6 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

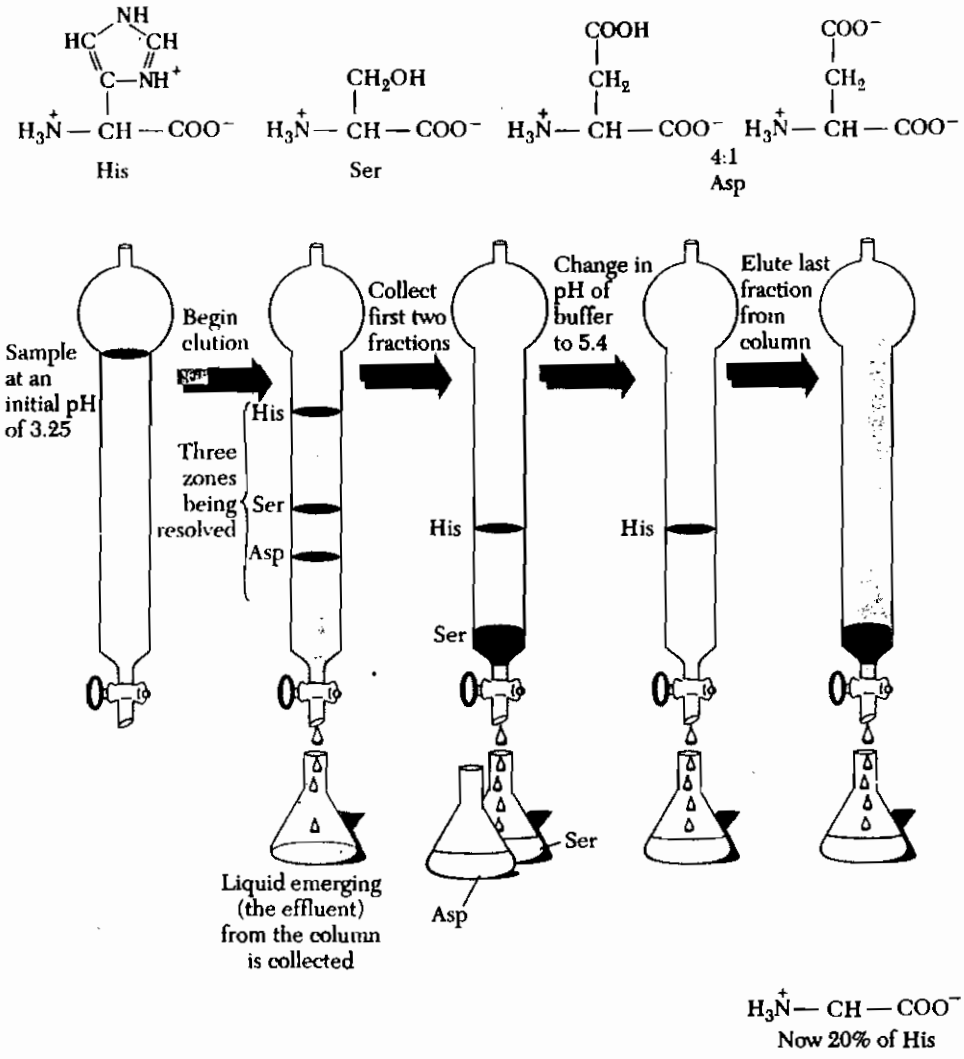
- ❑บทนำ
- ❑สมบัติของตัวแลกเปลี่ยนไอออน
- ❑การเลือกใช้บัฟเฟอร์
- ❑การวิเคราะห์สารที่ได้จากคอลัมน์

บทนำ

โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยประจุบนโมเลกุลของสาร ส่วนคงที่ซึ่งบรรจุในคอลัมน์คือตัวกลางที่เรียกว่า ตัวแลกเปลี่ยนไอออน (ion–exchanger) สารจะถูกดูดซับกับตัวแลกเปลี่ยนไอออนแบบผันกลับได้ ตัวแลกเปลี่ยนไอออนมีประจุอยู่บริเวณพื้นผิว ดังนั้นสารจะถูกยึดหรือปล่อยออกมาได้โดยการเปลี่ยนสภาวะของไอออนในระบบ ดังรูปที่ 6.1

ขั้นตอนหลักในการแยกสารแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. สารที่ต้องการแยกจะถูกทำให้ยึดกับตัวแลกเปลี่ยนไอออนด้วยประจุตรงกันข้าม
2. ทำการชะสารด้วยบัฟเฟอร์ที่มี pH หรือ ionic strength ต่างๆ ไอออนที่อยู่ในบัฟเฟอร์ซึ่งสามารถยึดกับตัวแลกเปลี่ยนไอออนได้ดีกว่าสาร จะไปแย่งที่และยึดอยู่กับตัวแลกเปลี่ยนไอออนแทน ทำให้สารนั้นหลุดออกมา สารที่ยึดกับตัวแลกเปลี่ยนไอออนด้วยแรงอ่อนๆ จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ก่อนสารที่ยึดกับตัวแลกเปลี่ยนไอออนด้วยแรงที่มากกว่า



