-chain) 2 สาย

HbA ฮีโมโกลบินปรกติ ตำแหน่งที่ 6 ของสายบีต้าเป็นกรดกลูตามิค



รูปที่ 3.8 รูปเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปรกติ (บน) และเซลล์เม็ดเลือดแดงที่กลายเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยวในคนที่เป็น sickle-cell anemia (ล่าง)

HbS ฮีโมโกลบินที่เป็น sickle cell anemia ตำแหน่งที่ 6 ของสายบีต้าเป็นวาลีน

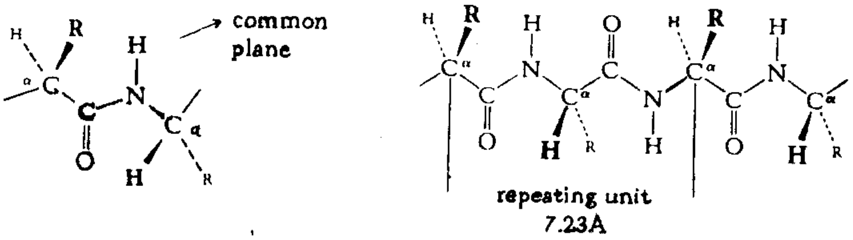
จะเห็นว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนผิดไปเพียงตำแหน่งเดียวในสายบีต้า 1 สาย ถ้าคิดทั้ง 2 สายก็ผิดไป 2 ตำแหน่ง โมเลกุลของฮีโมโกลบินก็ไม่สามารถทำงานได้เหมือนเดิม โมเลกุลฮีโมโกลบินจะเกาะยึดติดกันเป็นกลุ่มก้อนที่ใหญ่ขึ้นทำให้รูปร่างเม็ดเลือดแดงซึ่งเดิมเป็นลักษณะกลมกลายเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว การนำออกซิเจนไม่ดีเท่าเดิม เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผิดปรกตินี้จะถูกกักและอุดตันอยู่ตามหลอดเลือดแคบ ๆ ได้ง่าย ทำให้ออกซิเจนไปถึงอวัยวะเป้าหมายได้ช้าลงและลำบากขึ้น นอกจากนี้แล้วเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ผิดปรกติยังถูกทำลายได้ง่ายอีกด้วยจึงทำให้เป็นโรคโลหิตจาง

ตารางที่ 3.5 ฮีโมโกลบินที่ผิดปรกติอื่น ๆ

Hb	*Alteration (site)*
C	glu → lys (β^{6})
D	glu → gln (β^{121})
E	glu → lys (β^{26})
G	asn → lys (α^{68})
Q	asp → his (α^{75})
M	his → tyr

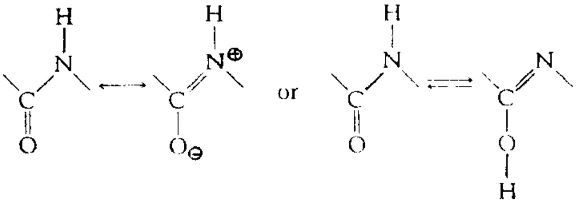
โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure)

ในปลายปี ค.ศ. 1930 Linus Pauling และ Robert Corey เป็นผู้ริเริ่มใช้เทคนิคทาง X-ray crystallography ในการศึกษาโครงสร้างกรดอะมิโนและเปปไทด์ วัตถุประสงค์ของเขาทั้งสองคือต้องการหาความยาวของพันธะ (bond distance) และมุมระหว่างพันธะ (bond angle) ของกรดอะมิโนเพื่อจะได้ข้อมูลไปใช้ในการทำนายโครงสร้างของโปรตีน สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่เขาทั้งสองค้นพบก็คือว่าบริเวณพันธะเปปไทด์นั้นแข็งแกร่งและเป็นระนาบ (rigid and planar) ไฮโดรเจนของหมู่อะมิโนจะอยู่ในลักษณะ trans กับออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล



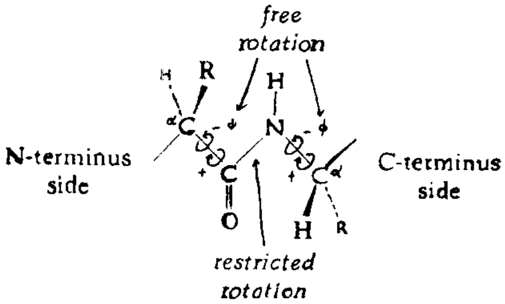
ลักษณะ planar ของบริเวณพันธะเปปไทด์

พันธะระหว่างคาร์บอนิลคาร์บอนอะตอมและไนโตรเจนอะตอมจะมีลักษณะบางส่วนเป็นพันธะคู่ ดังนั้นจึงไม่สามารถหมุนรอบแกนนี้ได้ (no freedom of rotation)



resonance　　　　tautomerism

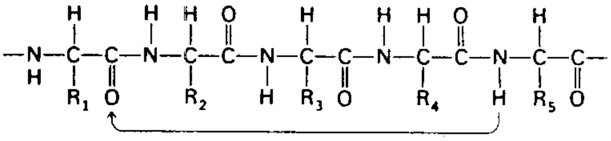
พันธะระหว่างอัลฟาคาร์บอนกับคาร์บอนิลคาร์บอนอะตอมเป็นพันธะเดี่ยวเช่นเดียวกับพันธะระหว่างอัลฟาคาร์บอนกับไนโตรเจน ดังนั้นจึงมีการหมุนรอบแกนทั้งสองนี้ได้ (free rotation) ให้สัญญลักษณ์ของมุมเป็น ψ และ φ ดังในรูป ถ้าหมุนตามเข็มนาฬิกาให้มุมมีค่าเป็น + และหมุนทวนเข็มนาฬิกาให้มุมมีค่าเป็น –



free rotation รอบพันธะเดี่ยว

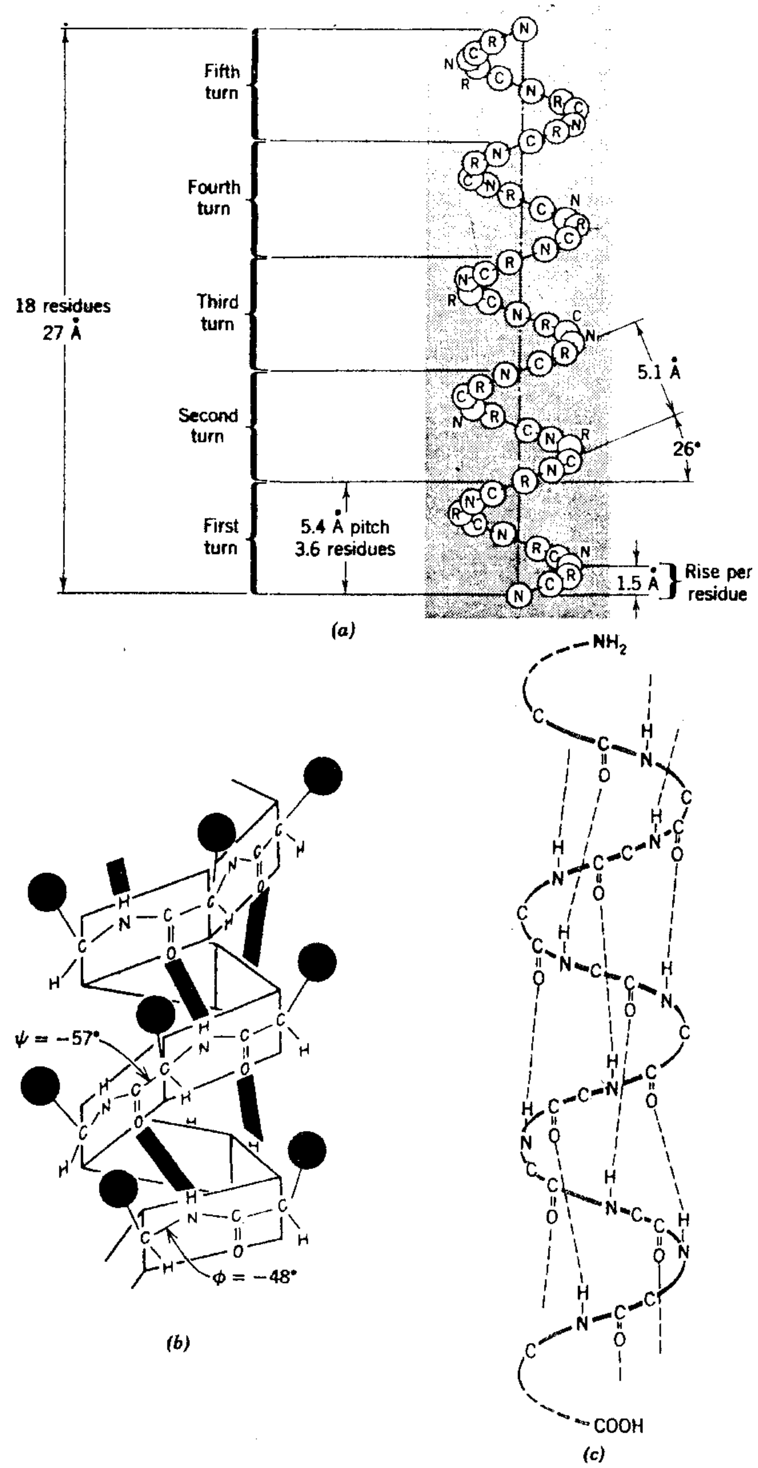
ในปี ค.ศ. 1951 Pauling และ Corey ได้เสนอแนะโครงสร้างแบบเกลียวอัลฟา (α-helix) และแผ่นพลีทบีต้า (β-pleated sheet) การใช้คำว่าอัลฟาและบีต้าในที่นี้ไม่มีความหมายอะไรพิเศษ เพียงแต่ว่ามีการอธิบายเกี่ยวกับโครงสร้างแบบเกลียวขึ้นมาก่อนก็เลยใช้สัญญลักษณ์เป็นอัลฟาส่วนโครงสร้างแบบแผ่นพลีทนั้นตามมาทีหลังจึงใช้สัญญลักษณ์ว่า บีต้า

โครงสร้างแบบเกลียวอัลฟา จะมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$ ของกรดอะมิโนตัวหนึ่งกับหมู่ $-\underset{H}{\underset{|}{N}}-$ ของกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่งที่อยู่ถัดไปอีก 4 หน่วยภายในสายเปปไทด์เดียวกัน

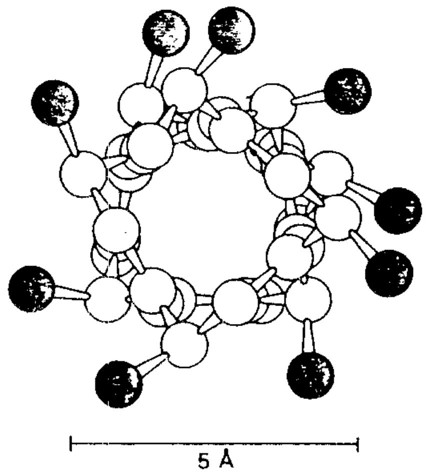


การสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ n และตำแหน่งที่ n-4

n)


Fifth turn
Fourth turn
Third turn
Second turn
First turn
18 residues
27 Å
5.4 Å pitch
3.6 residues
5.1 Å
26°
1.5 Å
Rise per residue
(a)
ψ = −57°
φ = −48°
(b)
NH₂
COOH
(c)

ข)

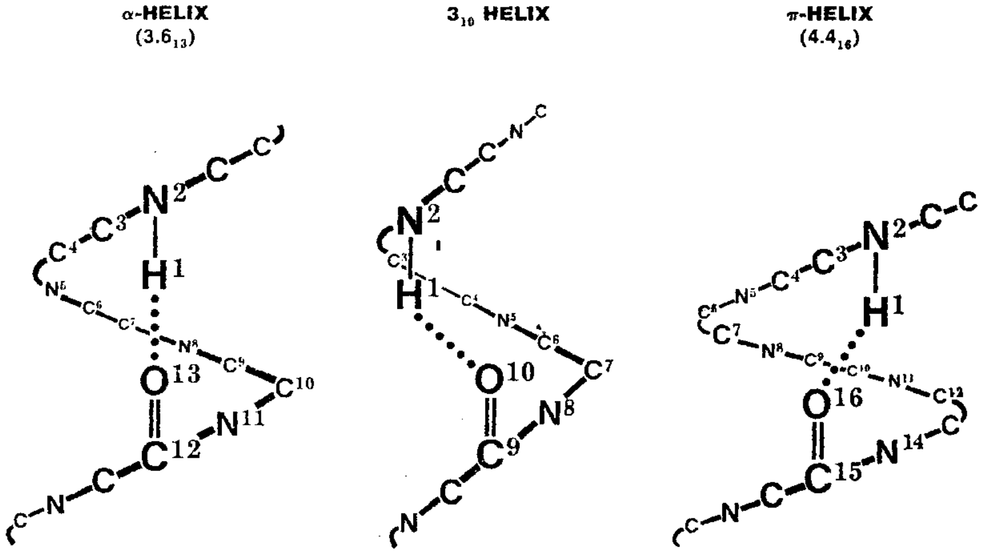


รูปที่ 3.9 ก) โครงสร้างเกลียวอัลฟา แสดงให้เห็นพันธะไฮโดรเจนภายในสายโปลีเปปไทด์ที่ช่วยค้ำจุนโครงสร้างแบบเกลียวนี้ไว้

