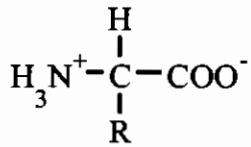
ตอนที่ 2

2 โปรตีน

- ❑ โครงสร้างของโปรตีน
- ❑ การละลายและการตกตะกอนโปรตีน
- ❑ การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน
- ❑ จุดมุ่งหมายในการแยกโปรตีน
- ❑ วิธีการแยกโปรตีน
- ❑ การวัดผลการแยกโปรตีน
- ❑ การหาปริมาณโปรตีน

โครงสร้างของโปรตีน

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน กรดอะมิโนที่พบในโครงสร้างของโปรตีนมี 20 ชนิด ดังตารางที่ 2.1 กรดอะมิโนทุกชนิดมีโครงสร้างหลักเหมือนกันคือ มีหมู่ NH_3^+ และ COO^- ที่ α–carbon atom แต่มี side chain (R group) ที่แตกต่างกัน โดยกรดอะมิโนทุกชนิด (ยกเว้นไกลซีน) มี α–carbon atom แบบ L–configuration การเชื่อมกันของกรดอะมิโนมีชนิดและการเรียงลำดับที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดพอลิเปปไทด์แบบต่างๆ โปรตีนมีขนาดตั้งแต่ 6000 Da ขึ้นไป โปรตีนมีรูปร่างเป็นเส้นใย (fibrous protein) เช่น เส้นไหม หรือรูปร่างเป็นก้อนกลม (globular protein) เช่น อัลบูมิน



ตารางที่ 2.1 โครงสร้างของกรดอะมิโน

Name	Abbreviation	Linear Structure
Alanine	Ala, **A**	CH_3-CH(NH_2)-COOH
Arginine	Arg, **R**	HN=C(NH_2)-NH-$(CH_2)_3$-CH(NH_2)-COOH
Asparagine	Asn, **N**	H_2N-CO-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Aspartic Acid	Asp, **D**	HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Cysteine	Cys, **C**	HS-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Glutamic Acid	Glu, **E**	HOOC-$(CH_2)_2$-CH(NH_2)-COOH
Glutamine	Gln, **Q**	H_2N-CO-$(CH_2)_2$-CH(NH_2)-COOH
Glycine	Gly, **G**	NH_2-CH_2-COOH
Histidine	His, **H**	NH-CH=N-CH=C-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Isoleucine	Ile, **I**	CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH
Leucine	Leu, **L**	$(CH_3)_2$-CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Lysine	Lys, **K**	H_2N-$(CH_2)_4$-CH(NH_2)-COOH
Methionine	Met, **M**	CH_3-S-$(CH_2)_2$-CH(NH_2)-COOH
Phenylalanine	Phe, **F**	Ph-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Proline	Pro, **P**	NH-$(CH_2)_3$-CH-COOH
Serine	Ser, **S**	HO-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Threonine	Thr, **T**	CH_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH
Tryptophan	Trp, **W**	Ph-NH-CH=C-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Tyrosine	Tyr, **Y**	HO-Ph-CH_2-CH(NH_2)-COOH
Valine	Val, **V**	$(CH_3)_2$-CH-CH(NH_2)-COOH

ระดับโครงสร้างของโปรตีนแบ่งเป็น 4 ระดับ (รูปที่ 2.1) คือ

1. ระดับปฐมภูมิ (primary structure) เป็นการต่อกันของกรดอะมิโนในสายพอลิเปปไทด์ด้วยพันธะเปปไทด์

2. ระดับทุติยภูมิ (secondary structure) การจัดโครงรูปสามมิติโดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กันภายในสายพอลิเปปไทด์ เกิดลักษณะเกลียวอัลฟา (α-helix) หรือแผ่นพลีทเบต้า (β-pleated sheet)

3. ระดับตติยภูมิ (tertiary structure) โครงสร้างสามมิติของพอลิเปปไทด์ การสร้างพันธะระหว่างกรดอะมิโนที่อยู่ห่างจากกัน และหมายถึงโครงรูปของสายพอลิเปปไทด์ทั้งสายซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างทุติยภูมิหลายส่วนรวมกัน

4. ระดับจตุรภูมิ (quaternary structure) การจับกันของสายพอลิเปปไทด์มากกว่าหนึ่งสาย หรือการประกอบกันของหน่วยย่อย (subunit)