รูปที่ 6.1 การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนเพื่อแยกกรดอะมิโน

สมบัติของตัวแลกเปลี่ยนไอออน

ตัวแลกเปลี่ยนไอออนเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ ที่ต่ออยู่กับหมู่ที่มีประจุด้วยพันธะโควาเลนท์ สารประกอบพอลิเมอร์ได้แก่ เด็กซ์แทรน (ชื่อทางการค้าคือ Sephadex) เซลลูโลส อะกาโรส (ชื่อทางการค้าคือ Sepharose) พอลิอะคริลาไมด์ (ชื่อทางการค้าคือ Bio–Gel) หรือโคพอลิเมอร์ของสไตรีนและไวนิลเบนซิน เป็นต้น สารประกอบพอลิเมอร์ทำหน้าที่เป็นตัวกลางที่ไม่ละลายน้ำและมีลักษณะเฉื่อย หมู่ที่มีประจุที่มาต่อกับตัวกลางอาจเป็นประจุบวกหรือประจุลบ ดังนั้นสามารถแบ่งตัวแลกเปลี่ยนไอออนได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. ตัวแลกเปลี่ยนไอออนลบ (anion exchanger)

หมู่ที่มาต่อกับตัวกลางมีประจุบวก ใช้ในการแลกเปลี่ยนไอออนลบ หมู่ที่ใช้เป็นตัวแลกเปลี่ยนไอออนลบโดยทั่วๆ ไปได้แก่ quaternary amino group ซึ่งทำให้ตัวแลกเปลี่ยนไอออนเป็นพวก strongly basic anion exchanger และหมู่อะโรมาติกหรือหมู่อะลิฟาติกอะมิโน (aromatic or aliphatic amino group) ซึ่งทำให้ตัวแลกเปลี่ยนไอออน เป็นพวก weakly basic anion exchanger ดังตารางที่ 6.1

2. ตัวแลกเปลี่ยนไอออนบวก (cation exchanger)

หมู่ที่มาต่อกับตัวกลางมีประจุลบ ใช้ในการแลกเปลี่ยนไอออนบวก หมู่ที่ใช้ยึดติดกับตัวกลาง ได้แก่ หมู่ซัลโฟนิก (sulfonic group) และหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ดังตารางที่ 6.1

การเลือกใช้บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออนของระบบ เพราะค่า pH และ ionic strength (μ) ของบัฟเฟอร์มีผลต่อประจุของสาร สารที่มีประจุตรงข้ามกับหมู่ที่มีประจุของตัวแลกเปลี่ยนไอออน จะเข้าจับกับตัวแลกเปลี่ยนไอออน ดังนั้นในระบบโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ให้เหมาะสมกับชนิดของตัวแลกเปลี่ยนไอออน ในขั้นตอนเริ่มต้นจะเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH และ μ ที่ทำให้สารที่ต้องการเท่านั้นมีประจุสุทธิ

ตารางที่ 6.1 หมู่ที่อยู่บนตัวแลกเปลี่ยนไอออน

โครงสร้าง	ชื่อ	ตัวอักษรย่อ
Strong anion		
$-CH_2N^+(CH_3)_3$	trimethylaminoethyl	TAM
$-C_2H_4N^+(C_2H_5)_3$	triethylaminoethyl	TEAE
$-C_2H_4N^+(C_2H_5)_2CH_2-CH(OH)CH_3$	diethyl–2–hydroxypropylamino–ethyl	QAE
Weak anion		
$-C_2H_4N^+H_3$	aminoethyl	AE
$-C_2H_4N^+H(C_2H_5)_2$	diethylaminoethyl	DEAE
Strong cation		
$-SO_3$	sulpho	S
$-CH_2SO_3$	sulphomethyl	SM
$-C_3H_6SO_3$	sulphopropyl	SP
Weak cation		
$-COO^-_3$	carboxy	C
$-CH_2COO^-$	carboxymethyl	CM