ข) ภาพตัดขวาง (cross-section view) ของเกลียวอัลฟา วงกลมรอบนอกคือหมู่ R

เกลียวอัลฟาจะมีลักษณะเวียนขวา หมู่ R ยื่นออกไปจากแกนกลางของเกลียว เปปไทด์ที่จะอยู่ในรูปเกลียวอัลฟาได้จะต้องไม่มี stearic hindrance effect และไม่มีแรงผลักกันเนื่องจากประจุชนิดเดียวกัน ตัวอย่างเช่นที่ pH 7.0 โปลีอะลานีนจะอยู่ในรูปเกลียวอัลฟาได้ โปลีไลซีนจะเกิดการผลักกันของประจุบวกภายในโมเลกุลเปปไทด์ที่ pH 7.0 จึงอยู่ในรูปเกลียวอัลฟาไม่ได้ที่ pH 7.0 แต่ขดเป็นเกลียวได้ที่ pH ประมาณ12 ส่วนโปลีกลูตามิคอยู่ในรูปเกลียวอัลฟาไม่ได้ที่ pH 7.0 เพราะมีการผลักกันของประจุลบภายในโมเลกุลเปปไทด์ ทำให้ไม่มีเสถียรภาพแต่สามารถขดเป็นเกลียวอัลฟาได้ที่ pH ประมาณ 2.0

เกลียวอัลฟาจัดเป็นโครงสร้างแบบเกลียวที่มีเสถียรภาพมากที่สุดอาจเรียกอีกแบบว่า เกลียว 3.6_{13} (3.6_{13} helix) หมายความว่าเกลียวของโปลีเปปไทด์นั้นมีกรดอะมิโน 3.6 หน่วยต่อขดเกลียว 1 รอบ และหลังจากมีการสร้างพันธะไฮโดรเจนขึ้นมาแล้วจะเกิดเป็นวงแหวนซึ่งมีจำนวนอะตอมภายในวงแหวนเท่ากับ 13 อะตอม



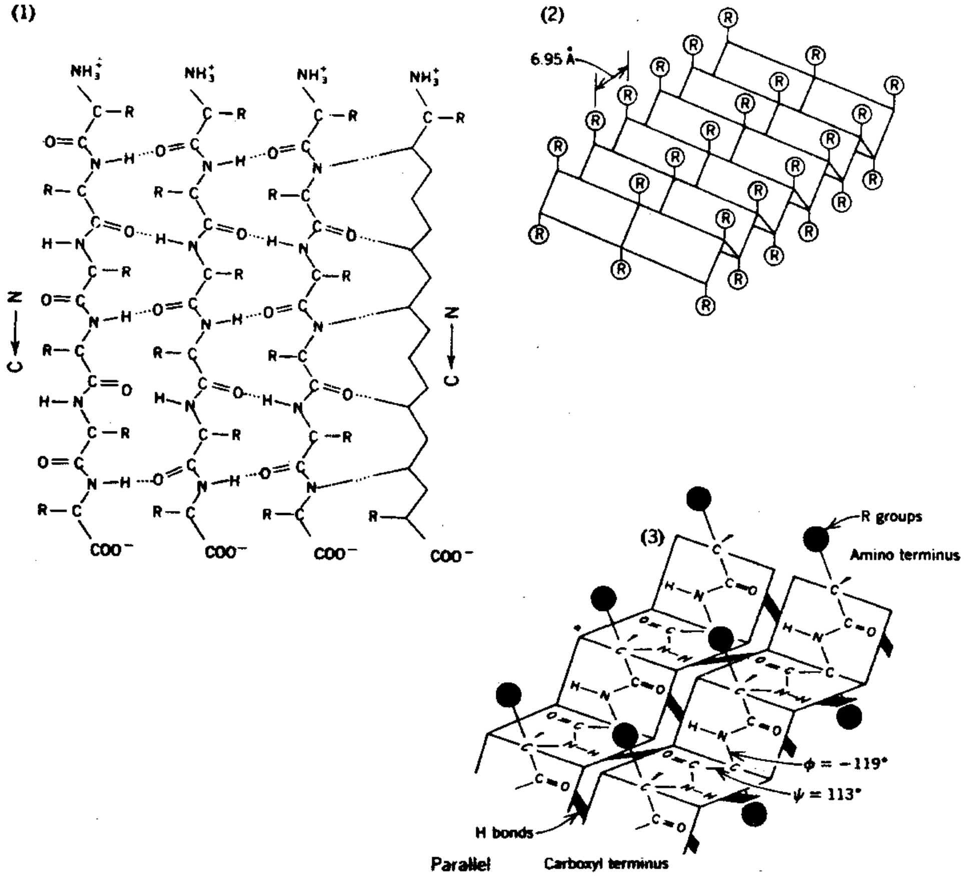
นอกจากเกลียว 3.6_{13} แล้วยังมีเกลียว 3_{10} และเกลียว 4.4_{16} แต่สองแบบหลังนี้ไม่ค่อยเสถียร เนื่องจากว่าเกลียว 3_{10} นั้นมีจำนวนกรดอะมิโน 3 หน่วยต่อรอบ หลังจากสร้างพันธะไฮโดรเจนขึ้นมาแล้วจะเกิดวงแหวนซึ่งมีจำนวนอะตอมที่เป็นสมาชิกเพียง 10 อะตอม เป็นเกลียวที่แน่นเกินไป ส่วนเกลียว 4.4_{16} (เกลียว π) นั้นมีกรดอะมิโน 4.4 หน่วยต่อรอบและหลังจากสร้างพันธะไฮโดรเจนแล้วเกิดวงแหวนที่มีจำนวนอะตอมภายในถึง 16 อะตอมซึ่งก็เป็นเกลียวที่หลวมเกินไป

โครงสร้างแบบแผ่นพลีทบีต้า มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างเปปไทด์แต่ละสาย มองจากด้านข้างจะเห็นเป็นรูปแบบซิกแซก (Zig-Zag) แผ่นพลีทนี้อาจเป็นแบบขนาน (parallel หรือ β_p) หรือไม่ขนาน (anti-parallel, β) ก็ได้ (ดูรูปที่ 3.10 หน้า 99)

โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure)

ก่อนปี ค.ศ. 1957 ยังไม่มีผู้ใดรายงานเกี่ยวกับโครงสร้างสามมิติที่สมบูรณ์แบบของโปรตีน ต่อมาระหว่างปี ค.ศ. 1961-1963 Kendrew ได้เสนอแนะโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่นำออกซิเจนในเส้นใยกล้ามเนื้อคือไมโอโกลบิน (myoglobin) ส่วน Perutz ได้เสนอโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่นำออกซิเจนในเลือดคือ ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ผลงานนี้ทำให้ทั้งสองได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมีในปี ค.ศ. 1962

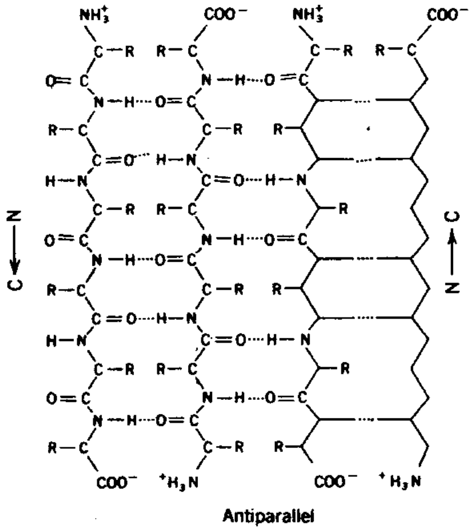
ก)

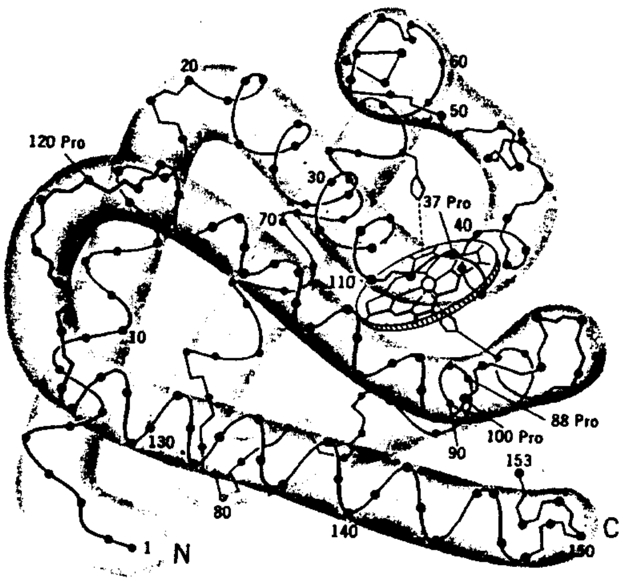

(1)
(2)
6.95 Å
(3)
R groups
Amino terminus
φ = −119°
ψ = 113°
H bonds
Parallel
Carboxyl terminus
N → C

รูปที่ 3.10 ก) แผ่นพลีทบีต้าแบบขนาน, β_p

ข) แผ่นพลีทบีต้าแบบไม่ขนาน, β

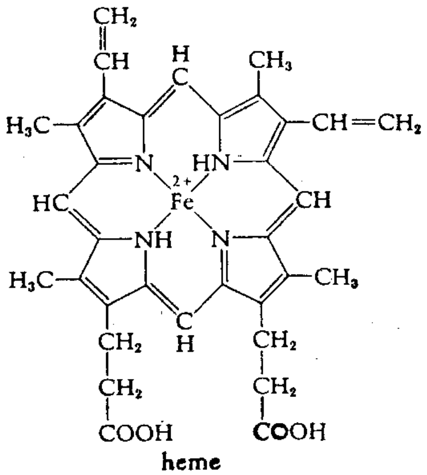
ข)


N → C
C → N
Antiparallel

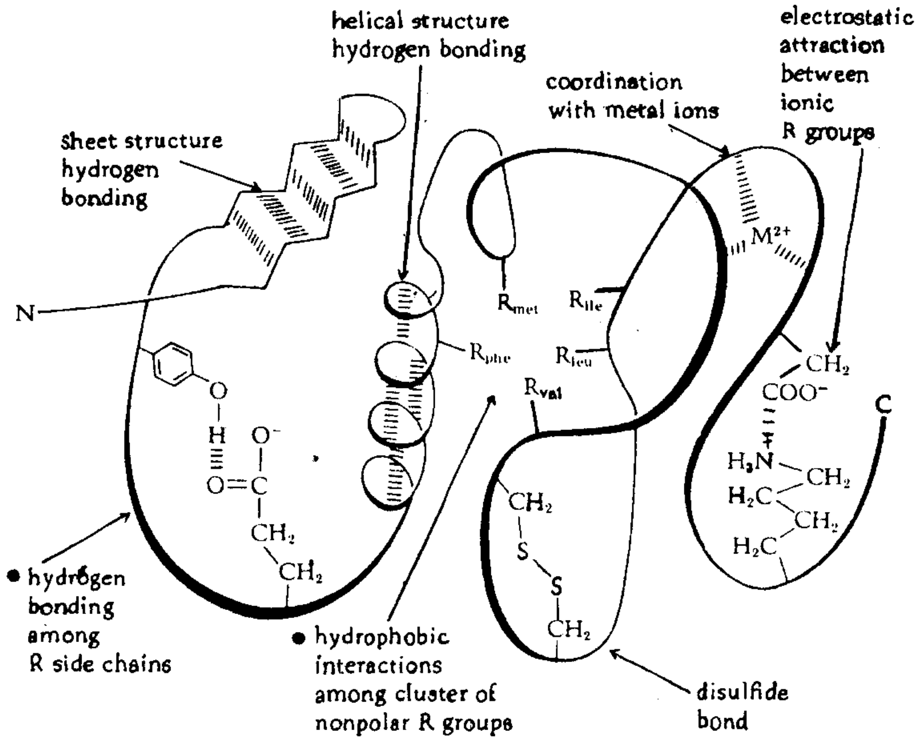

20
60
50
120 Pro
30
37 Pro
40
70
110
10
88 Pro
100 Pro
90
153
130
80
140
C
150
1
N

รูปที่ 3.11 โครงสร้างสามมิติของโมเลกุลไมโอโกลบิน แผ่นกลมที่เห็นอยู่ในโครงสร้างคือหมู่ฮีม และสังเกตด้วยว่ากรดอะมิโนโพรลีนมักจะอยู่ตามส่วนโค้งของสายเปปไทด์

ไมโอโกลบินเป็นโปลีเปปไทด์สายเดียว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 153 หน่วยมีหมู่พรอสเธติคคือฮีม อะตอมของธาตุเหล็กตรงกลางมีสถานะเป็น Fe^{+2} โครงสร้างส่วนใหญ่ของไมโอโกลบินเป็นเกลียวอัลฟา (75-77%) แทบจะไม่มีแผ่นพลีทบีต้าอยู่เลย โครงสร้างกระชับและ อัดแน่น ส่วนไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) อยู่ภายในโมเลกุล ส่วนไฮโดรฟิลลิค (hydrophilic) หันสู่ภายนอก