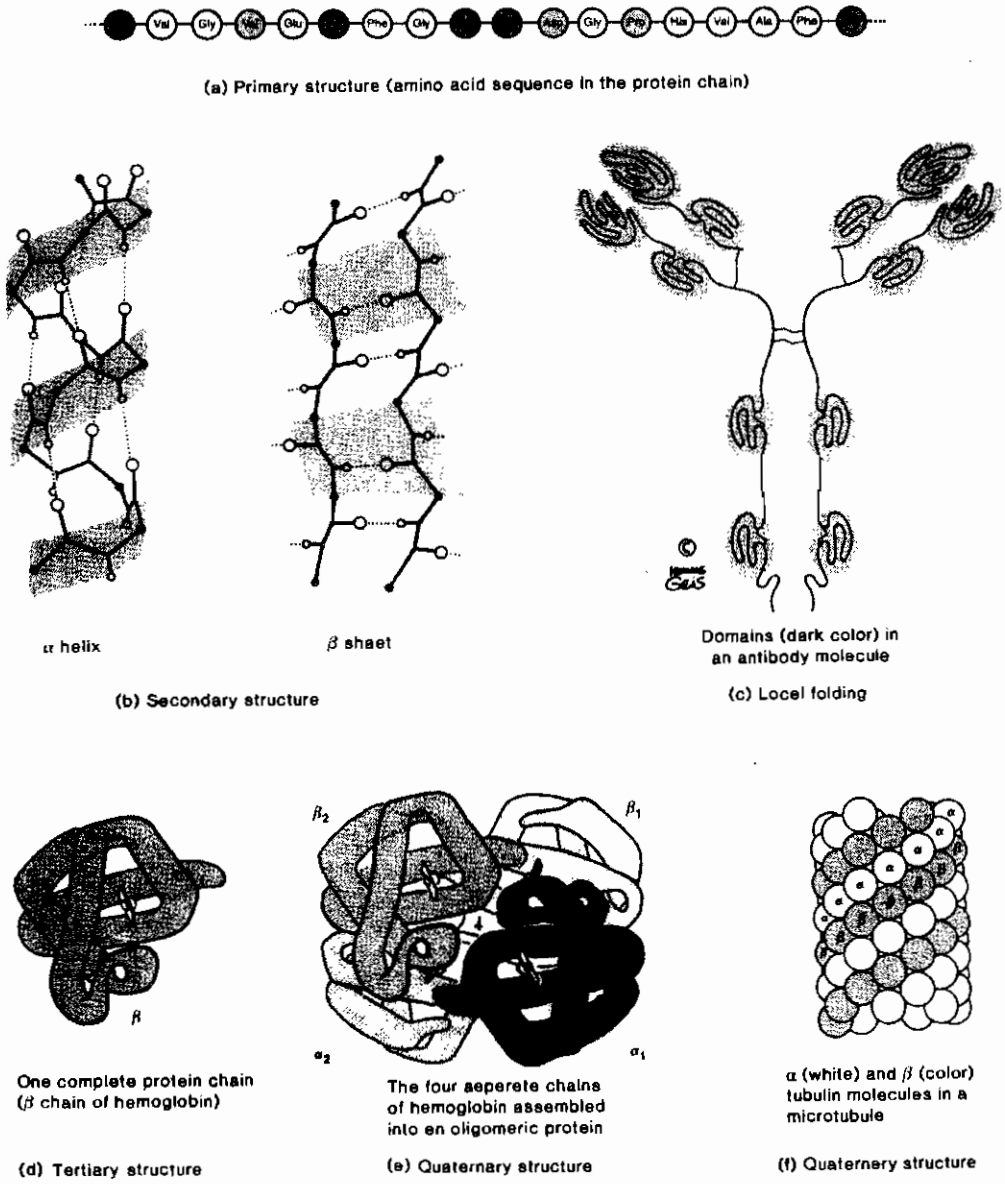
การละลายและการตกตะกอนโปรตีน

การละลายของโปรตีนเป็นผลมาจาก hydrophilic interaction ระหว่างหมู่ที่แตกตัวได้ของโปรตีนกับโมเลกุลของน้ำ ที่สภาวะ pH = pI โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ โปรตีนจึงตกตะกอน โปรตีนแต่ละชนิดมีค่า pI ต่างกัน

สารเคมีที่มีผลต่อ ionic strength และ dielectric constant จะมีผลต่อการละลายของโปรตีน เช่น เกลือ เอทานอล หรืออะซิโตน

การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อ ionic strength ในสภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ การละลายของเกลือทำให้เกิดประจุ ประจุในสารละลายจึงไปจับกับโมเลกุลของโปรตีน ทำให้โปรตีนมีค่าการละลายเพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า salting-in แต่ในสภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น เกลือจะไปดึงโมเลกุลของน้ำออกจากโปรตีน ทำให้โปรตีนรวมตัวกันตกตะกอน ปรากฏการณ์นี้เรียก salting–out

สามารถตกตะกอนโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นของเกลือแตกต่างกัน เกลือที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีน คือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] เนื่องจากไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ ละลายน้ำได้ดี ราคาไม่แพง และอาจใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการตกตะกอน



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของโปรตีน

การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

1. อุณหภูมิสูง สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนส่วนใหญ่ จึงควรรักษาโปรตีนในอุณหภูมิที่เหมาะสม การใช้อุณหภูมิสูงมีประโยชน์ในการแยกโปรตีนบางชนิด คือ กรณีที่โปรตีนที่ต้องการสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ ในขณะที่โปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ เสียสภาพที่อุณหภูมิสูง

2. เอนไซม์โปรติเอส หรือเอนไซม์อื่นที่ย่อยพันธะเปปไทด์ จึงควรใช้สภาวะที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรติเอส เช่น ใช้อุณหภูมิต่ำ การปรับ pH ที่ทำให้ pH นั้นไม่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอส หรือการเติมสารเพื่อยับยั้งการทำงานของโปรติเอส

3. โปรตีนสูญเสียสภาพได้ง่ายเมื่อมีความเข้มข้นต่ำ จึงควรเก็บโปรตีนโดยให้มีความเข้มข้นที่สูง

4. อากาศ พยายามไม่เขย่าสารละลายโปรตีน เพราะจะทำให้เกิดฟองอากาศในสารละลายโปรตีนซึ่งทำให้โปรตีนเสียสภาพได้

จุดมุ่งหมายในการแยกโปรตีน

ในการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่ง มีความจำเป็นต้องแยกโปรตีนนั้นออกมาจากสารอื่นๆ ก่อน เทคนิคการแยกขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของโปรตีนนั้น และความแตกต่างระหว่างคุณสมบัติของโปรตีนที่ต้องการแยกกับสารชนิดอื่นที่ผสมกัน เมื่อทำการแยกโปรตีนควรตอบคำถามในประเด็นต่างๆ ดังนี้

- ต้องการแยกโปรตีนเพื่อนำไปทำอะไร
- ต้องการโปรตีนปริมาณเท่าใด
- ต้องการโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด
- ต้องการให้อยู่ในสภาพธรรมชาติหรือไม่
- โปรตีนนั้นอยู่ส่วนใดของเนื้อเยื่อ เช่น อยู่ภายในเซลล์ (intracellular) อยู่นอกเซลล์ (intercellular) ถ้าโปรตีนอยู่นอกเซลล์การแยกจะทำได้ง่าย ในกรณีที่โปรตีนอยู่ภายในเซลล์ต้องพิจารณาว่าอยู่ส่วนใดของเซลล์ เช่น อยู่ในไซโตพลาสซึม อยู่ในออร์กาเนล หรือจับอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์

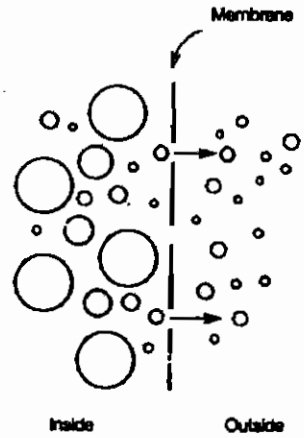
วิธีการแยกโปรตีน

การเลือกใช้วิธีใดในการแยกสารนั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสาร ดังตารางที่ 2.2 ทั้งนี้ต้องพิจารณาความแตกต่างระหว่างสารที่ต้องการกับสารปนเปื้อนอื่นๆ จุดมุ่งหมายของการแยก การเสียค่าใช้จ่ายและเวลาในการแยก การแยกโปรตีนให้มีคุณภาพที่ดีอาจต้องใช้หลายวิธีประกอบกัน

ตารางที่ 2.2 วิธีการแยกสารตามคุณสมบัติ

คุณสมบัติของสาร	วิธีการแยก
ประจุ	โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน อิเล็กโทรโฟรีซิส ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง
สภาพขั้ว	โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ โครมาโทกราฟีแบบกระดาษ
ขนาด	ไดอะไลซิส การกรองแบบ ultrafiltration การเซนตริฟิวจ์ โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
ความจำเพาะทางชีวภาพ	โครมาโทกราฟีแบบแอฟฟินิตี

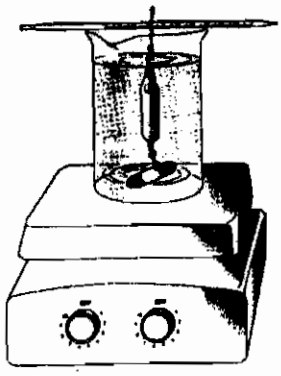
ไดอะไลซิส (dialysis) การแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาด โดยใช้เมมเบรนที่มีรูพรุนขนาดเล็กที่มีลักษณะเป็นเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) โครงสร้างของเมมเบรนเป็นเซลลูโลสอะซิเทต (cellulose acetate) เรียก เซลโลเฟน (cellophan) หรือเป็นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) สารที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเมมเบรนจะผ่านออกมาโดยอาศัยหลักการแพร่ ในขณะที่สารขนาดใหญ่ยังคงอยู่ภายในเมมเบรน ดังรูปที่ 2.2 ใช้วิธีไดอะไลซิสในการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกจากโปรตีน หรือเมื่อต้องการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่โปรตีนนั้นละลายอยู่