ตรงกันข้ามกับตัวแลกเปลี่ยนไอออน จึงจับอยู่กับตัวแลกเปลี่ยนไอออนในขณะที่สารอื่นๆ ที่มีประจุสุทธิเช่นเดียวกับตัวแลกเปลี่ยนไอออนถูกชะออกจากคอลัมน์ ในกรณีที่ใช้ตัวแลกเปลี่ยนไอออนลบ บัฟเฟอร์เริ่มต้นควรมี pH ที่สูงกว่า pI ของสารที่ต้องการแยก และเมื่อใช้ตัวแลกเปลี่ยนไอออนบวก บัฟเฟอร์เริ่มต้นควรมี pH ต่ำกว่า pI ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่า μ ของบัฟเฟอร์สามารถทำโดยการปรับความเข้มข้นของเกลือที่เติมลงในบัฟเฟอร์ เนื่องจาก μ แปรผันตามความเข้มข้นของเกลือ และประจุของเกลือ

วิธีการคำนวณค่า μ คือ

$$\mu = \frac{1}{2} \Sigma M_i Z_i^2$$

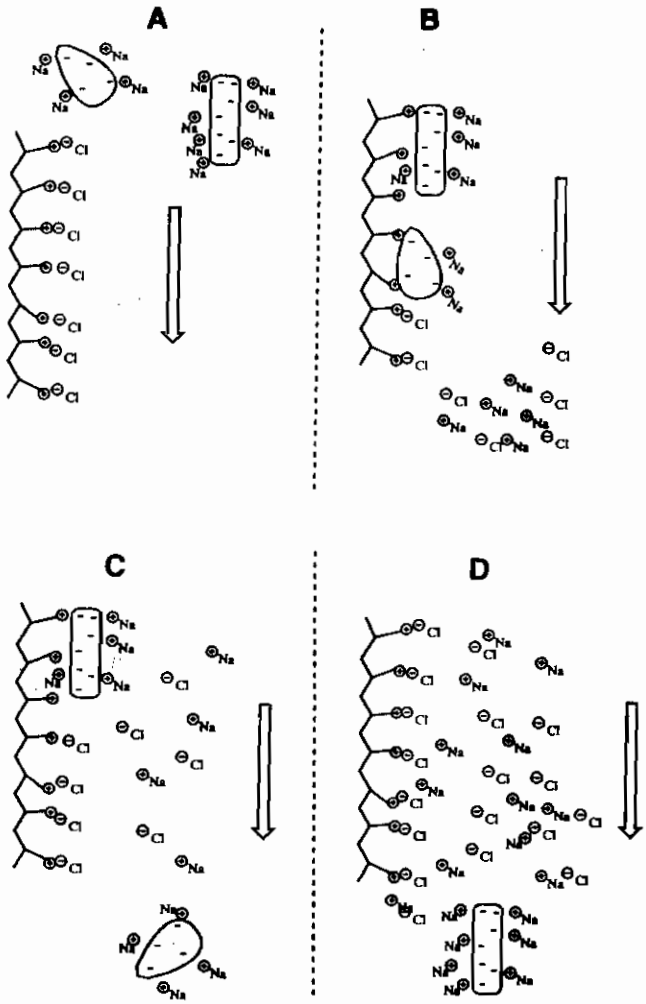
เมื่อ Mi คือความเข้มข้นของเกลือ (หน่วยเป็นโมลาร์)

Zi คือประจุของเกลือ

การแยกกรดอะมิโนหรือโปรตีนโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนจะพิจารณาถึงค่า isoelectric point (pI) ของสารนั้น และปรับ pH ของบัฟเฟอร์และความเข้มข้นของเกลือให้เหมาะสม เพื่อแยกสารที่ต้องการออกจากสารเจือปนอื่นๆ ดังรูปที่ 6.2 แสดงการแลกเปลี่ยนไอออนในระบบคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยมีตัวแลกเปลี่ยนไอออนชนิด anion exchanger บรรจุอยู่ในคอลัมน์ และทำการปรับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพื่อแยกโปรตีนที่ต้องการ

การวิเคราะห์สารที่ได้จากคอลัมน์

เมื่อทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนเพื่อแยกสารผสมออกจากกันนั้น สารบางชนิดจะถูกชะจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ ส่วนสารอื่นยังคงติดอยู่ในคอลัมน์ การชะคอลัมน์ใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH หรือความเข้มข้นของเกลือที่เปลี่ยนไป หลังจากได้สารที่ออกมาจากคอลัมน์ในแต่ละส่วน (fraction) จึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป เช่น การวิเคราะห์กรดอะมิโนเมื่อทำการแยกได้จากคอลัมน์ สามารถวิเคราะห์โดยปฏิกิริยาที่เกิดสีและวัดปริมาณด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีคือ การทำปฏิกิริยากับนินไฮดริน (ninhydrin) ซึ่งให้สีน้ำเงินม่วงกับกรดอะมิโน (ยกเว้นโพรลีนซึ่งให้สีเหลือง) หรือทำการวิเคราะห์เอนไซม์โดยใช้สับสเทรทของเอนไซม์นั้น เป็นต้น