CH₂
CH
H
C
CH₃
H₃C
CH=CH₂
N
HN
2+
Fe
HC
CH
NH
N
H₃C
CH₃
C
H
CH₂
CH₂
CH₂
CH₂
COOH
COOH

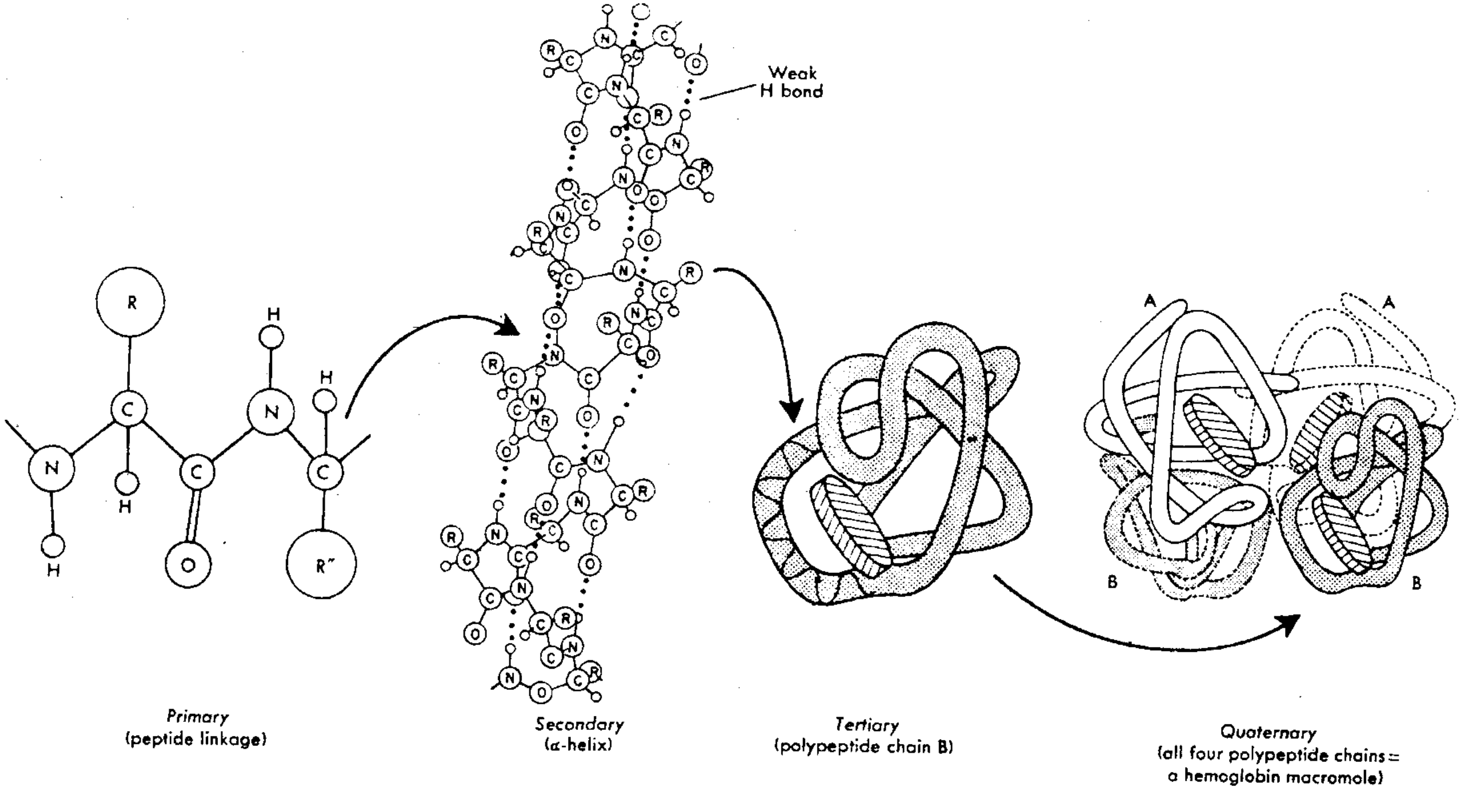
heme


helical structure hydrogen bonding
electrostatic attraction between ionic R groups
coordination with metal ions
sheet structure hydrogen bonding
N
M²⁺
R_met
R_Ile
R_phe
R_leu
R_val
O
H
O⁻
O=C
CH₂
CH₂
CH₂
COO⁻
H₃N
CH₂
H₂C
CH₂
H₂C
C
CH₂
S
S
CH₂
hydrogen bonding among R side chains
hydrophobic interactions among cluster of nonpolar R groups
disulfide bond

รูปที่ 3.12 แรงต่าง ๆ ที่ช่วยค้ำจุนโครงสร้างทุติยภูมิและโครงสร้างตติยภูมิ โปรตีนแต่ละชนิดไม่จำเป็นจะต้องมีครบทุกแรงดังข้างบนนี้ แรงที่มีความสำคัญช่วยเป็นแกนกลางของโมเลกุลคือแรงประเภทไฮโดรโฟบิค

โครงสร้างจตุรภูมิ (Quarternary structure)

ฮีโมโกลบินเป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นโครงสร้างจตุรภูมิเป็นอย่างดี (ดูรูปที่ 3.13) ฮีโมโกลบินประกอบด้วยสายเปปไทด์อัลฟา 2 สาย และสายเปปไทด์บีต้า 2 สาย เขียนเป็นสัญญลักษณ์ได้ว่า $\alpha_2\beta_2$ บางครั้งอาจเรียกหน่วยย่อยอัลฟา,หน่วยย่อยบีต้า (α subunit, β subunit) แต่ละหน่วยย่อยมีฮีมเป็นหมู่พรอสเธติค แต่ละหน่วยย่อยของฮีโมโกลบินคล้ายคลึงกับโมเลกุลของไมโอโกลบินซึ่งเป็นเปปไทด์สายเดี่ยวมาก หน่วยย่อยของฮีโมโกลบินจะมาอยู่รวมกันได้แต่เปปไทด์สายเดี่ยวไมโอโกลบินจะมาอยู่รวมกันไม่ได้เพราะกรดอะมิโนตรงพื้นผิวที่จะสัมผัสแตกต่างกัน แรงที่ช่วยยึดและค้ำจุนโครงสร้างจตุรภูมินี้เป็นแรงประเภทเดียวกันกับแรงที่ค้ำจุนโครงสร้างทุติยภูมิและโครงสร้างตติยภูมิ ตรงพื้นผิวสัมผัสระหว่างหน่วยย่อยจะอาศัยแรงประเภทพันธะไฮโดรเจน, แรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals attraction) และแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงข้าม โครงสร้างจตุรภูมิของฮีโมโกลบินนี้จะเปลี่ยนไปถ้ามีการรวมตัวกับออกซิเจนเกิดขึ้น หรือถ้า

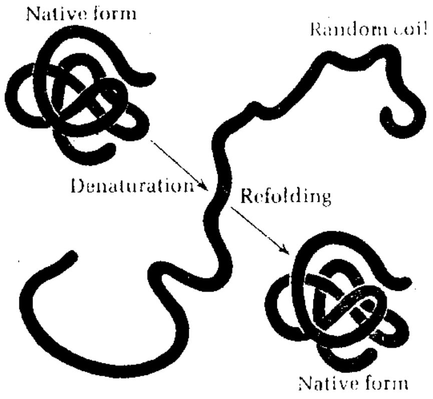

R
H
C
N
C
H
N
C
H
O
R″
H
Weak
H bond
A
A
B
B
Primary
(peptide linkage)
Secondary
(α-helix)
Tertiary
(polypeptide chain B)
Quaternary
(all four polypeptide chains =
a hemoglobin macromole)

รูปที่ 3.13 โครงสร้างระดับต่าง ๆ ของโมเลกุลฮีโมโกลบิน

นำไปเติมกรดหรือด่าง หน่วยย่อยทั้ง 4 หน่วยของฮีโมโกลบินซึ่งเคยรวมตัวอยู่ด้วยกันเป็นเตตราเมอร์ (tetramer) จะแตกตัวออกเป็นไดเมอร์ (dimer) คือ $2(\alpha\beta)$ และเป็นโมโนเมอร์ (monomer) คือ 2α และ 2β ตามลำดับ ถ้าเราแยกกรดหรือด่างออกไปเสีย โมโนเมอร์เหล่านั้นจะค่อย ๆ รวมตัวกันกลับเข้าไปเป็นเตตราเมอร์ได้ใหม่

การทำลายสภาพธรรมชาติ (Denaturation)

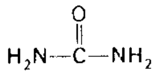
การทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนหมายถึงการที่โครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างตติยภูมิ และโครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีนถูกทำลายไปโดยพวกสารเคมีหรือสภาวะบางอย่าง ทำให้โปลีเปปไดท์ซึ่งเคยมีการคดงอที่จำเพาะ (specific folding) นั้นคลายตัวเป็นเส้นที่ไม่มีระเบียบแบบแผน (random coil) ในสภาวะที่ไม่รุนแรงนักพันธะเปปไทด์ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนท์จะไม่ถูกทำลายแสดงว่าโครงสร้างปฐมภูมิยังคงมีอยู่ โปรตีนที่เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาตินี้มีคุณสมบัติบางอย่างเปลี่ยนแปลงไปอย่างเห็นได้ชัดก็คือไม่สามารถจะแสดงกิจกรรมทางชีววิทยาได้ คุณสมบัติการละลายน้ำลดต่ำลงจนบางครั้งถึงกับตกตะกอนลงมา อย่างไรก็ตามโปลีเปปไทด์ที่เกิดการคลายตัวออกมานี้จะสามารถกลับไปมีโครงสร้างแบบเดิมได้ (renaturation) ถ้าเราแยกสารเคมีนั้นออกไปหรือขจัดสภาวะต้นเหตุนั้นเสีย ถ้าเป็นเอ็นไซม์ก็สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาได้เหมือนเดิม



รูปที่ 3.14 การสูญเสียสภาพธรรมชาติและการกลับเข้าสู่สภาพธรรมชาติอีกครั้งหนึ่ง

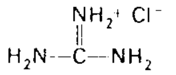
สารเคมีหรือสภาวะที่สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน

1. ความร้อน, ความดัน การทำให้แข็ง (freezing)
2. สารเคมีบางชนิด เช่น urea, quanidine hydrochloride



$$H_2N-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-NH_2$$

Urea

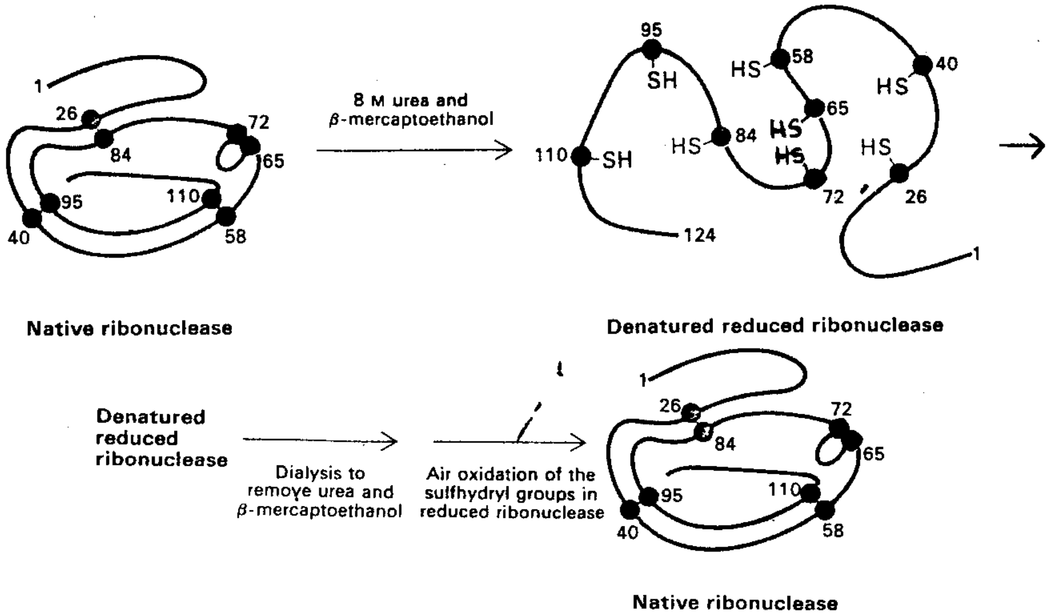


$$H_2N-\overset{\overset{\displaystyle NH_2^+\ Cl^-}{\|}}{C}-NH_2$$

Guanidine hydrochloride

3. รังสีอุลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์
4. สารอินทรีย์บางประเภท เช่น เอธานอล เมธานอล และอะซีโตน
5. กรดแก่และด่างแก่
6. ดีเทอร์เจนต์ เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS)
7. เกลือของโลหะหนักบางชนิด เช่น mercuric chloride, lead acetate และ silver nitrate เป็นต้น
8. อัลคาลอยด์รีเอเจนต์ เป็นสารที่ใช้ตกตะกอนพวกอัลคาลอยด์ ได้แก่ tannic acid picric acid, phosphomolybdic acid เป็นต้น
9. เอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีน (โปรตีนจะเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติก่อนที่จะถูกย่อย)

ตัวอย่างที่แสดงให้เห็นการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไปแล้วแต่สามารถกลับคงสู่สภาพเดิมได้ก็คือ ผลงานของ Christian Anfinsen เกี่ยวกับเอ็นไซม์ ribonuclease เขาใช้สาร 8 M urea ทำให้เอ็นไซม์นี้คลายตัวบางส่วนและใช้สาร β-mercaptoethanol ไปรีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ ทำให้เอ็นไซม์ ribonuclease สูญเสียสภาพธรรมชาติ แต่เมื่อนำไปทำ dialysis เพื่อขจัด urea และ β-mercaptoethanol ออกไป แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ถูกออกซิไดซ์โดยออกซิเจนในอากาศ จะปรากฏว่าเอ็นไซม์นี้จะค่อย ๆ คดงอตัวกลับไปมีโครงสร้างแบบเดิมได้และสามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ RNA ได้เหมือนเดิม

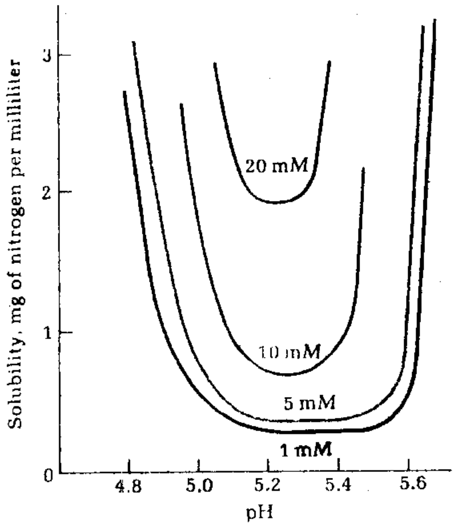

1
26
84
72
65
95
110
40
58
Native ribonuclease
8 M urea and
β-mercaptoethanol
95
SH
HS
58
40
HS
65
110
SH
HS
84
HS
HS
HS
72
26
124
1
Denatured reduced ribonuclease
Denatured
reduced
ribonuclease
Dialysis to
remove urea and
β-mercaptoethanol
Air oxidation of the
sulfhydryl groups in
reduced ribonuclease
1
26
72
84
65
95
110
40
58
Native ribonuclease