รูปที่ 2.2 การทำไดอะไลซิสเกิดการแพร่ของโมเลกุลขนาดเล็กผ่านรูพรุนของเมมเบรน

การผลิตเมมเบรนทางการค้าจะผลิตให้มีลักษณะเป็นหลอด (tube) ที่มีปลายเปิดทั้ง 2 ด้าน เมื่อทำไดอะไลซิสจะบรรจุสารไว้ในหลอดที่ผูกปลายด้านหนึ่งไว้ หลังจากบรรจุสารจึงปิดปลายอีกด้าน จากนั้นนำไปใส่ในภาชนะที่มีบัฟเฟอร์ ควรคนสารละลายในภาชนะตลอดเวลาโดยใช้เครื่อง magnetic stirrer ดังรูปที่ 2.3 และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 3-4 ชั่วโมง

ขนาดรูพรุนของเมมเบรนที่เลือกใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนที่ต้องการแยก เช่น ถ้าต้องการแยกโปรตีนขนาด 50,000 ดาลตัน ออกจากโปรตีนปนเปื้อนที่มีขนาด 5,000 ดาลตัน สามารถเลือกใช้เมมเบรนชนิด MW cut-off เป็น 10,000 ซึ่งเมมเบรนนี้จะยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10,000 ดาลตัน ผ่านรูพรุนออกมาได้



รูปที่ 2.3 การจัดอุปกรณ์ในการทำไดอะไลซิส

การกรองแบบ ultrafiltration เป็นการกรองผ่านรูพรุนขนาดเล็ก ขนาดของรูพรุนมีหน่วยเป็นไมโครเมตร

การเซนตริฟิวจ์ (centrifugation) เป็นการตกตะกอนสารออกจากสารละลายภายใต้แรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง สารจะแยกออกจากกันตามขนาด รูปร่าง และความหนาแน่น สามารถแยกโปรตีนที่มีลักษณะแตกต่างกันออกจากกันได้

โครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นเทคนิคการแยกสารซึ่งอาศัยความแตกต่างในการยึดกับส่วนคงที่ (stationary phase) และส่วนเคลื่อนที่ (mobile phase) โมเลกุลที่ยึดกับส่วนคงที่ได้ดีจะถูกชะออกมาภายหลัง ขนาด รูปร่าง ประจุ และลักษณะทางชีวภาพมีผลต่อการแยกโปรตีนด้วยวิธีโครมาโทกราฟี

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้า โปรตีนซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีประจุสามารถนำมาแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวัดผลการแยกโปรตีน

การหาวิธีทดสอบโปรตีนในขั้นตอนการแยกมีความสำคัญในการหาความบริสุทธิ์ของโปรตีน เช่น โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ วัดจากผลของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรทหรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรทมาทดสอบ แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี หรือในกรณีที่โปรตีนบางชนิดมีสีที่สังเกตได้ เช่น สีของฮีมในโครงสร้างของไมโอโกลบิน ทำให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นขณะทำการแยกได้ โปรตีนที่แสดงสมบัติทางชีววิทยา เช่น การจับกันอย่างจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี หรือผลของฮอร์โมนต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อ สามารถวัดผลการแยกจากคุณสมบัติของโปรตีนที่ต้องการ

การใช้วิธีสเปกโทรโฟโทมิตรี เช่น การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของกรดอะมิโนชนิด aromatic amino acids (Phe, Tyr และ Trp) ซึ่งพบในโครงสร้างของโปรตีน สำหรับวิเคราะห์โปรตีนขณะทำการแยก เพื่อเป็นการบอกข้อมูลเบื้องต้น และบางครั้งมีความจำเป็นต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีเพื่อวิเคราะห์ผลการแยก

การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนในสารละลายมีความสำคัญสำหรับการทดลอง เช่น ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ โดยการเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ที่ต้องการกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดเพื่อหาค่าแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน นั่นคือเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้นจะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงขึ้น

หลักการในการหาปริมาณโปรตีนโดยทั่วไปจะใช้โปรตีนมาตรฐาน เช่น bovine serum albumin (BSA) ซึ่งทราบความเข้มข้น เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง โดยนำสารละลายโปรตีนมาทำปฏิกิริยาให้เกิดสารที่มีสี แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้จากโปรตีนมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐาน แล้วหาปริมาณโปรตีนตัวอย่างจากกราฟ สารที่มีผลกระทบต่อการเกิดปฏิกิริยาในการเกิดสีของโปรตีน เช่น เกลือ, คาร์โบไฮเดรท, กรดนิวคลีอิก, ลิปิด, อนุพันธ์ของสารเอมีน หรืออนุพันธ์ของซัลไฮดริล เป็นต้น ดังนั้นต้องหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของสารเหล่านี้ในขั้นตอนการหาปริมาณโปรตีน