รูปที่ 6.2 กระบวนการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน โดยใช้ตัวแลกเปลี่ยนไอออนลบบรรจุในคอลัมน์ (A) ปรับสภาวะของคอลัมน์ด้วยเกลือ NaCl ที่มีความเข้มข้นต่ำ (B) ใส่โปรตีนผสม 2 ชนิด ลงในคอลัมน์ โปรตีนทั้ง 2 ชนิด มีประจุลบซึ่งจับกับประจุบวกของตัวแลกเปลี่ยนไอออน (C) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ NaCl ทำให้ Cl^- แย่งจับกับตัวแลกเปลี่ยนไอออน จึงมีผลต่อโปรตีนชนิดที่มีความเป็นกรดน้อย ทำให้โปรตีนชนิดนั้นหลุดออกมาจากคอลัมน์ก่อน (D) เพิ่มความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อไป จึงมีผลทำให้โปรตีนอีกชนิดหนึ่งหลุดออกจากคอลัมน์

การทดลองที่ 6.1

การแยกกรดอะมิโนโดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

กรดอะมิโนมีค่า pI ที่แตกต่างกัน จึงเป็นประโยชน์ในการแยกกรดอะมิโนแต่ละชนิดออกจากกัน การทดลองนี้เป็นการแยกกรดอะมิโนที่ผสมออกจากกันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน โดยใช้เรซินชนิด Dowex 50

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

คอลัมน์

สายยาง

สารเคมี

เรซินชนิด Dowex 50

0.05 M citrate buffer pH 3.0 และ pH 6.0

0.05 M CAPS buffer pH 11.0

สารละลายผสมของกรดอะมิโน

สารละลายนินไฮดริน

กระดาษกรอง Whatman™ 3 MM ขนาด 3 × 10 เซนติเมตร

วิธีการทดลอง

1. ชั่ง Dowex 50 หนัก 30 กรัม ค่อยๆ เทลงใน 0.05 M citrate buffer pH 3.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. บรรจุ Dowex 50 ลงสู่คอลัมน์ ชะด้วย 0.05 M citrate buffer pH 3.0 โดยระวังอย่าให้คอลัมน์แห้ง

3. เมื่อพร้อมจะใส่สารตัวอย่างที่ต้องการแยก จึงปล่อยบัฟเฟอร์ให้อยู่เหนือส่วนบนของ Dowex 50 เพียงเล็กน้อย ใส่สารตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

4. เก็บสารละลายที่ไหลจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองที่ 1 โดยระวังอย่าให้คอลัมน์แห้ง ให้เติม 0.05 M citrate buffer pH 3.0 ครั้งละ 1 มิลลิลิตร

5. เก็บสารละลายที่ไหลจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ระหว่างนั้นให้ใช้หลอดหยดสารลงบนกระดาษกรอง 1 หยด สเปรย์ด้วยสารละลายนินไฮดริน และนำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 นาที สังเกตสีบนกระดาษกรอง

6. เก็บสารละลายจนสังเกตเห็นสีบนกระดาษกรองเป็นสีม่วงเข้ม และเก็บต่อไปจนสีม่วงหายไป จากนั้นให้เปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็น 0.05 M citrate buffer pH 6.0 เก็บสารจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร และทดสอบกับนินไฮดรินเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 5 และขั้นสุดท้ายให้ใช้ CAPS buffer pH 11.0

คำถาม

จากการทดลองสามารถแยกกรดอะมิโนได้กี่ชนิด แต่ละชนิดมี pI แตกต่างกันอย่างไร

.....

.....

.....

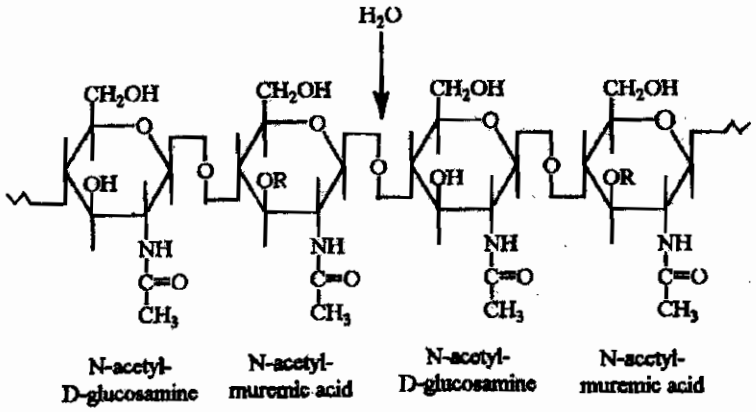
.....

.....

การทดลองที่ 6.2

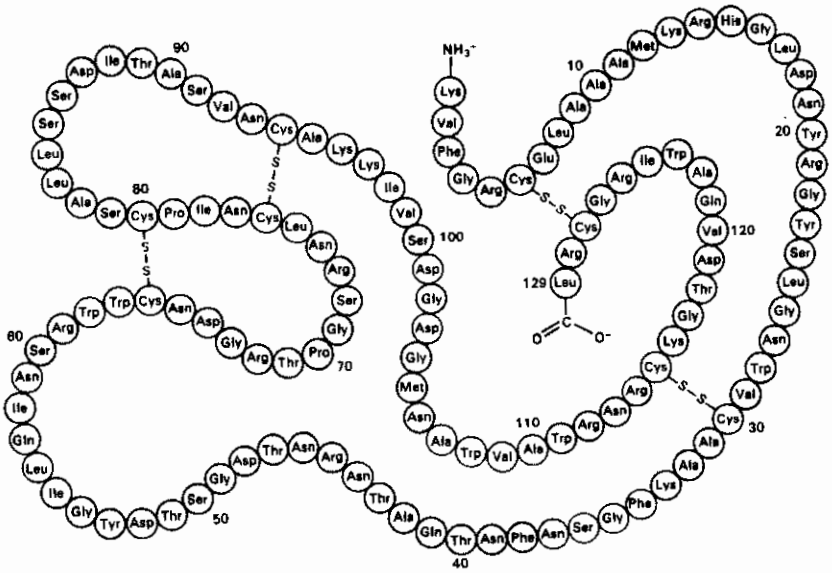
การแยกไลโซไซม์จากไข่ขาว

เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) หรือเรียกมิวรามิเดส (muramidase) มีชื่อที่เรียกตามระบบ คือ mucopeptide N-acetylmuramoylhydrolase (EC 3.2.1.17) พบไลโซไซม์ในไข่ขาว, นม, น้ำตา, และเนื้อเยื่ออื่นทั้งในพืชและสัตว์ ทำหน้าที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิก (β 1→4-linkage) ระหว่าง N-acetylmuramic acid (NAM) และ N-acetyl-D-glucosamine (NAG) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียบางชนิด ดังนั้นไลโซไซม์จึงเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จึงเป็นเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันสิ่งมีชีวิตจากเชื้อแบคทีเรียได้



การเชื่อมต่อโครงสร้างระหว่าง NAG และ NAM

ไข่ขาวเป็นแหล่งที่มีปริมาณของไลโซไซม์มาก จากการศึกษาพบว่าไลโซไซม์มีโครงสร้างเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 129 หน่วย ภายในสายเชื่อมโยงกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 4 ตำแหน่งด้วยกัน มีลักษณะเป็นโปรตีนก้อนกลม (globular protein) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14,300 และมีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 10.5 ดังตาราง ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบไลโซไซม์กับโปรตีนอื่นๆ ที่สกัดจากไข่ขาว จะเห็นว่ามีโปรตีนอีกหลายชนิดที่พบในไข่ขาวในปริมาณที่แตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบค่า pI และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด จะเห็นว่ามีความแตกต่างกัน จึงเป็นประโยชน์ในการแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันได้



โครงสร้างของไลโซไซม์

ตารางแสดงคุณสมบัติของโปรตีนที่พบในไข่ขาว

ชนิดของโปรตีนจากไข่ขาว	ปริมาณ (%)	ค่า pI	น้ำหนักโมเลกุล
Ovalbumin	54	4.5	45,000
Ovotransferrin	12	6.05	76,600
Ovomucoid	11	4.1	28,000
Lysozyme	3.4	10.5	14,300
Ovoinhibitor	1.5	5.1	49,000
Ovoglycoprotein	1.0	3.9	24,400
Ovomacroglobulin	0.5	4.5	900,000
Avidin	0.05	10	68,300

การแยกไลโซไซม์ออกจากโปรตีนชนิดอื่นที่ได้จากส่วนไข่ขาวของไข่ไก่ สามารถใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน โดยอาศัยค่า pI ของไลโซไซม์ที่มีค่าสูงกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ การทดลองนี้ใช้ตัวกลางประเภทตัวแลกเปลี่ยนไอออนบวก (cation exchanger) ชนิด CM-cellulose และวิเคราะห์ผลการแยกโดยหาค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยนำเอนไซม์มาทดสอบกับแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* เมื่อนำแบคทีเรียมาผสมกับบัฟเฟอร์ จะมีลักษณะขุ่น เมื่อใส่ไลโซไซม์ลงไป ไลโซไซม์จะทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียทำให้ความขุ่นลดลง สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว 450 นาโนเมตร

เอนไซม์ไลโซไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณไลโซไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ลดลง 0.001 ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C และ pH 7.0

$$\text{Specific activity} = \frac{\text{units}}{\text{mg of protein}}$$

$$\text{Total units enzyme activity} = \frac{\text{units}}{\text{mg protein}} \times \text{total protein}$$

$$\%\ \text{Recovery} = \frac{\text{total units of fraction}}{\text{total units of crude}} \times 100$$

$$\text{Purification factor} = \frac{\text{Specific activity of fraction}}{\text{Specific activity of crude}}$$

ตัวอย่าง การคำนวณหายูนิตของไลโซไซม์ และแอคติวิตีจำเพาะของไลโซไซม์ของสารละลายที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายนี้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วหาอัตราเร็วเริ่มต้น ($\Delta A/min$) ได้เท่ากับ 0.030 ต่อนาที ดังนั้น

ยูนิตของเอนไซม์ = 30 Units

ปริมาณโปรตีน = 2 mg/ml × 0.1 ml

= 0.2 mg

$$\text{specific activity} = \frac{30\ \text{Units} \times 1\ \text{mg}}{0.2\ \text{mg}}$$

= 150 Units/mg protein

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

คอลัมน์พลาสติก

ผ้าขาวบาง

นาฬิกาจับเวลา

หลอดคิวเวตต์

สารเคมี

Micrococcus lysodeikticus

CM-cellulose

0.05 M Tris-HCl ใน 0.05 M NaCl (pH 8.2)

0.2 M Na carbonate ใน 0.05 M NaCl (pH 10.5)

0.1 M phosphate pH 7.0

BSA (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

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 ผสมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมไข่ขาว

1.1 ตอกไข่ไก่ 1 ฟอง แยกไข่ขาวออกจากไข่แดง วัดปริมาตรของไข่ขาวที่ได้ เก็บส่วนไข่ขาวเพื่อนำมาแยกไลโซไซม์ โดยแช่ในน้ำแข็งไว้ตลอดเวลา

1.2 เตรียมบีกเกอร์แช่ไว้ในน้ำแข็ง และนำผ้าขาวบางที่ซ้อนทบ 2 ชั้น วางบนปากบีกเกอร์ กรองไข่ขาวที่ได้ผ่านผ้าขาวบาง

1.3 ปิเปตต์ไข่ขาวที่กรองผ่านผ้าขาวบางปริมาตร 3 มิลลิลิตร เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl pH 8.2 ที่เย็นปริมาตร 12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.4 กรองไข่ขาวที่เจือจางผ่านกรวยกรองแก้วที่มีกระดาษกรอง เก็บสารละลายส่วนที่กรองได้ในน้ำแข็ง บันทึกว่าเป็น F_0 และแบ่ง F_0 มา 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองแช่ไว้ในน้ำแข็ง สำหรับนำมาแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

2. การแยกไลโซไซม์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

2.1 ชั่ง CM-cellulose หนัก 0.5 กรัม เติมบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl pH 8.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คนด้วยแท่งแก้วเบาๆ

2.2 เตรียมคอลัมน์ไว้กับฐานยึดคอลัมน์ ใส่บัฟเฟอร์ไล่ฟองอากาศที่อยู่ในสายยางให้หมด จากนั้นใส่ผ้าขาวบางที่ตัดพอดีกับปลายคอลัมน์

2.3 ค่อยๆ เท CM-cellulose ใส่ลงในคอลัมน์ บรรจุ CM-cellulose จนหมด

2.4 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl pH 8.2 ที่เย็น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2.5 เมื่อพร้อมที่จะใส่ไข่ขาว ให้ปรับระดับบัฟเฟอร์ที่เหลือให้อยู่เหนือผิวหน้าเจลเล็กน้อย ใส่ไข่ขาวลงสู่คอลัมน์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เริ่มเก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่ในหลอดทดลองที่แช่ในน้ำแข็ง เมื่อไข่ขาวไหลลงสู่คอลัมน์เกือบหมด ค่อยๆ ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl pH 8.2 ที่เย็น ทีละ 1 มิลลิลิตร จนแน่ใจว่าไข่ขาวไหลลงสู่คอลัมน์จนหมด จึงใส่บัฟเฟอร์ปริมาณมากได้ ใช้ปริมาตรรวมของบัฟเฟอร์เท่ากับ

10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้รวมกันและให้บันทึกว่าเป็น F_1 วัดปริมาตรของสารละลาย F_1 บันทึกค่าในตารางที่ 6.2.3 และเก็บ F_1 ไว้ในน้ำแข็ง

2.6 เปลี่ยนบัฟเฟอร์ที่ชะคอลัมน์เป็น 0.2 M Na carbonate pH 10.5 ที่เย็น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ไหลออกจากคอลัมน์ใส่ในน้ำแข็ง บันทึกว่าเป็น F_2 เมื่อระดับของบัฟเฟอร์ด้านบนลดลงมาเกือบหมดจึงปิดปลายคอลัมน์ วัดปริมาตรของสารละลาย F_2 ที่ได้ บันทึกค่าลงในตารางที่ 6.2.3 และเก็บ F_2 ในน้ำแข็ง

2.7 แบ่งสารละลายที่เก็บได้ในแต่ละหลอด (F_0, F_1, F_2) เพื่อนำมาทดสอบเอนไซม์ไลโซไซม์ และเก็บไว้ประมาณ 5 มิลลิลิตร แช่ในตู้เย็น (-20 °C) เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนต่อไป

3. การทดสอบไลโซไซม์

3.1 ชั่งเซลล์แบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* 3 มิลลิกรัม

3.2 ปิเปตต์บัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ที่มีเซลล์แบคทีเรีย ผสมให้เข้ากัน

3.3 เปิดเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ ปรับความยาวคลื่นเป็น 450 นาโนเมตร ปรับเครื่องให้อ่านค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับศูนย์ โดยใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate pH 7.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

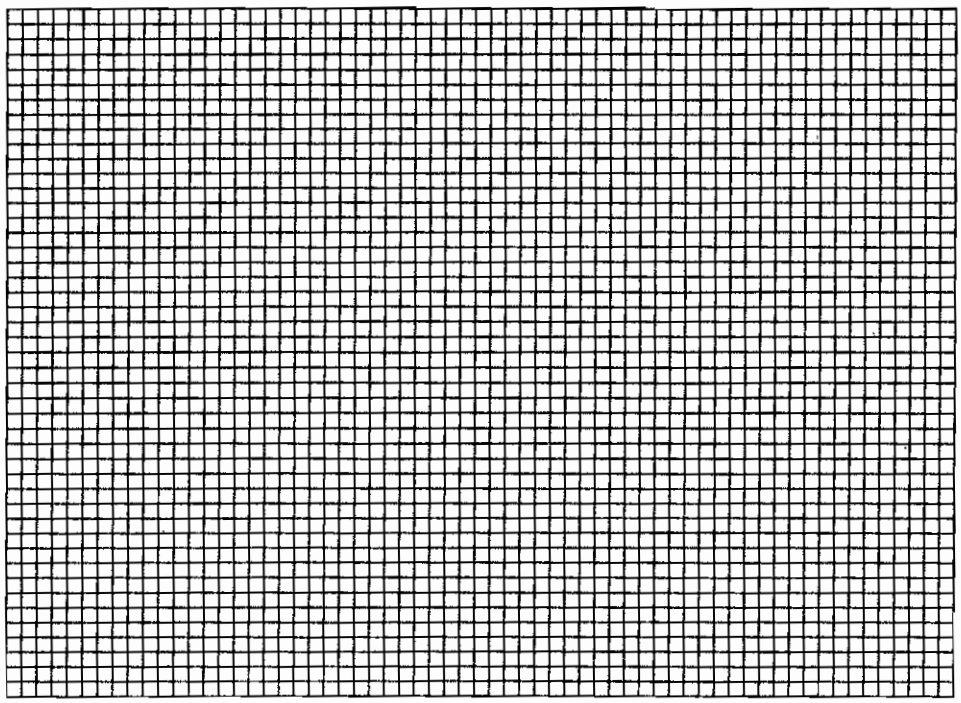
3.4 ทำการทดสอบไลโซไซม์โดยปิเปตต์เซลล์แบคทีเรีย 2.9 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง และปิเปตต์สารละลาย F_0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แยกใส่หลอดทดลองอีกหนึ่งหลอด และแช่ในน้ำแข็ง เมื่อพร้อมจะจับเวลาจึงผสมสารละลายให้เข้ากันโดยเร็ว (อย่าให้มีฟองอากาศ) แล้วรีบเทใส่คิวเวตต์ นำคิวเวตต์ใส่เครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ อ่านค่า A_{450} ที่เวลา 15, 30, 45, ..., 120 วินาที บันทึกค่าที่ได้ลงในตารางที่ 6.2.1

3.5 ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.4 โดยเปลี่ยนสารละลายที่ทดสอบไลโซไซม์เป็น F_1 และ F_2

3.6 เขียนกราฟระหว่างค่า A_{450} กับเวลา เพื่อหาค่า $\Delta A/min$ ของ F_0, F_1 และ F_2

ตารางที่ 6.2.1 แสดงผลการแยกไลโซไซม์

เวลา (วินาที)	A_{450}		
	F_0 (Filtered egg)	**F_1 (Tris fraction)**	**F_2 (carbonate fraction)**
15			
30			
45			
60			
75			
90			
105			
120			



4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

4.1 นำสารละลายโปรตีน F_0, F_1, F_2 ที่เก็บไว้ในตู้เย็นมาตั้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อละลายหมดจึงเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4.2 เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยปิเปตต์สารละลาย 0.1 mg/ml BSA ปริมาตรดังตาราง 6.2.2 และปรับปริมาตรเป็น 2.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น คำนวณปริมาณ BSA ในแต่ละหลอด

4.3 เตรียมสารละลายโปรตีน F_0 , F_1 และ F_2 โดยทำการเจือจางตามลำดับเป็น 10, 100, 1000 เท่า ดังรูปที่ 6.2.1 ปิเปตต์สารละลายโปรตีนที่เจือจางได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่

4.4 ปิเปตต์สารละลาย Lowry reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนตัวอย่างแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

4.5 นำแต่ละหลอดมาเติมสาร Folin phenol reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4.6 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

4.7 หาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ โดยเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า A_{750} กับปริมาณโปรตีน BSA และหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 6.2.2 สารมาตรฐานที่ใช้เพื่อหาปริมาณโปรตีน

หลอดที่	0.1 mg/ml Std.BSA (ml)	น้ำกลั่น (ml)	Total Vol. (ml)	ปริมาณ BSA (μg)	A_{750}
1	-	2.0	2.0		
2	0.2	1.8	2.0		
3	0.4	1.6	2.0		
4	0.6	1.4	2.0		
5	0.8	1.2	2.0		
6	1.0	1.0	2.0		

โปรตีนที่ทำการแยกแต่ละ fraction มีค่าA_{750} ดังนี้

F_0 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....

F_0 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....

F_0 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....

F_1 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....

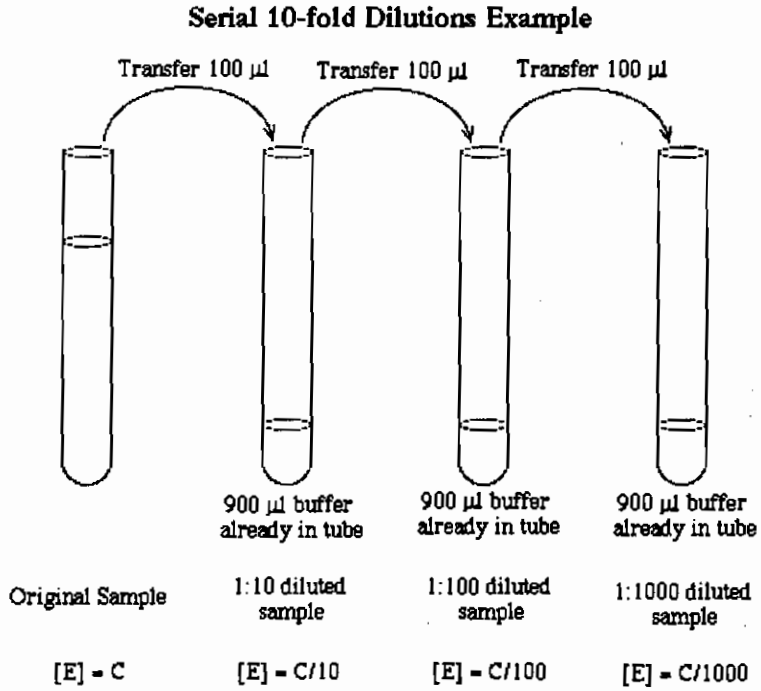
F_1 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....

F_1 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....

F_2 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....

F_2 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....

F_2 เจือจาง.....เท่า A_{750}.....



รูปที่ 6.2.1 แสดงการเจือจางตามลำดับ (serial dilution)

ตารางที่ 6.2.3 แสดงผลการแยกไลโซไซม์

Fraction	Total vol. (ml)	Protein Conc. (mg/ml)	Total Protein (mg)	Units/ ml	Total Units	Specific Activity	% Recovery	Purification Factor
F_0								
F_1								
F_2								

คำถาม

1. เหตุใดนักวิทยาศาสตร์ต้องการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

.....

.....

.....

2. สามารถใช้โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน แยกโปรตีนออกจากกันได้อย่างไร

.....

.....

.....

3. โปรตีนชนิดใดที่พบมากในไข่ขาว เหตุใดจึงสามารถแยกไลโซไซม์ออกจากโปรตีนชนิดอื่นๆ ในไข่ขาวได้ง่าย

.....

.....

.....

4. จงอธิบายวิธีในการทดสอบไลโซไซม์ในสารละลาย

.....

.....

.....