รูปที่ 3.15 การทำให้เอ็นไซม์ ribonuclease สูญเสียสภาพธรรมชาติและกลับเข้าสู่สภาพธรรมชาติแบบเดิมใหม่อีกครั้งหนึ่ง

คุณสมบัติในการละลายน้ำของโปรตีน

สารละลายโปรตีนจะมีการละลายเปลี่ยนแปลงไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ

1. pH
2. Ionic strength
3. Dielectric constant ของตัวทำละลาย
4. อุณหภูมิ



รูปที่ 3.16 ผลของ pH และเกลือ NaCl ที่มีต่อการละลายของ β -lactoglobulin ที่ 25°ซ

1. **pH** จากรูปจะเห็นว่าการละลายของโปรตีนในน้ำนม, β-lactoglobulin อยู่ในช่วงต่ำสุดประมาณที่ pH 5.2-5.3 ไม่ว่าความเข้มข้นของเกลือ NaCl จะเป็นเท่าใดก็ตาม ถ้า pH สูงหรือต่ำกว่าค่านี้การละลายจะดีขึ้นเนื่องจากมีการผลักกันของประจุชนิดเดียวกันทำให้กราฟมีลักษณะเป็นรูปตัว U โปรตีนทั่ว ๆ ไปก็จะให้กราฟเป็นรูปตัว U เหมือนกันเพียงแต่ว่าค่าการละลายต่ำสุดแตกต่างกันออกไป pH ตรงที่มีการละลายของโปรตีนต่ำสุดเรียกว่า isoelectric pH หรือ isoelectric point pI (ดูหน้า 70) โปรตีนแต่ละชนิดมีค่า pI แตกต่างกันออกไปทั้งนี้ก็เพราะองค์ประกอบของกรดอะมิโนไม่เหมือนกัน ดังนั้นหมู่ R ที่แตกตัวได้ก็จะไม่เหมือนกัน ทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างที่ต้องการมาทำให้โปรตีนนั้นมีประจุสุทธิเป็นศูนย์จึงไม่เท่ากันด้วย (ดูตารางที่ 3.6)

เราสามารถแยกโปรตีนหลายชนิดออกจากกันโดยใช้หลักการ isoelectric precipitation เมื่อปรับ pH ให้เป็นค่า pI ของโปรตีนชนิดใดโปรตีนชนิดนั้นก็จะตกตะกอนลงมา โปรตีนอื่นก็คงจะอยู่ในสภาพสารละลายโปรตีนต่อไป โปรตีนที่ตกตะกอนลงมานั้นยังคงมีรูปแบบโครงสร้างเหมือนเดิม ไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ

2. **Ionic strength** ของสารละลาย คิดคำนวณได้จาก $\mu = \frac{1}{2}\Sigma c_i z_i^2$ เมื่อ C เป็นความเข้มข้นเป็นโมลาร์และ Z เป็นประจุของไอออน

$$0.1\ M\ NaCl \longrightarrow Na^{+} + Cl^{-}$$

$$\mu = \frac{1}{2}\left[0.1(+1)^2 + 0.1(-1)^2\right] = 0.1$$

ค่า ionic strength ของ 0.1 M NaCl = 0.1

$$0.1\ M\ MgSO_4 \longrightarrow Mg^{+2} + SO_4^{=}$$

$$\mu = \frac{1}{2}\left[0.1(+2)^2 + 0.1(-2)^2\right] = 0.4$$

ค่า ionic strength ของ 0.1 M $MgSO_4$ = 0.4

$$0.1\ M\ (NH_4)_2SO_4 \longrightarrow 2\,NH_4^{+} + SO_4^{=}$$

$$\mu = \frac{1}{2}\left[0.2(+1)^2 + 0.1(-2)^2\right] = 0.3$$

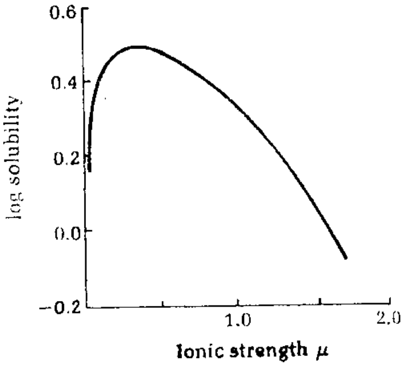
ค่า ionic strength ของ 0.1 M $(NH_4)_2SO_4$ = 0.3

เกลือที่มีฤทธิ์เป็นกลาง (neutral salts) เช่น NaCl, KCl, $MgSO_4$, K_2SO_4, Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$ จะมีผลต่อการละลายของโปรตีน โดยที่เกลือเหล่านี้จะไปเปลี่ยนแปลงค่า ionic strength ของสารละลาย

ถ้าพิจารณาจากกราฟ (ดูรูป 3.17) จะเห็นว่าเมื่อ ionic strength มีค่าต่ำ โปรตีนจะมีการละลายเพิ่มขึ้น เรียกว่า salting-in เกลือที่เป็นไดวาเลนท์ (divalent) เช่น $MgCl_2$ และ $(NH_4)_2SO_4$ จะมีผลทำให้เกิด salting-in ได้ดีกว่าเกลือพวกโมโนวาเลนท์ (monovalent) เช่น NaCl , NH_4Cl, KCl เมื่อเพิ่มค่า ionic strength ขึ้นไปเรื่อย การละลายของโปรตีนกลับลดลง

ตารางที่ 3.6 Isoelectric point **ของ โปรตีนบางชนิด**

	Isoelectric pH
Pepsin	~ 1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β-Lactoglobulin	5.2
γ_1-Globulin	6.6
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Ribonuclease	9.6
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome c	10.6
Lysozyme	11.0



รูปที่ 3.17 ผลของ K_2SO_4 ต่อการละลายของ CO-hemoglobin ที่ isoelectric PH

ถ้าค่า ionic strength สูงพออาจทำให้โปรตีนตกตะกอนออกมาเกือบหมด แบบนี้เรียกว่า salting-out โปรตีนที่ตกตะกอนมานี้ยังคงมีโครงสร้างแบบดั้งเดิมอยู่ไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ นิยมใช้เกลือ $(NH_4)_2SO_4$ กันมากเนื่องจากว่าละลายน้ำง่ายและให้ค่า ionic strength ที่สูง เกลือแต่ละชนิดมีผลต่อโปรตีนไม่เหมือนกัน

3. Dielectric constant ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอธานอล เมธานอล อะซีโตน จะลดความสามารถในการละลายของโปรตีนลงและบางครั้งตกตะกอนโปรตีนได้เนื่องจากสารอินทรีย์เหล่านี้มีค่า dielectric constant ต่ำกว่าน้ำ จากการศึกษาพบว่าการละลายของโปรตีนที่ pH และ ionic strength ที่คงที่จะขึ้นอยู่กับค่า dielectric constant ของตัวกลางที่โปรตีนละลายอยู่ ความสัมพันธ์อันนี้จะพิจารณาได้จากสูตร

$$F = \frac{e_1 e_2}{Dr^2}$$

เมื่อ F เป็นแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงข้ามของโมเลกุลโปรตีน

e_1, e_2 เป็นประจุของไอออน

r เป็นระยะทางระหว่างไอออน

D เป็น dielectric constant ของตัวกลางที่โปรตีนละลายอยู่

ตารางที่ 3.7 ค่า dielectric constant, D ของตัวทำละลายบางชนิดที่ 20°ซ

Liquid	*D*
Water	80
Methanol	33
Ethanol	24
Acetone	21.4
Benzene	2.3
Hexane	1.9

ในกรณีที่ e_1, e_2 และ r คงที่ มีค่า D เป็นตัวแปรเพียงตัวเดียว แรงดึงดูด F จะขึ้นกับค่า D จากตารางที่ 3.7 จะเห็นว่าค่า D น้ำ สูงกว่า D เฮกเซน ประมาณเกือบ 40 เท่า ดังนั้นแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงข้ามของโมเลกุลโปรตีนในเฮกเซนจะมากกว่าแรงดึงดูดของโปรตีนเมื่ออยู่ในน้ำถึง 40 เท่า โมเลกุลโปรตีนในเฮกเซนจึงมีแรงเกาะยึดแน่นหนาเป็นโมเลกุลใหญ่และมีน้ำหนักมาก ทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมา แต่ถ้าโมเลกุลโปรตีนอยู่ในน้ำจะมีแรงดึงดูดภายในโมเลกุลน้อย ในขณะเดียวกันจะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลน้ำและโมเลกุลโปรตีนด้วย จึงทำให้โปรตีนสามารถละลายอยู่ในน้ำได้ โปรตีนที่ตกตะกอนลงมาโดยอาศัยสารอินทรีย์เหล่านี้อาจสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ ดังนั้นควรจะกระทำที่อุณหภูมิต่ำ

4. **อุณหภูมิ** โปรตีนส่วนใหญ่จะมีการละลายเพิ่มขึ้นถ้าเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นแต่มีขีดจำกัดว่าไม่เกิน 40°ซ ถ้าเกินช่วง 40-50°ซ ไปแล้วโมเลกุลโปรตีนจะไม่ค่อยเสถียรและเริ่มจะสูญเสียสภาพธรรมชาติ คุณสมบัติในการละลายลดต่ำลง โดยมากแล้วโปรตีนจะรักษาเสถียรภาพไว้ได้ในช่วงอุณหภูมิต่ำ แต่ก็มีข้อยกเว้นสำหรับโปรตีนบางชนิดจะรักษาเสถียรภาพไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง

การทดลองเกี่ยวกับกรดอะมิโน

การทดลองที่ 3.1 Ninhydrin Test

หลักการ นินไฮดรินเป็นสารออกซิไดซึ่งจะทำปฏิกริยากับกรดอะมิโนให้สารสีน้ำเงินม่วง (ดูหน้า 73) การตรวจสอบนี้มิได้จำเพาะต่อกรดอะมิโนเท่านั้น โปรตีนหรือสารอื่นที่มีหมู่อะมิโนอิสระก็จะให้ผลบวกเหมือนกัน เช่น primary amine เกิดปฏิกริยานี้ได้แต่ไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนกรดอิมิโน (imino acid) โพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxy proline) นั้นให้สารสีเหลือง

ปฏิกริยานี้ไวมาก ใช้สำหรับตรวจหากรดอะมิโนบนแผ่นโครมาโตแกรมได้

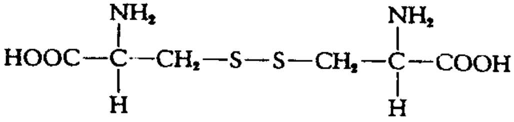
สารเคมี กรดอะมิโนไกลซีน ไทโรซีน เฟนิลอะลานีน และโพรลีน
สารละลายนินไฮดริน 0.2% ในเอธานอล เตรียมใช้ใหม่ ๆ
อ่างน้ำเดือด
*acetate buffer 0.1 M pH 5.0

วิธีการ ละลายกรดอะมิโนแต่ละชนิดประมาณ 0.1 กรัมในหลอดทดลองแต่ละหลอดด้วย acetate buffer 0.1 M pH 5.0 ปริมาตร 2 มล. แล้วเติม 0.2% นินไฮดริน 1 มล. นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 3.2 Sulphur Test

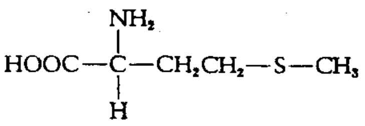
หลักการ ในโปรตีนที่ได้จากพืชและสัตว์ จะพบว่ามีกรดอะมิโนเพียงสองตัวเท่านั้นคือซีสตีนและเมไธโอนีน ที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ซัลเฟอร์ในโมเลกุลเมไธโอนีนถูกทำลายได้ยากในสารละลายด่าง แต่ซัลเฟอร์ในโมเลกุลของซีสตีนถูกทำลายได้ง่ายในสารละลายด่างให้ sodium sulphide (Na_2S) และสามารถตกตะกอนลงมาเป็น lead sulphide เมื่อเติม lead acetate
ตะกอนสีดำของ lead sulphide จะทำปฏิกริยากรด HCl ต่อไปให้ก๊าซ H_2S ที่มีกลิ่นเหม็นเฉพาะตัว

cystine (cys/2)



$$HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2-S-S-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH$$

methionine (met)



$$HOOC-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-CH_2CH_2-S-CH_3$$

ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้

$$Na_2S + Pb\,(C_2H_3O_2)_2 \longrightarrow PbS + 2\,NaC_2H_3O_2$$

$$PbS + 2\,HCl \longrightarrow PbCl_2 + H_2S$$

สารเคมี กรดอะมิโน ซีสตีน เมไธโอนีน

10% NaOH

0.2 M lead acetate

กรด HCl เข้มข้น

อ่างน้ำเดือด

วิธีการ เตรียมกรดอะมิโนซีสตีน และเมไธโอนีนไว้ในหลอดทดลองแต่ละหลอดในปริมาณเล็กน้อย เติม 10% NaOH ลงไป 5 มล. นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือด 15 นาที หยด 0.2 M lead acetate ลงไปประมาณ 10 หยด สังเกตตะกอนดำที่ได้ และให้บอกด้วยว่าเป็นตะกอนของอะไร จากนั้นค่อย ๆ เติมกรด HCl เข้มข้นลงไป 2 มล. จะได้กลิ่นเหม็นของก๊าซ H_2S ที่เกิดขึ้น

โปรตีนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบก็จะให้ผลบวกเช่นเดียวกันนี้