การเลือกวิธีการหาปริมาณโปรตีนพยายามเลือกจากวิธีที่ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง มีความถูกต้องสูง และเหมาะสมกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ วิธีการหาโปรตีนที่นิยมคือ 1) วิธีวัดการดูดกลืนแสง 2) วิธี Colorimetric ได้แก่ วิธีไบยูเร็ต, Lowry method, Bradford mothod และ BCA เป็นต้น 3) วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน (amino acid analysis) ในกรณีที่โปรตีนมีปริมาณน้อยมาก ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายมากขึ้น โดยหาปริมาณโปรตีนจากปริมาณกรดอะมิโนที่ประกอบเป็นโครงสร้างของโปรตีน โดยทำการย่อยโปรตีนด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรด (acid hydrolysis) แล้วหาปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ ซึ่งใช้เวลาทำการทดลองประมาณ 2 วัน 4) วิธีหาจากน้ำหนักแห้งของโปรตีน (dry weight) โดยทำไดอะไลซิสแยกโปรตีน ทำการตรึงโปรตีนบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน และวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งของโปรตีน

การทดลองที่ 2.1

คุณสมบัติในการละลายของโปรตีน

การทดลองเพื่อศึกษาคุณสมบัติในการละลายของโปรตีน รวมทั้งสภาวะที่ทำให้โปรตีนละลายได้น้อยลง และตกตะกอนในที่สุด โดยการใช้ความร้อน เกลือ และการปรับ pH ของสารละลายโปรตีน

อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมี

สารละลายโปรตีน casein, egg albumin, vitellin, myosin และ globulin

saturated ammonium sulphate ใน phosphate buffer

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตต์สารละลายโปรตีนแต่ละชนิดมา 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง นำไปใส่ในน้ำร้อน สังเกตการเปลี่ยนแปลง

2. นำสารละลายโปรตีน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาตร 5 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน สังเกตว่าโปรตีนชนิดใดบ้างที่ตกตะกอน บันทึกผลลงในตาราง

3. การตกตะกอนโปรตีนที่ค่า pI (isoelectric precipitation) เริ่มศึกษาจากโปรตีนเคซีน โดยนำสารละลายเคซีนในสภาวะเบสปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาเติม 0.10 N HCl ทีละหยด เขย่าทุกครั้งที่เติม HCl เติมจนกระทั่งเคซีนตกตะกอนได้มากที่สุด จากนั้นเติม 0.10 N HCl ต่อไปทีละหยด จนเคซีนละลายหมด จึงเติม 0.1 N NaOH ทีละหยด จนเคซีนตกตะกอนอีกครั้ง ทำการทดลองกับโปรตีนชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงลงในตาราง

ตาราง บันทึกผลการทดสอบโปรตีน

ชนิดของโปรตีน	การใช้ความร้อน (heat denaturation)	การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$	การตกตะกอนที่ค่า pI
casein			
egg albumin			
vitellin			
myosin			
globulin			

คำถาม

1. ความร้อนมีผลเช่นไรกับโปรตีน

.....

.....

.....

2. เหตุใดโปรตีนแต่ละชนิดจึงใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อตกตะกอนโปรตีนไม่เท่ากัน

.....

.....

.....

3. pH ของสารละลายมีผลต่อโปรตีนอย่างไร

.....

.....

.....

การทดลองที่ 2.2

การแยกโปรตีน

1. การแยกเคซีนจากนม

เคซีนเป็นโปรตีนที่มีหมู่ฟอสเฟต (phosphoprotein) พบในน้ำนม เคซีนมี 4 ชนิด คือ อัลฟาเคซีน (alpha casein), เบต้าเคซีน (beta casein), แกมมาเคซีน (gamma casein) และแคปปาเคซีน (kappa casein) เคซีนทำให้นมมีลักษณะเป็นไมเซลล์ สามารถแยกเคซีนโดยวิธีการตกตะกอนโปรตีน

แสดงลักษณะไมเซลล์ของเคซีน

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

Büchner funnel

กระดาษกรอง

สารเคมี

นมสด

เอทานอล

อีเทอร์

2% HCl

1% $AgNO_3$

วิธีการทดลอง

1. นำนมสดปริมาตร 0.5 ลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1. 5 ลิตร ผสมให้เข้ากัน และตั้งไว้ 30 นาที

2. แบ่งนมที่เจือจางไว้แล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำมาปรับ pH ของนมให้เป็น 4.8 ด้วย 2% HCl คนตลอดเวลาเป็นเวลา 10 นาที ตั้งไว้ 30 นาที เมื่อนมตกตะกอนให้เทส่วนใสทิ้ง

3. นำตะกอนมาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เมื่อตั้งให้ตกตะกอนจึงเทส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนเช่นนี้อีกครั้ง

4. กรองตะกอนเคซีนด้วยกรวย Büchner ซึ่งมีกระดาษกรองหนา 3 ชั้น

5. ล้างตะกอนหลายๆ ครั้งด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 150 มิลลิลิตร กรองและทดสอบส่วนสารละลายที่ได้ว่าไม่มีไอออนของคลอไรด์ (ทดสอบด้วย 1% $AgNO_3$) เก็บตะกอนเคซีนใส่ในบีกเกอร์

6. ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 75 มิลลิลิตร คนและตั้งไว้ 15 นาที รินเอทานอลทิ้ง

7. ล้างตะกอนด้วยเอทานอลและอีเทอร์ (1:1) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร คนและกรองโดยเร็วด้วยกรวย Büchner

8. นำตะกอนเคซีนที่ได้มากระจายบนกระดาษกรอง อบที่อุณหภูมิ 40-45 °C จนตะกอนแห้ง

2. การแยกอัลบูมินจากไข่

อัลบูมินเป็นโปรตีนที่พบมากในไข่ขาว (ปริมาณ 64% ของโปรตีนทั้งหมดในไข่ขาว) นิยมเรียกว่า ovalbumin มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45000

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดเซนตริฟิวจ์

เครื่องเซนตริฟิวจ์

สารเคมี

1 N acetic acid

saturated ammonium sulfate ใน phosphate buffer

วิธีการทดลอง

1. ตอกไข่ไก่ 1 ฟอง แยกไข่ขาวออกจากไข่แดง นำไข่ขาวมาวัดปริมาตร บันทึกผล

2. เติม 1 N acetic acid ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรไข่ขาว ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านผ้าขาวบาง

3. เติมบัฟเฟอร์ที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเติมทีละเล็กน้อย และคนตลอดเวลาจนเกิดความขุ่น และเมื่อเริ่มมีตะกอนจึงหยุดทันที คนสารอีกประมาณ 5 นาที นำสารที่ได้ใส่ในตู้เย็น 2 – 5 วัน จะเกิดผลึกอัลบูมิน เก็บผลึกที่ได้โดยการนำไปเซนตริฟิวจ์

คำถาม

1. จงอธิบายถึงหลักการในการแยกเคซีนออกจากนม

.....

.....

.....

2. จงอธิบายถึงสาเหตุที่ทำให้อัลบูมินตกตะกอน

.....

.....

.....

การทดลองที่ 2.3

การหาปริมาณโปรตีน

1. วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV absorption methods)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต สามารถทำได้ดังนี้

1.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280}) เนื่องจากโปรตีนดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วิธีนี้เหมาะสมสำหรับโปรตีนที่มีปริมาณ 20 ถึง 3000 ไมโครกรัม ผลการวัดนำมาคำนวณโดยเปรียบเทียบจากค่ามาตรฐาน คือ โปรตีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า A_{280} เท่ากับ 1.0 เมื่อใช้คิวเวตต์ 1 เซนติเมตร

1.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร (A_{205}) วิธีนี้ใช้หาปริมาณโปรตีนที่มีค่าอยู่ระหว่าง 1 ถึง 100 ไมโครกรัม ผลการวัด A_{205} ของโปรตีนตัวอย่างจะนำมาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน คือ โปรตีนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า A_{205} เท่ากับ 31

1.3 การวัดค่า A_{280} เปรียบเทียบกับ A_{260} ใช้ในกรณีที่สารละลายนั้นมีกรดนิวคลีอิกปนอยู่ กรดนิวคลีอิกดูดกลืนแสงได้ดีที่ 260 นาโนเมตร การหาปริมาณโปรตีนคำนวณจากสมการ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (mg/ml)} = 1.55\ A_{280} - 0.76\ A_{260}$$

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดคิวเวตต์ (ควอทซ์)

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

สารละลายโปรตีนตัวอย่าง

วิธีการทดลอง

1. เปิดเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ปรับเครื่องให้พร้อมใช้งาน ปรับความยาวคลื่นที่เครื่องเป็น 280 นาโนเมตร (เปิดเครื่องไว้ประมาณ 15 นาที)

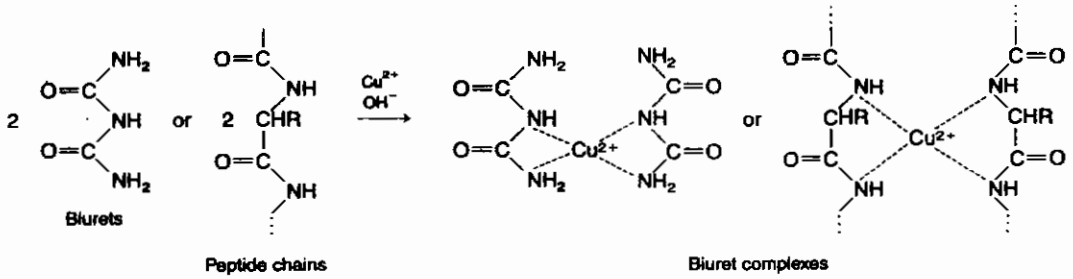
2. นำน้ำกลั่นใส่หลอดคิวเวตต์ประมาณ 3 ใน 4 ของหลอด ใส่หลอดคิวเวตต์เข้าเครื่อง ปรับเครื่องให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์

