บทที่ 5
การสกัดแยกโปรตีนจากพืชบางชนิด

วัตถุประสงค์ 1. เพื่อให้เข้าใจหลักการและวิธีการอย่างง่ายในการสกัดแยกโปรตีนจากพืช

2. เพื่อให้ทราบขั้นตอนในการแยกโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

3. เปรียบเทียบโปรตีนที่ได้ในแต่ละขั้นตอน ทั้งในด้านปริมาณ และหน้าที่ทางชีวภาพ

4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของโปรตีน

หลักการ โปรตีนเป็น polypeptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลาย ๆ หน่วยโครงสร้างเชื่อมต่อกันด้วย peptide bonds โปรตีนที่พบในธรรมชาติจะมีขนาดของโมเลกุลตั้งแต่ 5,000 daltons ขึ้นไป จึงจัดเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งเราเรียกว่า "macromolecule" โปรตีนแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยโครงสร้าง, การจับกันของอะตอมภายในสาย polypeptide และการขดพับของสาย polypeptide ทำให้โปรตีนมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งจะสัมพันธ์กับหน้าที่แตกต่างกันของโปรตีนชนิดนั้น ผลคือจะแสดงหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function)แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น enzymeช่วยเร่งปฏิกิริยาภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต, antibody ป้องกันอันตรายจากสารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย,haemoglobin ช่วยขนส่ง oxygen ในเลือด เป็นต้น โปรตีนมีโครงสร้างในสภาพธรรมชาติหรือที่เรียกว่า"Native protein" เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลำดับที่ 2,3 และ 4 จนทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) จะส่งผลทำให้โปรตีนนั้นๆไม่สามารถแสดงหน้าที่ทางชีวภาพดั้งเดิมของมันได้เราเรียกโปรตีนนี้ว่า "Denatured protein" แต่ในบางครั้งเราอาจทำให้โปรตีนดังกล่าวกลับไปมีโครงสร้างในสภาพธรรมชาติได้ (renaturation)โดยการกำจัดต้นเหตุของการเปลี่ยนแปลงนั้นออกไป ต้นเหตุหรือสาเหตุดังกล่าวมีดังนี้คือ

1.Chaotropic agents เป็นสารที่ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียสภาพโดยทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในสาย polypeptide และระหว่างตัวทำละลายที่เป็นน้ำกับโปรตีน เช่น urea, guanidine hydrochloride

2.Detergents เป็นสารที่มีคุณสมบัติ amphiphatic จึงสามารถจับกับโปรตีนได้ ทำให้การจับกัน และการขดพับของสาย polypeptide ถูกทำลาย เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS)

3.กรดและเบส ทำให้โปรตีนมีประจุเปลี่ยนแปลงไป บางครั้งอาจทำให้โปรตีนเสียสภาพและตกตะกอนลงมา จนไม่สามารถเกิด renaturation ได้

4.ความร้อน สามารถทำลายโครงสร้างของโปรตีนได้ จนบางครั้งเกิดการตกตะกอนของ

โปรตีน และไม่สามารถเกิด renaturation ได้

5.เกลือของโลหะหนักสามารถเกิด ionic interaction กับโปรตีนได้ ทำให้เกิดการจับกันของโปรตีน (aggregation)ตกตะกอนลงมา เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไป

ดังนั้นในการสกัดแยก (extraction) และการทำให้บริสุทธิ์ (purification)ของโปรตีนจำเป็นต้องคำนึงถึงสภาพธรรมชาติของโปรตีนนั้นๆ ด้วย บางกรณีโปรตีนที่ต้องการนั้นจับรวมตัวกับสารอื่น จึงต้องทำการสกัดแยกโดยใช้สารละลายที่ช่วยในการละลายโปรตีนเหล่านั้นออกมาซึ่งสารละลายดังกล่าวจะต้องมีส่วนประกอบที่เหมาะสมและมีผลกระทบต่อโปรตีนน้อยที่สุด ดังนี้คือ

1.pH ของสารละลายที่ใช้สกัดแยกจะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับโปรตีนนั้นๆ เช่น trypsin ควรใช้ pH 8-9

2.ความเข้มข้นของ buffer โดยจะคำนวณออกมาในรูปของค่า ionic strength อยู่ในช่วงประมาณ 0.05-0.1 อาศัยความสัมพันธ์ดังนี้คือ

ค่า ionic strength , $u = 1/2 \sum C_i Z_i$

เมื่อ C เป็นค่าความเข้มข้นของ ion ใดๆ

Z เป็นค่าประจุของ ion ใดๆ

เช่น 0.1 M NaCl -----> $Na^+ + Cl^-$ ค่า $u = 1/2 [0.1 (+1)^2 + 0.1(-1)^2]$

3.สารต่างๆที่เติมลงไป เช่น

3.1 Detergent หรือ chaotropic agent เพื่อช่วยในการกำจัดสารอื่นที่เกาะรวมอยู่กับโปรตีน โดยการลด hydrophobic interaction ระหว่างสารนั้น ๆ กับโปรตีนลง ตัวอย่าง detergent ที่ใช้แสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงชนิดของ detergent ที่ใช้ในการละลายโปรตีน

สาร	ลักษณะของ ion	ผลกระทบต่อโปรตีน	Critical * micelle conc. (% W/V)
Triton X 100	non-ionic	mild non-denaturing	0.02
Nonidet P 40	"		
Lubrol PX	"		0.006
Octyl glucoside	"		0.73
Tween 80	"		0.002
Sodium deoxycholate	anionic		0.21
Sodium dodecyl sulfate	"	strong denaturing	0.23
CHAPS	twitter-ionic		1.4

*ปริมาณที่บอกถึงค่าจำกัดสูงสุดที่ใช้ในการละลายโปรตีน เนื่องจาก detergentเกิดการสร้างเป็น micelle

3.2 Reducing agent เช่น 1,4-dithioerythritol (DTE), 1,4-dithioerytreitol (DTT), และ mercaptoethanol ความเข้มข้น 10-25 mM เพื่อช่วยในการป้องกันหมู่ thiolของโปรตีน จากการเกิด oxidation โดย oxygenในบรรยากาศ

3.3 Chelators เช่น ethylendiamine tetraacetate (EDTA) และ ethyleneglycol tetraacetate (EGTA)ความเข้มข้น10-25 mM เพื่อช่วยในการกำจัดพาก metal ion โดยเฉพาะพวกโลหะหนักซึ่งสามารถจับกับโปรตีนแล้ว ทำให้เ กิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

3.4 Proteolytic inhibitor เพื่อป้องกันการย่อยสลายของโปรตีน สาร inhibitor ที่นิยมใช้แสดงดังในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 แสดงชนิดของ inhibitor และปริมาณความเข้มข้นที่นิยมใช้

Inhibitor	enzyme ที่ถูก inhibited	ความเข้มข้นที่ใช้ (mM.)
Phenylmethylsulfonyl fluoride*	Serine protease	0.5 - 1
Ethylenediamine tetraacetate**	Metal-activated protease	~ 5

* ชื่อย่อ PMSF

** ชื่อย่อ EDTA

3.5 Bacteriostatic agent เพื่อป้องกันการการเจริญเติบโตของ bacteria ในสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ เช่น sodium azide 0.001 M , merthiolate 0.005% และ n-butanol 1%

เมื่อโปรตีนถูกสกัดหรือละลายออกมาในรูปของสารละลายแล้วจะเรียกส่วนนี้ว่า "crude extract" ขั้นต่อไปจะเป็นการตกตะกอนโปรตีนแยกออกมาจากสารละลาย วิธีที่นิยมใช้มีดังนี้

1. เติมเกลือลงในสารละลายโปรตีน ตอนแรกโปรตีนจะมีการละลายดีขึ้น เรียกว่า "salting in" เนื่องจากค่า ionic strength ยังต่ำอยู่ แต่ถ้าเติมมากขึ้น ค่า ionic strength จะมากขึ้น ทำให้น้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายที่จะไปละลายโปรตีนมีน้อยลง จึงทำให้เกิดการจับกันเองของโปรตีนมากขึ้น ในที่สุดจะรวมตัวกันตกตะกอนลงมาเรียกว่า"salting out" โปรตีนที่ตกตะกอนออกมา สามารถนำกลับมาละลายได้อีก เมื่อกำจัดเกลือออกไปจะยังคงรักษาสภาพธรรมชาติไว้ เกลือที่นิยมใช้คือ ammonium sulfate และ sodium sulfate

2. เติมพวก organic solvent หรือ organic polymer โดยสารเหล่านี้จะไปลดค่า dielectric constant ของสารละลายที่มีโปรตีนละลายอยู่ ทำให้โปรตีนเกิดการจับรวมตัวกันเองได้ง่ายขึ้นตามความสัมพันธ์ของ

$$F = e_1 \cdot e_2 / D \cdot r^2$$

เมื่อ F เป็นแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงกันข้ามของโปนตีน

e_1และe_2 เป็นประจุของ ion

r เป็นระยะทางระหว่าง ion

D เป็นค่า dielectric constantของสารละลายที่มีโปรตีนละลายอยู่ ผลคือ โปรตีนจะตกตะกอนลงมา การตกตะกอนโดยวิธีนี้ บางครั้งอาจทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติไปบางส่วน ตัวอย่างของสารจำพวกนี้คือ ethanol , acetone , polyethylene glycol (PEG) มักจะใช้ในปริมาณ 25-50 %

3. การปรับ pH ของสารละลายโดยการเติมกรดหรือเบส เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน ณ จุด isoelectric (pI) หลังจากตกตะกอนโปรตีนออกมาแล้ว ตะกอนโปรตีนที่ได้สามารถนำกลับมาละลายใหม่ในสารละลาย buffer(อาจจะต้องทำการ dialysis เพื่อปรับให้มี ionic strength ที่เหมาะสม)แล้วจึงทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยการใช้เทคนิค chromatography ในการทดลองเลือกใช้ CM cellulose ซึ่งเป็น cation exchanger ในการจับกับโปรตีนที่ต้องการ จากนั้นจึงทำการชะออกมาด้วยbuffer ที่มีค่า ionic strength สูงขึ้น หรือค่า pH เปลี่ยนไปจาก buffer เริ่มต้น

โปรตีนที่แยกสกัดหรือทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นนั้น สามารถตรวจหาปริมาณโปรตีนที่ได้ โดยการใช้คุณสมบัติในการดูดกลืนคลื่นแสง ultraviolet ของกรดอะมิโนชนิด aromatic ที่เป็นหน่วยโครงสร้างโดยตรง ณ ความยาวคลื่น 280 nm. ดังค่าความสัมพันธ์ดังนี้

ค่าการดูดกลืนแสง ณ 280 nm. ≃ 1.0 จะมีค่าโปรตีนประมาณ 1 mg/ml หรืออาจใช้การทำปฏิกิริยาของ phenolic group ในกรดอะมิโน ที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีนกับ *Folin - Ciocalteau reagent* ซึ่งประกอบด้วย *sodium tungtate,molybdate* และ phosphateได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงินหรือม่วง ซึ่งสามารถนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 650 nm. การหาปริมาณโปรตีนทำได้โดยอาศัยการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่นดังกล่าวของสารละลายมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น(ปกติจะใช้ bovine serum albumin เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน)เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง ก็จะทราบปริมาณโปรตีนนั้นๆ หรืออาจใช้การเขียนกราฟเส้นมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นต่างๆ กัน จากนั้นจึงแปรค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนตัวอย่างเป็นค่าความเข้มข้น การหาปริมาณโปรตีนแบบนี้เรียกว่า"Lowry หรือ Folin-Ciocalteau Method" วิธีนี้สามารถใช้หรือหาปริมาณโปรตีนที่มีปริมาณต่ำสุดได้ (sensitivity) ในระดับไมโครกรัม(ug.)

นอกจากค่าปริมาณโปรตีนที่สามารถตรวจหาได้จากการสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นแล้ว ยังมีหน้าที่ทางชีวภาพที่สามารถทดสอบได้ด้วย เนื่องจากโปรตีนที่สกัดได้ในการทดลองนี้มีคุณสมบัติเป็น enzyme จึงใช้ enzyme activity เป็นค่าที่บอกถึงหน้าที่ทางชีวภาพของโปรตีนที่สกัด โดยการหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มี enzymeในเทอมของปริมาณที่ลดลงของสารตั้งต้น (substrate) หรือปริมาณของผลิตภัณฑ์ (product) ที่เพิ่มขึ้นต่อหนึ่งหน่วยเวลา โดยค่าที่ได้นี้จะเป็นค่าที่สามารถใช้บอกปริมาณของ enzyme ได้ เพื่อให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบปริมาณของenzyme จึงได้มีการ

กำหนดหน่วยวัดปริมาณของ enzyme เป็นมาตรฐานสากลดังนี้ คือ

1. Enzyme activity จะมีหน่วยเป็น International unit(I.U.)หรือ unit(U) โดย 1 unit ของenzyme = ปริมาณenzyme ที่เปลี่ยน substrate 1 umoleในเวลา 1นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2. Specific activity จะมีหน่วยเป็น unit ของ enzyme ต่อปริมาณโปรตีน

ปริมาณ eneyme เหล่านี้สามารถใช้ในการหา % Yied ในแต่ละขั้นตอนที่ทำการสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้น ว่าได้ enzyme มากน้อยเพียงใด โดยอาศัยความสัมพันธ์ดังนี้

$$\% \text{ Yied ของขั้นที่สนใจ} = \frac{\text{total enzyme activity ของขั้นที่สนใจ}}{\text{total enzyme activity ของขั้นเริ่มต้น}} \times 100$$

และยังใช้ในการเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของ enzyme ที่ได้ในแต่ละขั้นตอนเป็นจำนวนเท่าต่อขั้นเริ่มต้น (purification fold) โดยอาศัยความสัมพันธ์ดังนี้

$$\text{Purification fold ของขั้นที่สนใจ} = \frac{\text{specific activity ของขั้นที่สนใจ}}{\text{specific activity ของขั้นเริ่มต้น}}$$

โปรตีนที่ทำการแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ในการทดลองนี้ มีคุณสมบัติ เป็น enzyme ที่เรียกว่า "Peroxidase" ซึ่งพบได้ในพืชพวกหัวไชเท้า,กะหล่ำปลี,ผักโขม และผักกวางตุ้ง เป็นต้น enzyme นี้จะเร่งปฏิกิริยาในการ reduce H_2O_2 ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งในการป้องกันอันตรายของพืช และในขบวนการ metabolism ของ hormone พืชด้วย สมการทั่วไปสามารถเขียนได้ดังนี้

$$AH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidase}} A + 2H_2O$$

จากสมการที่ปรากฏสามารถประยุกต์ใช้ในการทดลองได้ โดยใช้สารพวก 3,3 -diaminobenzidine แทน AH2 ซึ่งperoxidase enzyme สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation-reductionของสารดังกล่าว เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาล สามารถนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงณ ความยาวคลื่น 465 nm. ได้ อาศัยการเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย peroxidase มาตรฐานที่ทราบปริมาณ enzyme activity ก็จะทราบปริมาณ enzyme ที่นำมาวัดได้

การทดลองจะแบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ

<u>ตอนที่ 1</u> เป็นการสกัดแยกและตกตะกอนโปรตีนจากพืช

<u>ตอนที่ 2</u> เป็นการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ chromatography ชนิด ion-exchange

<u>ตอนที่ 3</u> เป็นการตรวจหาและ เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและ enzyme activity จากสารที่สกัดและทำให้บริสุทธิ์จากตอนที่ 1 และ 2

ตอนที่ 1 การสกัดแยกและตกตะกอนโปรตีนจากพืช

อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง

1.Knife & plastic 1 ชุด

2.Plastic bag 1 ใบ

3.Cylinder ขนาด 10 ml.

4.Beaker ขนาด 50 ml. & 250 ml. อย่างละ 1 ใบ

5.Centrifuge tube ขนาดใหญ่& ขนาดเล็กอย่างละ 1 หลอด

6.หลอดทดลอง ขนาด 1 3 x 100 mm.3 หลอด

7.Ice container 1 ใบ

8.Aluminium foil ขนาด 1.5x1.5 นิ้ว จำนวน 1 แผ่น

9.Parafilm ขนาด 1 x 2 นิ้ว 3 แผ่น

10.Wash bottle 1 ขวด

11.Brush 1 อัน

12.พืช-ผักสด

เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน

1.Centrifuge & Two-pan rough balance

2.Rough balance

3.Refrigerator

สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน

1. Cold acetone พร้อม beaker ขนาด 100 ml. และ cylinder ขนาด 10 ml.
2. Cold 1 mM phosphate buffer pH 5.0 พร้อมbeaker ขนาด 100 ml. และ serological pipette ขนาด 2 ml.

การทดลอง

1.นำพืช-ผักสด มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา ฉีดล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแบ่งมา 20 g.

2.ใช้มีดหั่นให้มีขนาดเล็กที่สุด บรรจุใส่ plastic bag ปิดปากถุง แช่น้ำแข็งสักพัก

3.ทำการบดโดยใช้ด้ามมีดกดทับ plastic bag(ให้แช่น้ำแข็งเป็นระยะระหว่างที่ทำการบด) เมื่อพืช-ผัก ละเอียดดีแล้วให้บีบเอาเฉพาะส่วนใสใส่หลอดปั่นขนาดเล็กที่แช่น้ำแข็งไว้ นำไปปั่น 3,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที

4.เทส่วนใส ใส่ cylinder ที่แช่น้ำแข็งไว้ อ่านปริมาตรที่ได้ เรียกส่วนนี้ว่า"crude extract" จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

<u>ส่วนที่ 1</u> แบ่งมา 0.5 ml.ใส่หลอดทดลอง ติดฉลาก Sample 1 และกลุ่มให้เรียบร้อย เก็บไว้ในช่องแช่แข็งของ refrigerator เพื่อใช้ในตอนที่ 3

<u>ส่วนที่ 2</u> ปริมาตรที่เหลือใส่หลอดปั่นขนาดใหญ่ที่แช่น้ำแข็งไว้ ติดฉลากกลุ่มให้เรียบร้อย แล้วจึงเติม cold acetone ลงไปในปริมาตรที่เท่ากัน ทำการผสม จากนั้นปิดปากหลอดด้วยaluminium foil และparafilm นำไปแช่ในช่องแช่แข็งเป็นเวลา 1 ช.ม.

5.เมื่อครบ 1 ช.ม.แล้วให้นำออกมาปั่นด้วยความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 20 นาที

6.เทส่วนใสทิ้ง ส่วนตะกอนตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นแช่หลอดปั่นในน้ำแข็งเติม cold 1mM. phosphate buffer pH 5.0 2 ml.ลงไปละลายตะกอนเรียกส่วนนี้ว่า "acetone precipitate" แล้วจึงเทใส่หลอดทดลอง ติดฉลาก Sample 2 และกลุ่มให้เรียบร้อย ปิดปากหลอดด้วย parafilm นำไปเก็บในช่องแช่แข็ง เพื่อใช้ในตอนที่ 2 & 3

<u>ตอนที่ 2</u> <u>การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ chromatography ชนิด ion-exchange</u>

<u>อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง</u>

1.Plastic syringe ขนาด 5 ml.,tubing,pinch clamp,stand,elastic 6 cotton wool 1 ชุด

2.Beaker ขนาด 100 ml. 2 ใบ และขนาด 250 ml. 1 ใบ

3.Dropper & Stirring rod อย่างละ1 อัน

4.หลอดทดลอง ขนาด 13 x 100 mm. จำนวน 8 หลอด พร้อม rack

5.Ice container 1 ใบ

6.Serological pipette ขนาด2 ml. 2 อัน & rubber bulb พร้อมtip 1 ชุด

7.Resin ชนิด CM-cellulose ใน 1 mM.phosphate buffer pH 5.0 ปริมาตร 4 ml. ใน beaker ขนาดเล็ก

8.Paraf ilm ขนาด 1x1 นิ้ว 10 แผ่น

9.Brush 1 อัน

10.Wash bottle 1 ขวด

<u>เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน</u>

1.Spectrophotometer พร้อมcuvette ชนิด quartz

2.Centrifuge & Two-pan rough balance

<u>สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน</u>

1. 1mM Phosphate buffer pH 5.0

2. 0.03 M NaCl

<u>การทดลอง</u>

1.ยึด plastic syringe (แทน column) กับ stand ด้วย elasticโดยให้ปลายที่มีสาย tubing ต่ออยู่ทางด้านล่าง และยกปลาย tubing สอดขึ้นกับ elastic แล้วจึงใช้ pinch clamp รัดช่วงกลางสาย tubing ให้ปิดพอดี (รูปที่ 5.1)

2.เติม buffer ลงไปประมาณ 1/2 column นำ cotton wool อุดรูทางออกของ syringe (เพื่อป้องกันการไหลออกของ resin ระวังอย่าใช้มากเกินไปจะทำให้ของเหลวไหลออกได้ยาก) (รูปที่ 5.1 ก.)

3.ค่อย ๆ เติม resin ลงใน column(ถ้า resin ข้นมากให้เติม buffer ลงไป 1-2 ml) โดยใช้ stirring rod ช่วยคนและนำทางการไหลของ resin ลงสู่ column

4.ปล่อยปลาย tubing ออกจาก elastic โดยระดับที่ปลายพอดีไหลลง beaker ขนาด 100 ml.ที่นำมารองได้ จากนั้นค่อยๆ คลาย pinch clampโดยปรับให้มีอัตราการไหล 1 หยดต่อ 4 วินาที (18 ml./ช.ม.) (รูปที่ 5.1 ค.)

5.ปล่อยของเหลวใน column ให้ไหลออกจนกระทั่งผิวหน้าของ resin buffer สูงประมาณ 1-2 mm.(อย่าปล่อยให้แห้งโดยเด็ดขาด) จากนั้นให้ยกปลาย tubing สอดขึ้นกับ elastic โดยไม่ต้องปรับที่ pinch clamp อีก (รูปที่ 5.1 ง.)

6.นำ Sample 2 ออกมาจากช่องแช่แข็งตั้งทิ้งไว้ให้ละลาย จากนั้นเขย่าหลอดให้สารเข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง แล้วจึง pipette ออกมา 1.5 ml.ค่อยๆ หยดลงบน column (ระวังอย่าให้ผิวหน้าของ resin ฟุ้ง) (รูปที่ 5.1 จ.)Sample 2 ที่เหลือให้ปิดปากหลอดด้วย parafilm นำไปแช่ในช่องแช่แข็ง

7.ปล่อยปลาย tubing ออกจาก elastic เพื่อให้ของเหลวไหลออกจาก column จนเกือบแห้ง จากนั้นค่อย ๆ หยอด buffer ลงบน column 0.5 ml.ปล่อยให้ไหลออก แล้วจึงยกปลาย tubing ขึ้น (รูปที่ 5.1 ฉ.)

8.ค่อยๆหยด buffer ลงบน column อีกประมาณ 2 ml.ปล่อยปลาย tubing ลงใส่หลอดทดลอง เริ่มเก็บของเหลวที่ออกมาจาก column หลอดละ 1 ml. (ติดฉลากว่าเป็น fraction 1,2,....) (รูปที่ 5.1 ช.)

9.เมื่อ buffer บน column เกือบแห้งให้เติม 0.03 M NaCl ลงไปแทน(ระวังอย่าให้ผิวหน้าของ columnแห้ง)เก็บของเหลวที่ไหลออกจาก columnจนครบ 7 fractions

10.นำแต่ละ fraction ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 280 nm. โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank จากนั้นบันทึกผลที่อ่านได้ เทสารแต่ละ fraction กลับหลอดเดิมปิดปากหลอดด้วย parafilm ติดฉลากกลุ่มทั้ง 7 หลอด นำไปแช่ในช่องแช่แข็ง เพื่อใช้ใน ตอนที่ 3

(<u>หมายเหตุ</u> กรณีที่ Sample 2 มีตะกอน ให้นำไปปั่น 3,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนออก ก่อนที่จะหยดลงใน column)

<u>ตอนที่ 3</u> การตรวจหาและเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและ enzyme activity จากที่สกัดได้และทำให้บริสุทธิ์

<u>อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ต่อ 1 กลุ่มการทดลอง</u>

1.หลอดทดลอง ขนาด13 x 100 mm. จำนวน 22 หลอด พร้อม rack

2.Serological pipette ขนาด 1 ml. จำนวน 4 อัน

3.Rubber blub พร้อม Tip 1 อัน

4.Brush 1 อัน และ Wash bottle 1 ขวด

<u>เครื่องมือที่ใช้ร่วมกัน</u>

1.Spectrophotometer พร้อม cuvette

<u>สารเคมีที่ใช้ร่วมกัน</u>

1.สารละลาย peroxidase มาตรฐาน activity 21 units (27 umole/นาที/ml.) พร้อม serological pipette ขนาด1ml. จำนวน 2 อัน

2.สารละลายโปรตีนมาตรฐาน(Bovine serum albumin,BSA) เข้มข้น 0.5 mg/ml พร้อม serological pipette ขนาด 1 ml. จำนวน2อัน

3.Potassium sodium tartrate - copper sulfate solution พร้อม beaker ขนาด 250 ml. และ burette

4.Folin-phenol reagent พร้อมserological pipetteขนาด 1 ml.จำนวน 3อัน

5.DAB solution พร้อม serological pipette ขนาด10 ml. จำนวน 2 อัน

<u>การทดลอง</u>

3.1 การหาปริมาณโปรตีนในแต่ละส่วนที่แยกออกมาได้

1.Pipette น้ำกลั่น,สารละลายโปรตีนมาตรฐาน,fraction 1-7มาอย่างละ 0.2 ml.ใส่ลงในหลอดที่ 1-9 ตามลำดับ

2.ส่วน Sample 1&2 ให้ pipette มา 0.1 ml.ใส่ลงในหลอดทดลองที่ 10&11 แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 0.1 ml.

3.เติม potassium sodium tartrate-copper sulfate sol&ion ลงไป

ในหลอดที่ 1-11 หลอดละ 2.5 ml. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4. เติม Folin-phenol reagent ลงไปในหลอดที่ 1-11หลอดละ 0.25 ml.ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

5. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง N 650 nm.โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น blank บันทึกผลการทดลองที่ได้

3.2 การหาปริมาณ activity ในแต่ละส่วนที่แยกออกมาได้

1. Pipette น้ำกลั่น,สารละลายperoxidaseมาตราฐาน,fraction l-7 มาอย่างละ 0.1 ml. ใส่ลงในหลอดที่ i-9 ตามลำดับ

2. ส่วน Sample 1&2 ให้ pipette มา 0.1 ml.ใส่ลงในหลอดทดลองที่ 10&11 แล้วจึงเติม 10 mM.phosphate buffer pH 7.0 ลงไปหลอดละ 0.05 ml.

3. เติม DAB solution ลงไปในหลอดที่ 1-11 หลอดละ 3 ml.ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที

4. นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสง N ความยาวคลื่น 465 nm.โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น blank บันทึกผลที่ได้

(<u>หมายเหตุ</u> DAB solution จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง(carcinogen)จึงควรให้ความระมัดระวังในการใช้ โดยไม่ควรให้สัมผัสถูกร่างกาย)

<u>การเตรียมสารละลายบางชนิดที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. Potassium sodium tartrate- $CuSO_4$ reagent :

-ละลาย sodium carbonate 20 g. ในน้ำกลั่น 960 ml. แล้วเติม 3 N sodium-hydroxide ลงไป 35 ml. ผสมให้เข้ากัน ==> " สารละลาย A "

-ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 1 g. ในน้ำกลั่น 100 ml. ==>" สารละลาย B "

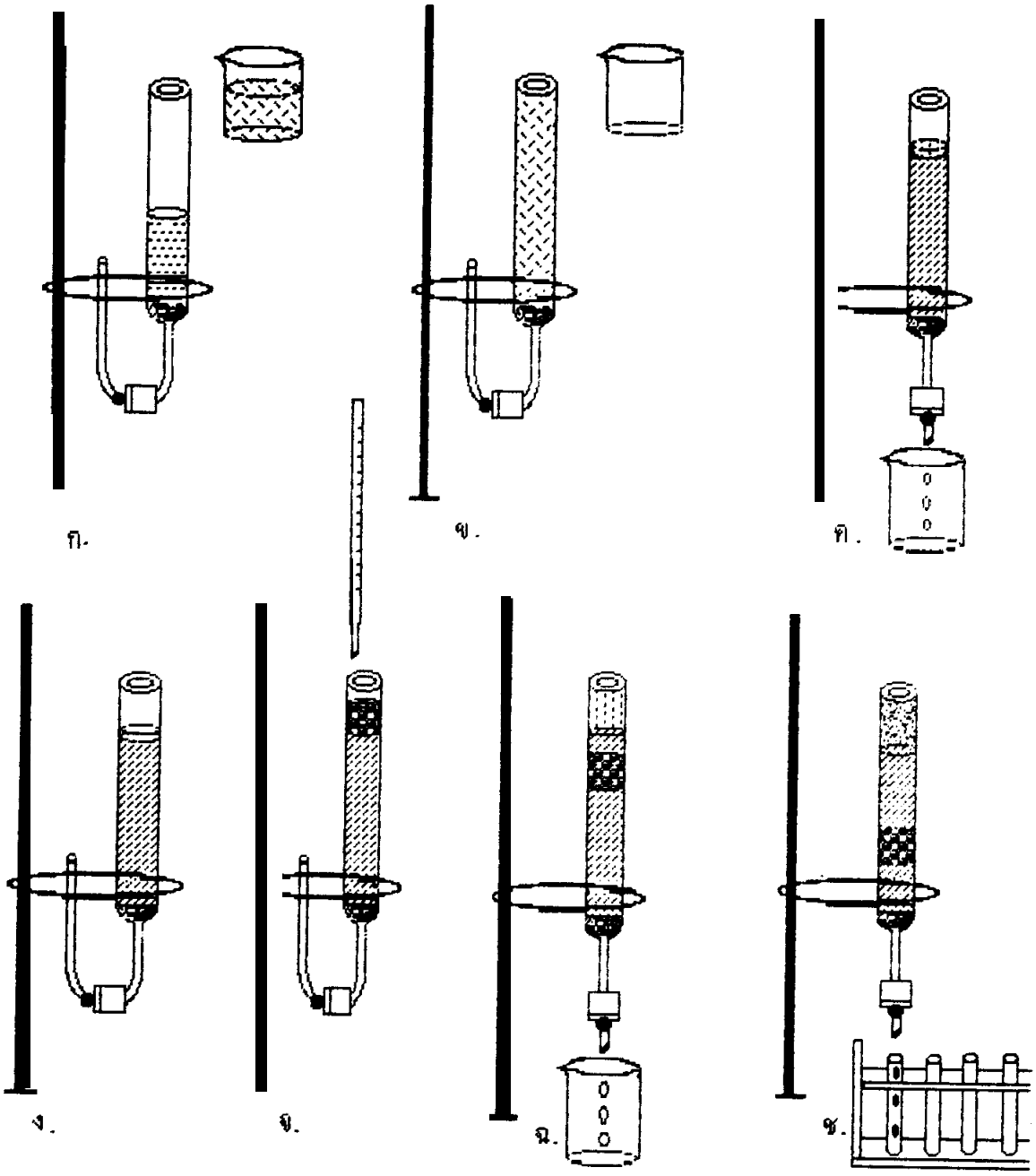
-ละลาย potassium sodium tartrate 2 g. ในน้ำกลั่น 100 ml.==>"สารละลาย C "

-นำสารละลาย B 2.5 ml.ผสมกับสารละลาย c 2.5 ml.จากนั้นจึงเติมสารละลาย A ลงไป 250 ml. ผสมให้เข้ากันและใช้ทันที

2. DAB solution :

-ละลาย trizma base (Tris) 6 g.ในน้ำกลั่น 500 ❑ l.lk HCl conc. ปรับให้ได้ pH 5.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1000 ml. => " สารละลาย Tris "

-ละลาย diaminobeneidine hydrochloride 0.02 g.ในสารละลาย Tris 250 ml. ก่อนใช้งานจึงเติม 0.4 ml.ของ Hydrogen peroxide ลงไป ผสมให้เข้ากันใช้ทันที



<u>รูปที่ 5.1</u> แสดงการเตรียม column

รายงานผลการทดลอง

เรื่อง การสกัดแยกโปรตีนจากพืชบางชนิด

ชื่อ 1._____ รหัส _____

ชื่อ 2._____ รหัส _____

ชื่อ 3._____รหัส _____

ชื่อ 4._____รหัส _____

กลุ่มที่____Section/วันที่ทำการทดลอง_____เวลา_____

ห้องที่ทำการทดลอง_____

อาจารย์ผู้ควบคุม 1._____

2._____

_____

ตอนที่1 ผลการสกัดแยกและตกตะกอนโปรตีนจากพืช

น้ำหนักของพืชตัวอย่าง_____ที่ใช้ _____g.

ปริมาตรของ crude extract _____ml.

ปริมาตรของ crude extract ที่นำมาตกตะกอน _____ml.

ปริมาตรของ acetone precipitate ที่ละลายใน buffer_____ml.

ตอนที่2 ผลการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ chromatography ชนิด_____

ปริมาตรของสารละลาย acetone precipitate นำมาแยก_____ml.

ปริมาตรของแต่ละ fraction ที่ได้จาก column _____ml.

ค่า OD_{280} ของ fraction 1 = _____

2 = _____

3 = _____

4 = _____

5 = _____

6 = _____

1 = _____

ตอนที่ 3 ผลการตรวจหาและเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและ peroxidase activity,%yield และ purification fold จากที่สกัดได้และทำให้บริสุทธิ์ขึ้นในแต่ละขั้นตอน

สาร	OD_{650}/ปริมาตรสาร	ปริมาตรทั้งหมด	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด
น้ำกลั่น	/ ml.	ml.	mg.
โปรตีนมาตรฐาน	/ ml.	ml.	mg.
Crude extract	/ ml.	ml.	mg.
Acetone precipitate	/ ml.	ml.	mg.
Fraction 1	/ ml.	ml.	mg.
Fraction 2	/ ml.	ml.	mg.
Fraction 3	/ ml.	ml.	mg.
Fraction 4	/ ml.	ml.	mg.
Fraction 5	/ ml.	ml.	mg.
Fraction 6	/ ml.	ml.	mg.
Fraction 7	/ ml.	ml.	mg.

สาร	OD_{465}/ปริมาตรสาร	ปริมาตรทั้งหมด	ปริมาณ act.ทั้งหมด
น้ำกลั่น	/ ml.	ml.	units
peroxidaseมาตรฐาน	/ ml.	ml.	units
Crude extract	/ ml.	ml.	units
Acetone precipitate	/ ml.	ml.	units
Fraction 1	/ ml.	ml.	units
Fraction 2	/ ml.	ml.	units
Fraction 3	/ ml.	ml.	units
Fraction 4	/ ml.	ml.	units
Fraction 5	/ ml.	ml.	units
Fraction 6	/ ml.	ml.	units
Fraction 7	/ ml.	ml.	units

สาร	ปริมาณact. ทั้งหมด	ค่า %Yield	ปริมาณโปรตีน ทั้งหมด(mg.)	ปริมาณ sp.act.	ค่าFold
Crude extract					
Acetone precipitate					
Fraction 1					
Fraction 2					
Fraction 3					
Fraction 4					
Fraction 5					
Fraction 6					
Fraction 7					

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{280} และลำดับที่ของ fraction ต่างๆ ที่ออกมา column (_____) และความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD_{465} และลำดับที่ของ fraction ต่างๆ ที่ออกมา (_____)

<u>วิธีคำนวณ</u> (โดยใช้สารส่วนของ acetone precipitate เป็นตัวอย่าง)

สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

<u>คำถาม</u>

1. ในการทดลองมีการใช้ chromatogaraphy แบบใด ให้อธิบายหลักการสั้น ๆ

2. จุดประสงค์ของการใช้ phosphate pH 5.5 เพื่ออะไร สอดคล้องอย่างไรกับ resin ที่บรรจุใน column ที่ใช้ในการทดลอง

3. 0.03 M NaCl ใช้ทำอะไร สามารถใช้สารประเภทอื่นแทนได้หรือไม่

4. โปรตีนที่ตกตะกอนด้วย acetone เสียสภาพหรือไม่ ให้อธิบายสั้น ๆ

5.ปฏิกิริยาการหาปริมาณ protein ดังที่ใช้ในการทดลองด้วยการใช้ OD_{280} และ OD_{650} แตกต่างกันอย่างไร

6.เหตุใดระหว่างสกัดสารจึงต้องทำในที่เย็น

7.จากขั้นตอนสุดท้าย ถ้านักศึกษาไม่ใช้ chromatography ชนิด ion-exchange ในการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น นักศึกษาจะเลือกใช้ chromatography แบบใด ให้อธิบายพร้อมทั้งบอกขั้นตอนในการทำมาพอสังเขป

8. จากการทดลองสกัดโปรตีนที่เป็น enzymeในบทนี้ นักศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในโรงงานหรืออุตสาหกรรมอย่างไรบ้าง ให้ยกตัวอย่าง enzymeชนิดอื่นที่นักศึกษาคิดว่าสำคัญ