การทดลองที่ 3.3 Xanthoproteic Test

หลักการ การตรวจสอบนี้จำเพาะต่อกรดอะมิโนประเภท aromatic เพราะกรดอะมิโนประเภทนี้เมื่อทำปฏิกริยากับกรด HNO_3 เข้มข้น จะเกิด nitration ที่วงเบนซีนให้สารละลายสีเหลืองใส กรดอะมิโนดังกล่าวได้แก่ไทโรซีน ทริปโตแฟน ส่วนเฟนิลอะลานีนนั้นมีข้อยกเว้นว่าให้ผลบวกเป็นสีเหลืองใสที่จางมากจนยากแก่การสังเกต โปรตีนที่มีไทโรซีนและทริปโตแฟนเป็นองค์ประกอบก็จะให้ผลบวกเช่นกัน

หลังจากได้สารละลายสีเหลืองใสในกรดเข้มข้นแล้วทำให้เย็น เติม NaOH หรือ NH_4OH จนกระทั่งสารละลายเป็นด่างมากพอ จะได้อนุพันธ์เป็นเกลือสีส้มสด

สารเคมี สารละลาย 0.1% ของกรดอะมิโนไกลซีน ไทโรซีน ทริปโตแฟน และเฟนิลอะลานีน

กรด HNO_3 เข้มข้น

10 M NaOH หรือ 10 M NH_4OH

อ่างน้ำเดือด

วิธีการ เตรียมสารละลายของกรดอะมิโนแต่ละชนิดไว้ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มล. เติมกรด HNO_3 เข้มข้นทุกหลอด ๆ ละ 1 มล. เช่นกัน นำไปแช่อ่างน้ำเดือดจนกระทั่งสารละลายในหลอดทดลองเดือด สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง ทำให้เย็นแล้วเติม NaOH หรือ NH_4OH ให้มากพอจะเกิดอนุพันธ์เป็นเกลือสีส้มในสารละลายของด่าง

การทดลองที่ 3.4 Millon's Test

หลักการ สารประเภท monohydroxybenzene เช่น ฟีนอล จะทำปฏิกริยากับ millon's reagent ได้สีแดงอิฐซึ่งคาดกันว่าเป็นสีของสารประกอบเชิงซ้อนของปรอท (mercury complex) ในบรรดา

กรดอะมิโนทั้งหลายมีไทโรซีนเท่านั้นที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ฉะนั้นการตรวจสอบนี้จึงจำเพาะต่อกรดอะมิโนไทโรซีนและโปรตีนที่มีไทโรซีนเป็นส่วนประกอบ ผลการทดลองนี้อาจเกิดขึ้นช้าและเห็นไม่ชัดเจนถ้าหากว่ามีคลอไรด์ไอออนหรือแอมโมเนียมไอออนปะปนอยู่ในสารละลายที่ตรวจสอบ

สารเคมี สารละลาย 0.1% ของกรดอะมิโนไกลซีน ไทโรซีน และเฟนิลอะลานีน

sodium nitrite 10 กรัม/ลิตร

Millon's reagent

สารละลายฟีนอล 0.1%

อ่างน้ำเดือด

วิธีการ เติม Millon's reagent 5-6 หยดลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดที่มีสารละลายกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ หรือสารละลายฟีนอลอยู่แล้วอย่างละ 1 มล. นำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมสารละลาย sodium nitrite ลงไป 5 หยด บันทึกการเปลี่ยนแปลง

การทดลองที่ 3.5 ปฏิกริยา glyoxylic ของกรดอะมิโนทริปโตแฟน

หลักการ หมู่อินดอล (indole) ของกรดอะมิโนทริปโตแฟนจะเกิดปฏิกริยากับกรด glyoxylic ในกรด H_2SO_4 เข้มข้น ให้ผลบวกเป็นวงแหวนสีม่วงตรงรอยต่อระหว่างชั้นทั้งสองของสารละลาย กรด glyoxylic เตรียมได้จากการนำเอากรด glacial acetic ไปวางตั้งไว้ให้ถูกแสง โปรตีนที่ประกอบด้วยทริปโตแฟนก็จะให้ผลเหมือนกัน

สารเคมี สารละลาย 0.1% ของกรดอะมิโนไกลซีน ไทโรซีน และทริปโตแฟน

กรด glacial acetic ที่วางไว้ให้ถูกแสง

กรด H_2SO_4 เข้มข้น

วิธีการ เตรียมสารละลายกรดอะมิโนที่จะตรวจสอบไว้ในหลอดทดลองหลอดละ 2 มล. เติมกรด glacial acetic 2 มล. เอียงหลอดทดลองแล้วค่อย ๆ รินกรด H_2SO_4 เข้มข้นประมาณ 2 มล. ลงไปข้าง ๆ หลอดด้วยความระมัดระวัง จะสังเกตเห็นว่าสารละลายแบ่งออกเป็นสองชั้นตรงรอยต่อระหว่างชั้นทั้งสองนั้นมีวงแหวนสีม่วงเกิดขึ้น

การทดลองที่ 3.6 Nitroprusside Test

หลักการ หมู่ไธออล (thiol) ของกรดอะมิโนจะทำปฏิกริยากับ sodium nitroprusside หรืออีกชื่อหนึ่งว่า sodium ferrinitrosocyanide $[Na_2Fe(CN)_5NO]$ ในขณะที่มีแอมโมเนียมากเกินพอให้ผลบวกเป็นสารสีแดง

สารเคมี สารละลาย 0.1% ของกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ ได้แก่ ซีสเตอีน ซีสตีน และเมไธโอนีน

Sodium nitroprusside 20 กรัม/ลิตร เตรียมใช้ใหม่ ๆ

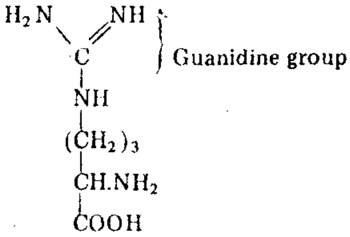
NH_4OH

วิธีการ ผสมสารละลาย sodium nitroprusside ที่เตรียมใหม่ ๆ 0.5 มล. กับสารละลายกรดอะมิโนที่ต้องการจะตรวจสอบ 2 มล. ให้เข้ากันดี เติม NH_4OH 0.5 มล. ดูการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 3.7 Sakaguchi's Test

หลักการ อาร์จินีนเป็นกรดอะมิโนตัวเดียวที่มีหมู่กวานิดีน (guanidine) จึงสามารถทำปฏิกริยากับ α-naphthol และสารออกซิไดซิ่งเช่นน้ำโบรมีนให้สารสีแดง

Arginine



สารเคมี สารละลาย 0.1% ของกรดอะมิโนไกลซีน และอาร์จินีน

สารละลาย 0.1% ของพวกกวานิดีน เช่น glycocyamine, creatine และ methyl guanidine

สารละลาย 0.1% ยูเรีย

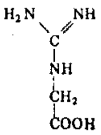
10 M NaOH

α-naphthol 0.1% ในอัลกอฮอลล์

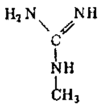
น้ำโบรมีน เตรียมโดยหยดโบรมีน4-5หยดลงในน้ำกลั่น 100 มล. แล้วเขย่าให้เข้ากันดี ควรทำในตู้ควันด้วยความระมัดระวังเป็นพิเศษ โบรมีนทำให้ผิวหนังไหม้ได้

วิธีการ เตรียมกรดอะมิโนที่จะตรวจสอบไว้ในหลอดทดลองหลอดละ 3 มล. เติม 10 M NaOH 1 มล. และ α-naphthol 2 หยด ลงในทุก ๆ หลอด เขย่าให้เข้ากันดีแล้วหยดน้ำโบรมีนลงไป 4-5 หยด สังเกตผลที่ได้

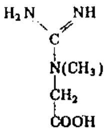
ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้อีกกับสารประกอบพวกกวานีดีนเพื่อให้ทราบแน่ชัดยิ่งขึ้นว่าหมู่ใดที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิกริยา



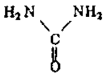
Glycocyamine



Methyl guanidine



Creatine

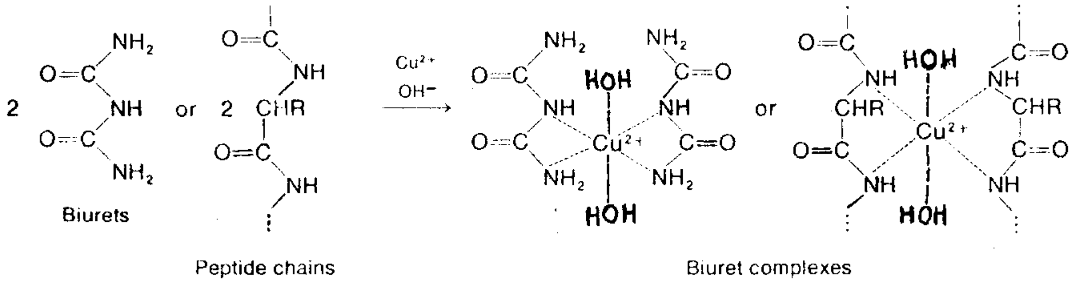


Urea

การทดลองเกี่ยวกับโปรตีน

การทดลองที่ 3.8 Biuret Test

หลักการ การตรวจสอบชนิดนี้มิได้จำเพาะโปรตีนเพียงอย่างเดียว สารใดก็ตามที่ประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ตั้งแต่สองพันธะขึ้นไปจะให้ผลบวกทั้งนั้น ที่ได้ชื่อว่า biuret test ก็เนื่องมาจากการนำเอาสารไบยูเร็ตไปทำปฏิกริยากับสารละลาย $CuSO_4$ ในด่างเกิดเป็นสารสีม่วง สารอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายไบยูเร็ตกล่าวคือ ประกอบด้วยหมู่แอมมีด (amide) สองหมู่ติดต่อกันหรือแอมมีดสองหมู่นั้นอาจจะเชื่อมต่อกันด้วยไนโตรเจนอะตอมหรือคาร์บอนอะตอม ต่างก็จะให้สารละลายสีม่วงใสเหมือนไบยูเร็ต สีม่วงนั้นเนื่องมาจากเกิดสารประกอบเชิงซ้อนประเภทโคออร์ดิเนต (coordination complex) ระหว่าง Cu^{+2} กับอิเล็คตรอนคู่โดดเดี่ยว (lone pair electron) ของไนโตรเจนอะตอมในโมเลกุลสารที่มีคุณสมบัติดังได้กล่าวไว้แล้ว กับออกซิเจนอะตอมในโมเลกุลของน้ำ การตรวจสอบแบบนี้ต้องใช้ปริมาณโปรตีนในช่วง 1-20 มิลลิกรัมจึงจะเกิดปฏิกริยาให้สีม่วงได้ ไดเปปไทด์ ยูเรีย กรดอะมิโน (ยกเว้นเซอรีนและธริโอนีน) จะให้ผลลบ



สารประกอบเชิงซ้อนประเภทโคออร์ดิเนตที่เกิดขึ้น

สารเคมี 1% $CuSO_4$

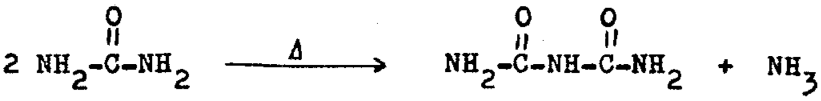
10 M NaOH

สารละลาย 3 % ของโปรตีนอัลบูมิน

สารละลาย 0.1% ของกรดอะมิโนไกลซีน เซอรีน และธริโอนีน

วิธีการ หยดสารละลาย 1% $CuSO_4$ 5 หยดลงในหลอดทดลองซึ่งมีสารละลายโปรตีนที่จะตรวจสอบ 2 มล. เติม 10 M NaOH 2 มล. เขย่าให้เข้ากันดี ดูผลที่เกิดขึ้น ในกรณีที่ใช้สารละลาย $CuSO_4$ เจือจางหยดไปเรื่อยทีละหยด ๆ จนกว่าจะเห็นผลบวกเกิดขึ้นนั้น บางครั้งจะเห็นตะกอนสีฟ้าของ $Cu(OH)_2$ ถ้าหากว่าหยด $CuSO_4$ มากเกินพอ

ทำการทดลองอีกครั้งหนึ่งโดยใช้สารละลาย 0.1% ของกรดอะมิโนที่กำหนดให้



$$2\,NH_2-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH_2 \xrightarrow{\Delta} NH_2-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-NH_2 + NH_3$$

urea biuret

ถ้าต้องการเตรียมสารไบยูเร็ตเพื่อมาตรวจสอบ จะกระทำได้โดยการเผายูเรียปริมาณเล็กน้อยในหลอดทดลอง ปรับตะเกียงให้เปลวไฟต่ำเผาไปจนกระทั่งยูเรียหลอมละลายและเป็นฟอง ระวังอย่าให้ไหม้ จะได้กลิ่นก๊าซแอมโมเนีย นำสารในหลอดทดลองที่เผาได้ไปละลายน้ำจากนั้นไปทำการตรวจสอบด้วย biuret test

การทดลองที่ 3.9 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้โลหะหนัก (heavy metals)

หลักการ ที่ pH 7.0 หรือ pH ค่อนข้างเป็นด่าง โมเลกุลโปรตีนจะมีประจุลบสามารถจับกับประจุบวกของไอออนของโลหะหนักได้ มีผลให้ประจุสุทธิในโมเลกุลเป็นศูนย์ ไม่มีแรงผลักกันระหว่างประจุต่างชนิดและจะตกตะกอนลงมา ต้องระวังอย่าให้สารละลายเป็นด่างมากเกินไปเพราะอาจทำให้ตะกอนไฮดรอกไซด์ของโลหะตกปนออกมาด้วย การตกตะกอนวิธีนี้ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติได้

สารเคมี สารละลาย 3 % ของโปรตีนอัลบูมิน

สารละลาย 0.2 M ของโลหะหนัก $HgCl_2$, $(CH_3COO)_2Pb$, $AgNO_3$, $CuSO_4$ และ $BaCl_2$

วิธีการ เตรียมสารละลายโปรตีนไว้ในหลอดทดลอง 5 หลอด หลอดละ 2 มล. ค่อย ๆ หยดสารละลายของโลหะหนักแต่ละชนิดลงไปในแต่ละหลอดทีละหยด ๆ แล้วสังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น

หลอดที่ 1 เติม $HgCl_2$ ทีละหยด
หลอดที่ 2 เติม $(CH_3COO)_2Pb$ ทีละหยด
หลอดที่ 3 เติม $AgNO_3$ ทีละหยด
หลอดที่ 4 เติม $CuSO_4$ ทีละหยด
หลอดที่ 5 เติม $BaCl_2$ ทีละหยด

ประโยชน์ของการตกตะกอนแบบนี้จะเห็นได้จากการใช้นมหรือไข่ขาวเป็นยาแก้ยาพิษ (antidote) สำหรับคนที่ได้รับพิษเนื่องจากโลหะหนักในทางเดินอาหาร หรือในกรณีที่ใช้ $AgNO_3$ หรือ $HgCl_2$ ในการฆ่าเชื้อโรคซึ่งก็คือการตกตะกอนโปรตีนในตัวบักเตรีด้วย Ag^{+1} หรือ Hg^{+2} นั่นเอง

การทดลองที่ 3.10 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้อัลคาลอยด์รีเอเจนต์

หลักการ กรดอินทรีย์บางประเภท เช่น picric acid, tannic acid, trichloroacetic acid, phosphotungstic acid, sulphosalicylic acid, phosphomolybdic acid สามารถตกตะกอนสารประเภทอัลคาลอยด์ เช่น มอร์ฟีน นิโคติน ควินนิน เป็นต้น จึงรวมเรียกว่า อัลคาลอยด์รีเอเจนต์ กรดเหล่านี้เป็นสารที่ใช้ตกตะกอนโปรตีนด้วยเช่นกัน

โปรตีนในสารละลายที่ค่อนข้างเป็นกรดจะมีประจุบวก และสามารถจับกับประจุลบของอัลคาลอยด์รีเอเจนต์ที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออนแล้ว ได้ผลิตผลเป็นเกลือที่ไม่ละลายน้ำ การตกตะกอนแบบนี้โปรตีนจะสูญเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจาก pH เป็นกรดมากเกินไป

สารเคมี สารละลาย 3 % ของโปรตีนอัลบูมิน

อัลคาลอยด์รีเอเจนต์ ได้แก่ 20% trichloroacetic acid, 10% tannic acid, 20% sulphosalicylic acid, saturated picric acid

วิธีการ เตรียมสารละลายโปรตีนไว้ในหลอดทดลอง 4 หลอด หลอดละ 2 มล. เติมอัลคาลอยด์รีเอเจนต์แต่ละชนิดลงไปในแต่ละหลอด หลอดละ 5 หยด

หลอดที่ 1 เติม 20% sulphosalicylic acid
หลอดที่ 2 เติม 10% tannic acid
หลอดที่ 3 เติม 20% trichloroacetic acid
หลอดที่ 4 เติม saturated picric acid

สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ ๕.11 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$

หลักการ ได้เคยกล่าวไว้แล้วว่าเกลือที่มีฤทธิ์เป็นกลางสามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีโดยเฉพาะเกลือที่เป็นกลางประเภทไดวาเลนท์ เกลือ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นที่นิยมมาก เกลือนี้มีผลทำให้ ionic strength ของสารละลายโปรตีนเปลี่ยนแปลง นอกจากนั้นยังทำให้ประจุของโมเลกุลโปรตีนเป็นกลาง และช่วยดูดน้ำออกจากโมเลกุลโปรตีนด้วย หลักการการตกตะกอนแบบนี้ถูกนำไปใช้ในการตกตะกอนลำดับส่วน (fractional precipitation) พวกโปรตีนชนิดต่าง ๆ

สารเคมี สารละลาย 3 % ของโปรตีนอัลบูมิน

สารละลายอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$

$(NH_4)_2SO_4$ ที่เป็นของแข็ง

เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก

วิธีการ เตรียมสารละลาย 3 % ของโปรตีนไว้ในหลอดทดลอง 2 มล. เติมสารละลายอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 6 มล. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที สังเกตดูตะกอนที่เกิดขึ้น นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน

ไว้สำหรับไปทำ biuret test ส่วนของเหลวนำไปตกตะกอนอีกครั้งหนึ่งด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ของแข็งที่มากเกินพอ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนและของเหลวออกจากกัน ของเหลวนี้นำไปทำ biuret test ได้เลย ส่วนตะกอนที่ได้ทั้งสองครั้งนั้นนำไปละลายด้วยน้ำกลั่นเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของตะกอนโปรตีนว่าจะละลายน้ำหรือไม่ จากนั้นจึงนำไปทำ biuret test เพื่อตรวจสอบว่าตะกอนที่ตกลงมานั้นเป็นตะกอนของโปรตีนจริง

การทดลองที่ 3.12 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เอธานอล

หลักการ เอธานอลเป็นสารอินทรีย์ที่ค่า dielectric constant ต่ำกว่าน้ำ ทำให้แรงดึงดูดระหว่างประจุต่างชนิดกันของโมเลกุลโปรตีนมีค่ามากกว่าแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับโมเลกุลของน้ำ (ดูหน้า107) เป็นผลให้โมเลกุลโปรตีนรวมตัวกันและตกเป็นตะกอนลงมาเมื่ออยู่ในสารละลายของเอธานอล

สารเคมี สารละลาย 3 % ของโปรตีนอัลบูมิน
95% EtOH

วิธีการ เตรียม 95% EtOH ไว้ในหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 1 มล.

หลอดที่ 1 95% EtOH 1 มล. ไม่ต้องเจือจาง

หลอดที่ 2 ปิเปตต์น้ำกลั่น 1 มล. ใส่ลงไปเพื่อเป็นการเจือจางให้เป็น 48% EtOH เขย่าให้ดี แล้วปิเปตต์สารละลายนี้ออก 1 มล. คงเหลือ 48% EtOH ไว้ในหลอดเพียง 1 มล. เพื่อทำการทดลองต่อไป

หลอดที่ 3 ปิเปตต์น้ำกลั่นเติมลงไป 4 มล. เพื่อเจือจางให้เป็น 19% EtOH เขย่าให้ดี ปิเปตต์สารละลายนี้ออก 4 มล. คงเหลือ 19% EtOH ไว้ในหลอด 1 มล. เพื่อทำการทดลองต่อไป

หยดสารละลายโปรตีนอัลบูมินลงในหลอดทดลองทั้งสามนี้หลอดละ 4 หยด สังเกตตะกอนของอัลบูมินที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กันของเอธานอลตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปในหลอดทั้งสามหลอดละ 5 มล. ดูว่าตะกอนอัลบูมินมีการเปลี่ยนแปลงอย่างใดหรือไม่

การทดลองเกี่ยวกับการตรวจหาปริมาณ

การทดลองที่ 3.13 การหาปริมาณกรดอะมิโนโดยใช้ปฏิกริยานินไฮดริน

หลักการ กลไกการเกิดปฏิกริยาระหว่างกรดอะมิโนและนินไฮดรินนั้นเป็นที่ทราบกันแล้ว (ดูหน้า 73 และหน้า 109) การทดลองนี้นำเอาการทดลองที่ 3.1 มาดัดแปลงให้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ ผลบวกของปฏิกริยาที่ให้สารสีม่วงสามารถนำไปวัดการดูดแสงที่ 570 นาโนเมตร ส่วนกรดอิมิโนโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนที่ให้สีเหลืองนั้นนำไปวัดการดูดแสงที่ 440 นาโนเมตร

สารเคมี สารละลาย 0.1 mM ของกรดอะมิโนแอสปาติค อาร์จินีน ลูซีน และโพรลีน

*acetate buffer 4 M pH 5.5

methyl cellosolve (ethylene glycol monoethyl ether)

50% EtOH

*นินไฮดรินรีเอเจนต์

อ่างน้ำเดือด

เครื่องมือวัดการดูดแสงสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการ ปิเปตต์สารละลายกรดอะมิโนที่ต้องการจะตรวจสอบใส่ในหลอดทดลอง 2 มล. เติมนินไฮดรินรีเอเจนต์ 2 มล. นำไปแช่อ่างน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นเติม 50% EtOH 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดแสงที่ 570 หรือ 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับค่าการดูดแสงของสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

การทดลองที่ 3.14 การหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ไบยูเร็ตรีเอเจนต์

หลักการ เหมือนการทดลองที่ 3.8 แต่นำมาดัดแปลงให้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ

สารเคมี สารละลายมาตรฐานของโปรตีนอัลบูมินความเข้มข้น 5 มก./มล.

ไบยูเร็ตรีเอเจนต์

อ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ

เครื่องมือวัดการดูดแสงสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีการ เติมไบยูเร็ตรีเอเจนต์ 3 มล. ลงในสารละลายโปรตีน 2 มล. เขย่าให้เข้ากันดี นำไปแช่อ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น แล้วอ่านค่าการดูดแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้เมื่อใช้สารละลายโปรตีนปริมาตรต่าง ๆ กันไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดแสงและความเข้มข้น กราฟมาตรฐานจะเป็นประโยชน์ในการทดลองอื่น ๆ อีกหลายการทดลอง

การทดลองที่ 3.15 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Folin-Lowry

หลักการ โปรตีนจะทำปฏิกริยากับ Folin-Ciocalteau reagent ให้สารมีสี การเกิดสีเนื่องมาจากโปรตีนอยู่ในสารละลายคอปเปอร์ที่เป็นด่างเหมือนใน biuret test และปฏิกริยารีดัคชั่นของเกลือ phosphomolybdate-phosphotungstate โดยกรดอะมิโนไทโรซีนและทริปโตแฟนในโมเลกุลโปรตีน โปรตีนต่างชนิดกันให้ความเข้มของสีไม่เท่ากันเพราะปริมาณของกรดอะมิโนประเภท aromatic ในโปรตีนแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ปฏิกริยานี้มีความไวมากปริมาณโปรตีนเพียงแค่ 5 ไมโครกรัม ก็สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ วิธีการนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งที่ใช้มากเวลาทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (purification of protein) เนื่องจากบอกให้ทราบถึงปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป

สารเคมี สารละลาย ก. เป็นสารละลายของ Na_2CO_3 20 กรัม/ลิตร ใน 0.1 M NaOH

สารละลาย ข. เป็นสารละลายของ $CuSO_4.5H_2O$ 5 กรัม/ลิตรใน sodiumpotassium tartrate 10 กรัม/ลิตร

"สารละลายด่าง" เตรียมได้โดยผสมสารละลาย ก. 50 มล. กับสารละลาย ข. 1 มล. (เตรียมในวันที่ต้องการใช้สารละลายนี้เท่านั้น)

Folin-Ciocalteau reagent เป็นรีเอเจนต์ทางการค้า เตรียมใหม่ ๆ ในวันที่จะใช้สารนี้เท่านั้น โดยนำมาผสมน้ำด้วยปริมาตรที่เท่ากัน รีเอเจนต์นี้ประกอบด้วย sodium tungstate และ sodium molybdate ในกรด phosphoric และ HCl

สารละลายโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน 0.2 มก./มล.

วิธีการ เติม "สารละลายด่าง" 5 มล. ลงในสารละลายโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติม Folin-Ciocalteau reagent 0.5 มล. โดยเร็ว ผสมให้เข้ากันทันที หลังจากนั้น 30 นาทีนำไปอ่านค่าการดูดแสงได้ที่ 750 นาโนเมตร

ควรจะทำกราฟมาตรฐานไว้เพื่อความสะดวกเวลาต้องการหาความเข้มข้นโปรตีนในสารละลายที่เราต้องการจะศึกษา

การทดลองที่ 3.16 กราฟเส้นโค้งไตเตรชั่น (titration curve) ของกรดอะมิโน

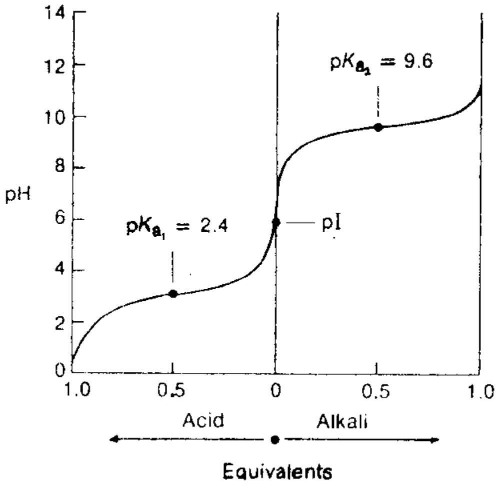
หลักการ โครงสร้างกรดอะมิโนมีหมู่ที่แตกตัวได้ สามารถให้หรือรับโปรตอนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH การแตกตัวของกรดอะมิโนเป็นไปตามสมการของ Henderson-Hasselbalch

$$pH = pK_a + \log_{10} \frac{\left[\begin{array}{c}\text{unprotonotated} \\ \text{form (base)}\end{array}\right]}{\left[\begin{array}{c}\text{protonated} \\ \text{form (acid)}\end{array}\right]}$$