3. ใส่สารละลายโปรตีนตัวอย่างลงในหลอดคิวเวตต์ อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

4. ทำการทดลองชุดอื่นโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 205 และ 260 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณโปรตีน

2. วิธีไบยูเร็ต (biuret method)

ในสภาวะเบส คอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) สามารถจับกับสารที่มีพันธะเปปไทด์ตั้งแต่2พันธะขึ้นไปแล้วให้สารเชิงซ้อนดังรูป สารเชิงซ้อนมีสีน้ำเงินม่วง มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร วิธีไบยูเร็ตมีสารรบกวนค่อนข้างน้อย สารที่รบกวน เช่น เกลือแอมโมเนียม



อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดคิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

bovine serum albumin	10	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

2. สารละลายไบยูเร็ต

copper sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	1.5	กรัม
sodium potassium tartrate	6	กรัม
10% NaOH	300	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

เติม potassium iodide 1 กรัม เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของคอปเปอร์

วิธีการทดลอง

1. ปิเปตต์น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร และปิเปตต์สารละลายโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายไบยูเร็ต 2.5 มิลลิลิตร ใส่แต่ละหลอด ตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

3. วิธี Lowry

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry เป็นวิธีที่ทำการทดลองในสภาวะเบส ซึ่งคอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}) จะเข้าจับกับโปรตีน เมื่อเติมสารละลายสีเหลืองของ Folin-phenol reagent หรือเรียก Folin – Ciocalteu reagent (phospho–molybdic–phosphotungstic) สารนี้

จะเข้าจับกับสารเชิงซ้อนของโปรตีนกับคอปเปอร์ ซึ่งสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีฟ้า สามารถหาปริมาณโปรตีนที่มีปริมาณน้อยตั้งแต่ 5 ไมโครกรัม

เนื่องจากโปรตีนแต่ละชนิดเมื่อทำปฏิกิริยาแล้ว จะให้สีที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกโปรตีนมาตรฐาน ควรเลือกโปรตีนที่มีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับโปรตีนตัวอย่าง เช่น การหาปริมาณโปรตีนในเลือด ควรใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน เพราะอัลบูมินเป็นโปรตีนที่พบมากในซีรัม

วิธี Lowry อาจถูกรบกวนได้โดยสารหลายๆ ชนิด เช่น ฟีนอล ซีเซียมคลอไรด์ (cesium chloride), ซิเทรต (citrate), ซิสเทอีน (cysteine), diethanolamine, dithiothreitol, EDTA, EGTA, CAPS หรือ Tris เป็นต้น

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดคิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

4% sodium carbonate (Na_2CO_3)

0.2 M NaOH

2% sodium potassium tartrate ($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)

1% copper sulfate ($CuSO_4$)

Lowry reagent (copper-alkali reagent)

4% sodium carbonate	49	มิลลิลิตร
0.2 M NaOH	49	มิลลิลิตร
1% copper sulfate	1	มิลลิลิตร
2% sodium potassium tartrate	1	มิลลิลิตร

Folin phenol reagent

Folin-Ciocalteu	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

BSA (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยปิเปตต์สารละลาย BSA ปริมาตรดังตาราง และปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. ปิเปตต์สารละลาย Lowry reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

4. นำแต่ละหลอดมาเติมสาร Folin phenol reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

5. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

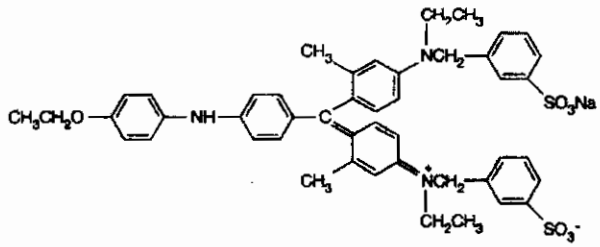
ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐานเมื่อทดสอบด้วยวิธี Lowry

หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8
ปริมาตร BSA (μl)	0	10	20	30	40	50	75	100
ปริมาณ BSA (μg)								
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm								