เมื่อความเข้มข้นของกรดอะมิโนในรูปแบบที่เป็นกรดเท่ากับความเข้มข้นของรูปแบบที่เป็นด่างจะทำให้ค่า $\log_{10}\frac{[\text{unprotonated form (base)}]}{[\text{protonated form (acid)}]}$ ในสมการ Henderson Hasselbalch มีค่าเป็น $\log_{10}$ ของ 1 ซึ่งเท่ากับศูนย์ ดังนั้นจึงสามารถให้คำจำกัดความของ pK_a ได้ว่าเป็นค่า pH ที่ความเข้มข้นของกรดอะมิโนรูปแบบที่เป็นกรดเท่ากับความเข้มข้นของกรดอะมิโนรูปแบบที่เป็นด่าง

ไกลซีนประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโนที่ค่า pK_a เท่ากับ 2.4 และ 9.6 ตามลำดับ สารละลายไกลซีนที่ pH 6.0 จะเป็น zwitterion หรือ dipolar ion กล่าวคือ หมู่คาร์บอกซิลอยู่ในรูป $-COO^-$ หมู่อะมิโนอยู่ในรูป $-NH_3^+$ ถ้านำสารละลายนี้ไปเติมกรด pH จะลดลงโดยเร็วในตอนแรกแล้วค่อยลดช้าลง ๆ จนกระทั่งถึง pH 2.4 ซึ่งเป็นค่า pK_a ถ้ายังคงเติมกรดต่อไป คาร์บอกซิเลทไอออนในรูป $-COO^-$ ก็จะลดน้อยลงไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งหมดเนื่องจากกลายเป็นรูปแบบ $-COOH$ จนหมดสิ้น ในทำนองเดียวกันถ้าเราไตเตรทหมู่ $-NH_3^+$ ด้วยด่างก็จะได้เส้นโค้งเหมือนกัน ดูรูปภาพประกอบ (รูปที่ 3.18)

จุดตัดบนแกนตั้งระหว่างกราฟเส้นโค้งที่ได้จากการไตเตรทกรดอะมิโนไกลซีนกับกรดและกับด่างก็คือ isoelectric point หรือ pI นั่นเอง



รูปที่ 3.18 กราฟเส้นโค้งไตเตรชันของกรดอะมิโนไกลซีน

สารเคมี 0.1 M HCl
0.1 M NaOH
สารละลายกรดอะมิโนไกลซีน 0.1 M
บัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 6.99
บิวเรตต์
เครื่องมือวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH Meter)

วิธีการ ปิเปตต์สารละลายกรดอะมิโนไกลซีน 10 มล. ใส่ลงในบีคเกอร์ขนาด 100 มล. ทำการปรับมาตรฐาน (standardize) เครื่องมือวัด pH ด้วยบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 6.99 เสร็จแล้วจึงวัด pH ของสารละลายกรดอะมิโนไกลซีน นำสารละลายกรดอะมิโนนี้ไปไตเตรทกับ 0.1 M HCl จากบิวเรตต์ทีละหยด ๆ ในตอนแรก ตอนหลังจึงค่อยเพิ่มปริมาณหยดให้มากขึ้น บันทึกค่า pH ที่เปลี่ยนแปลง ไตเตรทจนกระทั่งได้ค่า pH ประมาณ 1.5

ล้างอิเล็คโทรดด้วยน้ำกลั่น ปรับมาตรฐานเครื่องมือวัด pH อีกครั้งหนึ่ง เตรียมสารละลายกรดอะมิโนไกลซีนไว้อีก 10 มล. นำไปไตเตรทกับ 0.1 M NaOH ด้วยวิธีการเดียวกัน จนอ่านค่า pH ได้ประมาณ 12.5 บันทึกผลการเปลี่ยนแปลง pH ด้วย

เขียนกราฟระหว่างปริมาตรกรดหรือด่างที่เติมลงไปกับค่า pH ที่อ่านได้หาค่า isoelectric point และค่า pK_a ของไกลซีนจากกราฟนี้

การทดลองเกี่ยวกับโครงสร้างโปรตีน

การทดลองที่ 3.17 การตรวจหากรดอะมิโนที่อยู่ที่ปลายคาร์บอกซิล (ปลาย C) ของโมเลกุลโปรตีน

หลักการ เอ็นไซม์ carboxypeptidase จัดเป็นเอ็นไซม์ประเภท exopeptidase สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่อยู่ทางปลาย C ทีละพันธะ โดยเริ่มจากพันธะเปปไทด์นอกสุดเข้ามายังพันธะภายในสายเปปไทด์ได้ผลิตผลเป็นกรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์ดังกล่าวที่ถูกย่อยสลายไปหนึ่งพันธะก็จะมีความยาวของสายเปปไทด์ลดน้อยลงไปเท่ากับความยาวของหนึ่งหน่วยกรดอะมิโน จากนั้นเอ็นไซม์ carboxypeptidase ก็จะย่อยพันธะเปปไทด์ที่เหลือต่อไปอีกเรื่อย ๆ ตามลำดับ ถ้าเราสามารถแยกกรดอะมิโนอิสระซึ่งเป็นผลิตผลตัวแรกออกมาได้ทันโดยไม่ปะปนกับกรดอะมิโนอิสระตัวอื่น ๆ นำไปวิเคราะห์โดยเปเปอร์โครมาโตกราฟีเทียบกับกรดอะมิโนมาตรฐานจะทำให้ทราบว่ากรดอะมิโนที่อยู่ที่ปลาย C เป็นกรดอะมิโนอะไร

สารเคมี Tris-HCl buffer 25 mM pH 7.5

สารละลายโปรตีน (ribonuclease หรือ muramidase) 10 มก./มล. ในบัฟเฟอร์

trichloroacetic acid (TCA) 100 กรัม/ลิตร

เอ็นไซม์ carboxypeptidase A 1 มก./มล. ในบัฟเฟอร์

หลอด capillary

กระดาษโครมาโตกราฟีวัตต์แมนเบอร์ 1 ขนาด 20x20 ซม.

สารผสมตัวทำละลาย butanol : glacial acetic acid : H_2O อัตราส่วน 12 : 3 : 5

สารละลายนินไฮดริน 0.2% ในอะซีโตน

กรดอะมิโนมาตรฐาน 10 มก./มล. อะลานีน, อาร์จินีน, ลูซีน, เซอรีน และวาลีน

อ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ
ตู้อบอุณหภูมิ 105°ซ
บีคเกอร์ขนาดใหญ่หรือถังแก้วพร้อมฝาปิดสำหรับการทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี
เครื่องหมุนเหวี่ยง

วิธีการ เติมเอ็นไซม์ carboxypeptidase A 2.0 มล. ลงในหลอดทดลองซึ่งมีสารละลายโปรตีนอยู่แล้ว 2.0 มล. เขย่าให้เข้ากันดีรีบนำไปแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37°ซ โดยเร็ว ที่เวลา 0, 10, 20, 30 และ 60 นาทีหลังจากนั้นให้ปิเปตต์สารละลายจากหลอดทดลองออกมาทีละ 0.5 มล. ผสมกับ 10% TCA 0.5 มล. นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอน ของเหลวใสที่ได้ให้นำไปทำเปเปอร์โครมาโตการฟี

นำกระดาษโครมาโตการฟีวัตต์แมนเบอร์ 1 ขนาด 20×20 ซม. มากะระยะให้พอเหมาะโดยเว้นจากริมซ้ายขวาเข้ามาด้านละ 3.0 ซม. เว้นจากขอบล่างขึ้นมา 1.0 ซม. จุดต่าง ๆ ที่จะหยดสารลงไปมีทั้งหมด 10 จุดแต่ละจุดห่างกันประมาณ 1.5 ซม.

จุดที่ 1 กรดอะมิโนมาตรฐานอะลานีน
จุดที่ 2 กรดอะมิโนมาตรฐานอาร์จินีน
จุดที่ 3 กรดอะมิโนมาตรฐานลูซีน
จุดที่ 4 กรดอะมิโนมาตรฐานเซอรีน
จุดที่ 5 กรดอะมิโนมาตรฐานวาลีน
จุดที่ 6 ส่วนใสที่ได้จากการทดลองเมื่อเวลา 0 นาที
จุดที่ 7 ส่วนใสที่ได้จากการทดลองเมื่อเวลา 10 นาที
จุดที่ 8 ส่วนใสที่ได้จากการทดลองเมื่อเวลา 20 นาที
จุดที่ 9 ส่วนใสที่ได้จากการทดลองเมื่อเวลา 30 นาที
จุดที่ 10 ส่วนใสที่ได้จากการทดลองเมื่อเวลา 60 นาที

ใช้หลอด capillary หยดสารลงบนตำแหน่งต่าง ๆ ดังกำหนดพยายามให้เส้นผ่านศูนย์กลาง $\leq$ 3 มิลลิเมตร รอให้แห้งเสียก่อนจึงหยดซ้ำลงไปใหม่จนได้ปริมาณตามที่ต้องการ เมื่อสารตามจุดต่าง ๆ แห้งดีแล้วโค้งริมกระดาษด้านซ้ายขวาเข้าหากันให้เป็นรูปทรงกระบอก เย็บริมสองด้านนี้ให้ติดกันโดยใช้เครื่องเย็บกระดาษ นำไปวางในบีคเกอร์หรือถังแก้วซึ่งมีฝาปิด ภายในมีสารผสมตัวทำละลาย butanol : glacial acetic acid : H_2O 12 : 3 : 5 ระดับสูงไม่เกิน 1 ซม. สารผสมตัวทำละลายนี้ต้องเตรียมใส่ภาชนะล่วงหน้าไว้ก่อนราวครึ่งชั่วโมงเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอระเหยของสารผสมตัวทำละลาย เวลาวางกระดาษลงในภาชนะต้องระวังมิให้จุดต่าง ๆ ของสารอยู่ต่ำกว่าระดับของสารผสมตัวทำละลาย มิฉะนั้นแล้วสารต่าง ๆ จะถูกชะออกมาหมด ปิดฝา

ให้ดีปล่อยให้สารผสมตัวทำละลายซึมจากด้านล่างขึ้นด้านบน แบบนี้เรียกว่าเปเปอร์โครมาโตกราฟีแบบ ascending จนกระทั่งอีก 2 ซม. จะถึงปลายกระดาษตอนบน ยกม้วนกระดาษออกมาจากภาชนะ ใช้ดินสอขีดระดับการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย คลี่กระดาษออกผึ่งให้แห้งอาจใช้เครื่องเป่าผมก็ได้แล้วพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน 0.2% ในตู้ควัน ทำให้แห้งพอหมาดแล้วเอาเข้าตู้อบอุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 2-3 นาที จะปรากฏจุดต่าง ๆ ของกรดอะมิโนขึ้นมาบนกระดาษ กรดอะมิโนส่วนใหญ่ให้สีม่วง ยกเว้นโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนที่ให้สีเหลืองกับนินไฮดริน จากผลการทดลองนี้ให้บอกว่ากรดอะมิโนใดที่อยู่ที่ปลาย C ของโปรตีนที่กำหนดให้

การทดลองที่ 3.18 การตรวจหากรดอะมิโนที่อยู่ที่ปลายอะมิโน (ปลาย N) ของโมเลกุลโปรตีน

หลักการ แซงเกอร์รีเอเจนต์มี 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene เป็นองค์ประกอบ จะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของโมเลกุลโปรตีนในสภาวะความเป็นด่างอย่างอ่อน (ดูหน้า 85 ด้วย) หลังจากนั้นนำโปรตีนไปไฮโดรไลซ์ด้วย 6 M HCl ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ ยกเว้นกรดอะมิโนตัวที่อยู่ทางปลาย N จะอยู่ในรูปอนุพันธ์ DNP ของกรดอะมิโน นำอนุพันธ์นี้ไปวิเคราะห์โดยเปเปอร์โครมาโตกราฟี ในกรณีที่ไฮโดรไลเสทจากกรด (acid hydrolysate) มีทั้งอนุพันธ์ DNP ของกรดอะมิโนที่เป็นนอนโพลาร์และโพลาร์ปนกันอยู่ เราสามารถสกัดอนุพันธ์ DNP กรดอะมิโนที่เป็นนอนโพลาร์ออกได้โดยใช้อีเธอร์ ส่วนอนุพันธ์ DNP ของกรดอะมิโนประเภทโพลาร์ก็ยังคงอยู่ใน aqueous phase เหมือนเดิม

สารเคมี โปรตีน (ฮีโมโกลบิน muramidase หรือ ribonuclease)

$NaHCO_3$

6 M HCl, HCl เข้มข้น

อีเธอร์ (ที่ปราศจากเปอร์ออกไซด์)

สารละลายของ 1-fluoro-2, 4-dinitrobenzene 5% ปริมาตร/ปริมาตร ในเอธานอล (FDNB หรือ DNFB)

*sodium phthalate buffer 0.1 M pH 4.6

*sodium phosphate buffer 0.75 M pH 6.0

อะซีโตน

กระดาษโครมาโตกราฟีวัตต์แมนเบอร์ 4

อนุพันธ์ (DNP-กรดอะมิโน) มาตรฐานไกลซีน วาลีน ไลซีน และเฟนิลอะลานีน (ควรเก็บไว้ในที่มืด)

เครื่องมือสำหรับทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี

เครื่องเขย่า

ตู้อบอุณหภูมิ 110°ซ

ampoule

หลอดแสง UV

วิธีการ **การเตรียมอนุพันธ์ DNP ของกรดอะมิโน** : ชั่งโปรตีนประมาณ 10-20 มก. ผสมกับ $NaHCO_3$ ด้วยน้ำหนักที่เท่ากัน เติมน้ำลงไป 2 มล. จากนั้นใส่สารละลาย FDNB ด้วยปริมาตรสองเท่าของสารที่มีอยู่แล้ว นำเข้าเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชม. ที่อุณหภูมิห้องตามปกติ พยายามรักษาให้ pH อยู่ประมาณ 8-9 โดยการเติม $NaHCO_3$ เพิ่มลงไปถ้าจำเป็น ถ้า pH ต่ำเกินไปจะมีการตกตะกอนเกิดขึ้น สกัดสารแขวนลอย (suspension) ที่ได้ด้วยอีเธอร์ที่ปราศจากเปอร์ออกไซด์สามครั้งเพื่อแยกอนุพันธ์ DNP ออกมา ปรับ pH ให้เป็น 1.0 โดยประมาณด้วยกรดแก่ แล้วสกัดด้วยอีเธอร์ที่ปราศจากเปอร์ออกไซด์ปริมาตรเท่ากันอีกสามครั้ง นำอีเธอร์ที่ได้หมดทุกครั้งมารวมกันระเหยให้แห้งในตู้ควันเติมอะซีโตน 0.2 มล. ถ่ายใส่ ampoule แล้วระเหยอะซีโตนออกให้หมด เติม 6 M HCl ปริมาตร 1 มล. ปิด ampoule แบบปิดประทับตรา (seal) นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 110°ซ นาน 18 ชั่วโมง เพื่อทำการไฮโดรไลซีสแบบสมบูรณ์

เมื่อครบเวลาตามกำหนดนำ ampoule ออกมาทำให้เย็นค่อย ๆ เปิด ampoule อย่างระมัดระวัง เติมน้ำ 1 มล. แล้วสกัดด้วยอีเธอร์สามครั้ง ๆ ละ 2 มล. รวบรวมอีเธอร์ทุกครั้งเข้าด้วยกันระเหยให้แห้งจะได้อนุพันธ์ DNP ของกรดอะมิโนที่ต้องการ เวลาจะทำเปเปอร์โครมาโตกราฟีให้ละลายด้วยอะซีโตนปริมาตรเพียงเล็กน้อย

การทำเปเปอร์โครมาโตกราฟี : เทคนิคต่าง ๆ เหมือนการทดลองที่ 3.17 ใช้หลอด capillary หยดอนุพันธ์ DNP ของกรดอะมิโนที่เตรียมได้ลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี วัตต์แมนเบอร์ 4 ที่อิ่มตัวด้วย phthalate buffer จนกระทั่งเห็นเป็นจุดสีเหลืองชัดเจน พร้อมกับอนุพันธ์ (DNP-กรดอะมิโน) มาตรฐานต่าง ๆ ที่กำหนดให้ เมื่อแห้งดีแล้วนำไปทำเปเปอร์โครมาโตกราฟีแบบ ascending ใช้บัฟเฟอร์ phosphate 0.75 M pH 6.0 เป็นระบบตัวทำละลาย

การเตรียมสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง

1. acetate buffer 0.1 M pH 5.0

   ผสม glacial acetic acid 5.6 มล. กับน้ำกลั่น 900 มล. ปรับ pH ให้ได้ 5.0 โดยการเติมสารละลาย NaOH ทีละหยด พร้อมกับคนไปเรื่อย ๆ ปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. Millon's reagent

   mercuric sulphate 150 กรัม/ลิตร ใน 15% H_2SO_4 ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากสารละลายดั้งเดิมที่ประกอบด้วย mercuric nitrate ใน 50% HNO_3

3. acetate buffer 4 M pH 5.5

   ผสม glacial acetic acid 228.7 มล. กับน้ำกลั่น 670 มล. ปรับ pH เป็น 5.5 โดยการเติมสารละลาย NaOH ทีละหยดขณะที่คนอยู่เรื่อย ๆ ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

4. นินไฮดรินรีเอเจนต์

   ละลายนินไฮดริน 0.8 กรัมและไฮดรินแดนทิน (hydrindantin) 0.12 กรัม ใน methyl cellosolve 30 มล. เติม acetate buffer 4 M pH 5.5 ปริมาตร 10มล. เก็บใส่ขวดสีชาไว้ ควรจะเตรียมใช้ในวันที่จะทำการทดลองเท่านั้น

5. ไบยูเร็ตรีเอเจนต์

   ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 3 กรัม และ sodium potassium tartrate 9 กรัม ใน 0.2 M NaOH 500 มล. เติม KI 5 กรัม ปรับปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 ลิตร ด้วย 0.2 M NaOH

6. Tris-HCl buffer 25 mM pH 7.5

   เตรียมสารละลาย Tris (hydroxymethyl) aminomethane 50 mM และ HCl 50 mM ไว้ให้พร้อม ใช้สการละลาย Tris 50 mM ปริมาตร 50 มล. เติม 50 mM HCl ลงไปทีละน้อยขณะที่คนไปด้วยจนได้ pH 7.5 ตามต้องการ ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

7. sodium phthalate buffer 0.1 M pH 4.6

   เตรียมสารละลาย 0.2 M NaOH และ 0.2 M potassium hydrogen phthalate ไว้ ใช้ 50 มล. ของ 0.2 M potassium hydrogen phthalate เติม 0.2 M NaOH ลงไปทีละน้อยในขณะเดียวกันก็คนไปด้วยเมื่อได้ pH 4.6 ตามต้องการแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

8. sodium phosphate buffer 0.75 M pH 6.0

   เตรียมสารละลาย 1.5 M NaOH และ 1.5 M NaH_2PO_4 ใช้ 50 มล. ของ 1.5 M NaH_2PO_4 เติม 1.5 M NaOH ไปเรื่อยพร้อมทั้งคนด้วยจนกระทั่งได้ pH 6.0 ที่ต้องการ ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

คำถามท้ายบท

1. เขียนสูตรโครงสร้างแบบ zwitterion ของอะลานีน พร้อมทั้งบอกด้วยว่าโมเลกุลนี้ทำปฏิกริยาอย่างไรกับ ก) ไฮโดรเจนไอออน (H^+) ข) ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-)

2. บอกชื่อกรดอะมิโนที่ให้ผลบวกต่อ sulphur test

3. การทดลองในข้อ 2 ให้ตะกอนดำของสารใด? และเมื่อตะกอนดำนี้ทำปฏิกริยากับกรด HCl เข้มข้นจะให้ผลิตผลอะไร?

4. ทำไมผิวหนังที่ถูกกรด HNO_3 จึงมีสีเหลือง?

5. สารประกอบชนิดใดที่ให้ผลบวกต่อ biuret test?

6. ผลบวกของการตรวจสอบต่อไปนี้เป็นเช่นไร? สารชนิดใดที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบเหล่านี้
   ก) Biuret test

   ข) Ninhydrin test

   ค) Xanthoproteic test

   ง) Millon's test

   จ) Sakaguchi's test

7. $HgCl_2$ สามารถฆ่าเชื้อโรคได้อย่างไร?

8. $AgNO_3$ ที่ความเข้มข้นต่ำมาก ๆ สามารถป้องกันการติดเชื้อที่ตาได้โดยเฉพาะในเด็กเกิดใหม่ ให้อธิบายหลักการอันนี้และถ้า $AgNO_3$ มีความเข้มข้นสูงมาก จะเกิดผลอย่างไร?

9. เราใช้อะไรเป็นยาแก้พิษสำหรับคนที่กินสารพวกไอออนของโลหะหนัก เช่น Ag^{+1}, Hg^{+2}

10. หลังจากให้ยาแก้พิษแล้วทำไมจึงต้องพยายามทำให้คนไข้อาเจียน?

11. ให้บอกชื่อวิธีการต่าง ๆ ในการตกตะกอนอัลบูมินออกจากสารละลายอัลบูมิน

12. การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ นั้นมีข้อดีกว่าการตกตะกอนแบบอื่น ๆ อย่างไร?

13. ถ้าโปรตีนไฮโดรไลเสทให้ผลลบต่อ biuret test ท่านจะสรุปผลอย่างไร?

14. อธิบายความหมายคำว่าอัลคาลอยด์รีเอเจนต์

15. อธิบายหลักการของการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เอธานอล

16. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Folin-Lowry มีหลักการอย่างไร?

17. กราฟเส้นโค้งไตรเตรชั่นของกรดอะมิโนไลซีนจะเหมือนกับกราฟของกรดอะมิโนไกลซีนหรือไม่?

18. อธิบายความหมายคำว่า isoelectric point

19. จากการทดลอง 3.16 กำหนดค่า pK_a ของกรดอะมิโนไกลซีนเท่ากับ 2.4 และ 9.6 ตามลำดับ ให้หาค่า pI โดยมิต้องเขียนกราฟ

20. อธิบายการทำงานของเอ็นไซม์ carboxypeptidase A เปรียบเทียบกับเอ็นไซม์ aminopeptidase

21. บอกหลักการคร่าว ๆ ของเปเปอร์โครมาโตกราฟีแบบ ascending

22. บอกสภาวะ (condition) ของการไฮโดรไลซีสโปรตีนแบบสมบูรณ์

23. FDNB ทำปฏิกริยากับหมู่ ϵ-NH_2 ของกรดอะมิโนไลซีนได้หรือไม่?

24. กรดอะมิโนใดที่ให้สีเหลืองเวลาทำ ninhydrin test?

25. จากตารางที่ 3.3 ซึ่งแสดงค่า pK_a ให้หาประจุสุทธิ (–, 0 หรือ +) ของกรดอะมิโนไกลซีน แอสปาติค ไลซีน และฮีสติดีน ที่ pH ต่าง ๆ ต่อไปนี้

ก) pH 1.0 ข) pH 2.1 ค) pH 4.0 ง) pH 10

คำตอบ	gly	ก) +	ข) +	ค) +	ง) –
	asp	ก) +	ข) +	ค) –	ง) –
	lys	ก) +	ข) +	ค) +	ง) 0/–
	his	ก) +	ข) +	ค) +	ง) –

26. ในการทำเปเปอร์อิเล็คโตรโฟเรซีส (paper electrophoresis) ของสารละลายผสมระหว่างกรดอะมิโนไกลซีน อะลานีน กลูตามิค ไลซีน อาร์จินีนและเซอรีน ที่ pH 6.0 อยากทราบว่า

ก) กรดอะมิโนใดที่วิ่งไปยังขั้ว anode เร็วที่สุด?

ข) กรดอะมิโนใดที่วิ่งไปยังขั้ว cathode เร็วที่สุด?

ค) กรดอะมิโนใดที่ยังคงอยู่ที่จุดเริ่มต้น หรือมีการเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้นบ้างเล็กน้อย

คำตอบ ก) glu
ข) lys, arg
ค) gly, ala, ser-

27. กำหนดเปปไทด์ให้ 4 สายดังต่อไปนี้

1. Lys-asp-gly-ala-ala-glu-ser-gly
2. Ala-ala-his-arg-glu-lys-phe-ile
3. Tyr-cys-lys-ala-arg-arg-gly
4. Phe-ala-glu-ser-ala-gly

ก) ถ้านำเปปไทด์เหล่านี้ไปย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ trypsin จะได้ผลิตผลอะไร?

ข) เมื่อนำผลิตผลนั้นทำปฏิกริยาต่อไปกับ 2, 4-dinitrofluorobenzene แล้วทำการไฮโดรไลซีสด้วย 6 M HCl จะได้ผลเป็นอย่างไร? ให้เขียนอนุพันธ์ DNP ของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้น

คำตอบ ก) 1. Lys, asp-gly-ala-ala-glu-ser-gly

2. Ala-ala-his-arg, glu-lys, phe-ile
3. Tyr-cys-lys, ala-arg, arg, gly
4. Phe-ala-glu-ser-ala-gly

ข) 1. 2, 4-DNP-lys; 2, 4-DNP-asp
2. 2, 4-DNP-ala; 2, 4-DNP-glu; 2, 4-DNP-phe
3. 2, 4-DNP-tyr; 2, 4-DNP-ala; 2, 4-DNP-arg; 2, 4-DNP-gly
4. 2, 4-DNP-phe

28. การเรียงลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ที่กำหนดให้เป็นดังนี้

Val-ala-lys-glu-glu-phe-val-met-tyr-cys-glu-trp-met-gly-gly-phe

ก) เขียนผลิตผลที่เกิดขึ้นถ้านำเปปไทด์นี้ไปย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ chymotrypsin

ข) เมื่อนำผลิตผลในข้อ ก. ไปทำปฏิกริยากับ cyanogen bromide จะให้ผลเช่นไร?

คำตอบ ก) Val-ala-lys-glu-glu-phe, val-met-tyr, cys-glu-trp, met-gly-gly-phe

ข) Val-ala-lys-glu-glu-phe, val-homoserine lactone, tyr, cys-glu-trp, homoserine lactone, gly-gly-phe

29. เตทตระเปปไทด์ชนิดหนึ่งนำไปทำปฏิกริยากับ 2, 4-dinitrofluorobenzene และไฮโดรไลซีสด้วย 6 M HCl จะให้อนุพันธ์ DNP ของกรดอะมิโนวาลีนและกรดอะมิโนอื่นอีกสามตัว ถ้านำเตทตระเปปไทด์นี้ไปย่อยสลายด้วยเอ็นไซม์ trypsin จะให้เปปไทด์ออกมาสองส่วน ส่วนแรกเมื่อนำไปรีดิวซ์ด้วย $LiBH_4$ จะให้อะมิโนอัลกอฮอลล์ (amino alcohol) ของไกลซีนกับกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่งซึ่งให้สีเหลืองกับนินไฮดริน ให้หาการเรียงตัวของกรดอะมิโนในเตทตระเปปไทด์นี้

คำตอบ Val-lys (arg)-pro-gly

30. เปนตะเปปไทด์สายหนึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ asp, arg, leu, ser, tyr เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับเอ็ดมานรีเอเจนต์ เพื่อที่จะหาการเรียงตัวของกรดอะมิโนพบว่าองค์ประกอบของเปนตะเปปไทด์ที่เหลือในแต่ละรอบเป็นดังนี้

รอบที่ 1 : arg, asp, leu, ser

รอบที่ 2 : arg, asp, ser

รอบที่ 3 : arg, ser

ให้บอกว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนในเปปไทด์สายนี้เป็นอย่างไร?

คำตอบ Tyr-leu-asp-arg-ser

หรือ

Tyr-leu-asp-ser-arg