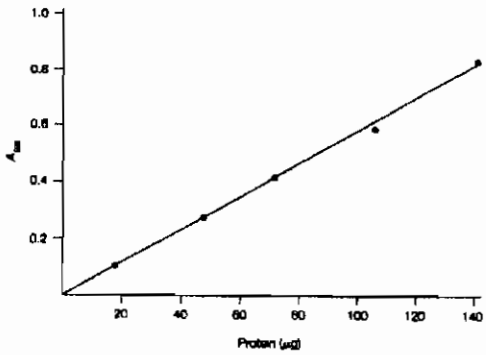
4. วิธี Bradford

ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาใกล้เคียงกับวิธี Lowry แต่ทำได้สะดวกและรวดเร็วกว่า คือใช้รีเอเจนท์เพียง 1 ชนิด ใช้เวลาบ่มประมาณ 5 นาที มีความไว (sensitivity) ในการทำปฏิกิริยาที่ดี คือให้ผลกับโปรตีนที่มีปริมาณเพียง 20–200 ไมโครกรัม และมีผลการรบกวนของสารชนิดอื่นน้อย

เมื่อนำ Coomassie Brilliant Blue G-250 โครงสร้างดังรูป มาละลายในสารละลายกรดจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร เมื่อ Coomassie Brilliant Blue G-250 จับกับโปรตีนจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดมาอยู่ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร



โครงสร้างของ Coomassie Brilliant Blue G-250



กราฟมาตรฐานของโปรตีน bovine gamma globulin ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดคิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

Bradford reagent

Coomassie Brilliant Blue G-250	100	มิลลิกรัม
95% เอทานอล	50	มิลลิลิตร
85% กรดฟอสฟอริก	100	มิลลิลิตร

ผสมและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยปิเปตต์ BSA ปริมาตรต่างๆ ดังตาราง และปรับปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตต์สารละลายโปรตีนใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร

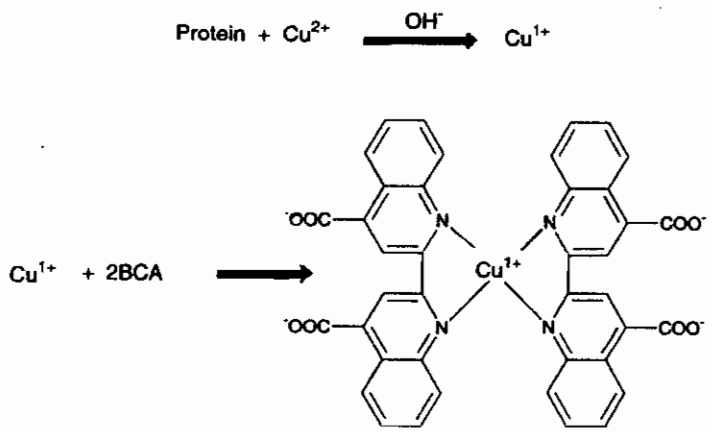
3. ปิเปตต์สารละลาย 1 M NaOH ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้ทุกหลอด เติม Bradford reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมและบ่มเป็นเวลา 5 นาที นำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐานเมื่อทดสอบด้วยวิธี Bradford

หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7	8
ปริมาตร BSA (μl)	0	10	20	30	40	50	75	100
ปริมาตร BSA (μ_g)								
ค่าการดูดกลืนแสง								

4. วิธี BCA (BCA method)

การหาปริมาณโปรตีน BCA มีหลักการคล้ายกับวิธีไบยูเร็ตและวิธี Lowry โปรตีนที่ทำการวิเคราะห์จะเข้าทำปฏิกิริยากับ Cu^{2+} จึงเปลี่ยน Cu^{2+} เป็น Cu^{+} เมื่อ Cu^{+} เข้าทำปฏิกิริยากับ bicinchoninic acid (BCA) ดังรูป เกิดผลิตภัณฑ์สีม่วงของ copper–BCA complex ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 560 นาโนเมตร ความว่องไวในการทดสอบใกล้เคียงกับวิธี Lowry และ Bradford วิธีนี้ทำได้สะดวกและใช้ทดสอบได้ในสภาวะที่มี 1% Triton และ SDS



การทำปฏิกิริยา BCA

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

หลอดคิวเวตต์

เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

สารเคมี

BCA solution 1

sodium bicinchoninic acid (BCA)	1%
$Na_2CO_3 \cdot H_2O$	2%
sodium tartrate	0.16%
NaOH	0.4%
$NaHCO_3$	0.95%

ปรับ pH ด้วย sodium bicarbonate ให้ได้ pH = 11.25

BCA solution 2

copper sulfate $\cdot 5H_2O$	4%

BCA working reagent

ผสม BCA solution1 50 มิลลิลิตร กับ BCA solution2 1 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้มีความเข้มข้นระหว่าง 20–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตต์ใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร

2. นำหลอดทดลองมาปิเปตต์สารละลายโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลาย BCA working reagent ใส่ในสารละลายโปรตีนแต่ละหลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C 30 นาที

4. นำสารละลายแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร