บทที่ 7
การสกัดแยกโปรตีนจากพืชบางชนิด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้เข้าใจหลักการ และวิธีการอย่างง่ายในการสกัดแยกโปรตีนจากพืช
2. เพื่อให้ทราบขั้นตอนในการแยกโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์
3. เปรียบเทียบโปรตีนที่ได้ในแต่ละขั้นตอนทั้งในด้านปริมาณ และหน้าที่ทางชีวภาพ
4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของโปรตีน

ทฤษฎีเบื้องต้น

โปรตีน (protein) เป็นสายของพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) หลายๆ หน่วยโครงสร้างเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bonds) โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยโครงสร้าง การจับกันของอะตอมภายในสายพอลิเพปไทด์ และการขดพับของสายพอลิเพปไทด์ (folding) ทำให้โปรตีนมีโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งจะสัมพันธ์กับหน้าที่ที่แตกต่างกันของโปรตีนชนิดนั้นๆ ผลที่ได้จะทำให้โปรตีนแสดงหน้าที่ทางชีวภาพ (biological function) แตกต่างกันออกไป เช่น เอนไซม์ ทำหน้าที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต แอนติบอดี มีหน้าที่ตรวจจับและทำลายฤทธิ์สิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น แบคทีเรีย และไวรัส ฮีโมโกลบิน ช่วยขนส่งออกซิเจนในเลือด คอลลาเจน ทำหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรงในร่างกายของสัตว์ ฮอร์โมนทำหน้าที่ควบคุมการทำงานและการเจริญเติบโตของร่างกาย เป็นต้น

โดยปกติโปรตีนจะมีโครงสร้างอยู่ในสภาพธรรมชาติ เรียกว่า “native protein” เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ตติยภูมิ (tertiary structure) และจตุรภูมิ (quaternary structure) จะทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturation) ทำให้ไม่สามารถแสดงหน้าที่ทางชีวภาพได้อีก เรียกโปรตีนนี้ว่า “denatured protein” แต่ในบางกรณีหากกำจัดต้นเหตุที่ทำให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปได้ โปรตีนดังกล่าวอาจกลับมามีโครงสร้างในสภาพธรรมชาติได้ดังเดิม เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “renaturation”

ดังนั้นในการสกัดแยกโปรตีนออกจากสิ่งมีชีวิต จึงควรกำจัดต้นเหตุที่ทำให้โปรตีนที่ต้องการสกัดเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ เพื่อให้ได้ native protein มากที่สุด ซึ่งสาเหตุดังกล่าว ได้แก่

1. Chaotropic agents เป็นสารที่ทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในสายพอลิเพปไทด์ และระหว่างตัวทำละลายที่เป็นน้ำกับโปรตีน เช่น ยูเรีย กัวนีดีนไฮโดรคลอไรด์ เป็นต้น ซึ่งทำให้โครง[illegible] โปรตีนเสียสภาพไป
2. Detergents เป็นสารที่มีคุณสมบัติแอมฟิฟาติก (amphiphatic) ทำให้สามารถจับกับโปรต์นเต จงเป็นสาเหตุให้การจับกัน และการขดพับของสายพอลิเพปไทด์ถูกทำลาย เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS)
3. กรดและเบส ทำให้โปรตีนมีประจุเปลี่ยนแปลงไป บางครั้งอาจทำให้โปรตีนเสียสภาพ และตกตะกอนลงมา จนไม่สามารถเกิด renaturation ได้
4. ความร้อนและรังสี ทำให้อะตอมภายในโมเลกุลของโปรตีนเกิดการสั่นสะเทือนด้วยความเร็ว พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) หรือ พันธะไฮโดรฟอบิก (hydrophobic interaction) ของโปรตีนถูกทำลาย จนสามารถทำลายโครงสร้างของโปรตีนโดยเกิดการตกตะกอน และไม่สามารถเกิด renaturation ได้

5. เกลือของโลหะหนัก สามารถจับกับประจุลบของโปรตีน (ionic interaction) ทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมา เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เช่น $HgCl_2$, $AgNO_3$, $CuSO_4$ และ $BaCl_2$ เป็นต้น
6. อัลคาลอยด์รีเอเจนท์ สามารถจับกับประจุบวกของโปรตีน เกิดเป็นเกลือที่ไม่ละลาย ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เช่น กรดไตรคลอโรแอซิติก กรดแทนนิก เป็นต้น
7. ตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า dielectric constant ต่ำกว่าน้ำ ทำให้โปรตีนละลายได้น้อยลงเกิดการตกตะกอนลงมา ทำให้โปรตีนเสียสภาพ
8. เอนไซม์ จะย่อยสลายโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพ เช่น โปรตีเอส เป็นต้น

ดังนั้น การสกัดแยก (extraction) และการทำให้บริสุทธิ์ (purification) ของโปรตีน จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงสภาพธรรมชาติของโปรตีนนั้นๆ ด้วย ในบางกรณีโปรตีนที่ต้องการแยกออกมาอาจจะมีการจับรวมตัวอยู่กับสารอื่นๆ จึงจำเป็นต้องทำการสกัดแยกโปรตีนนั้น โดยใช้สารที่ช่วยละลายโปรตีนออกมา ซึ่งสารต่างๆ ดังกล่าวใช้จะต้องมีสมบัติที่ส่งผลกระทบต่อสภาพธรรมชาติของโปรตีนน้อยที่สุด ดังนี้

1. พีเอช โดยพีเอชของสารละลายที่ใช้ในการสกัดแยกโปรตีน ต้องมีความเหมาะสมต่อโปรตีนเพื่อให้โปรตีนอยู่ในสภาพธรรมชาติ
2. ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ โดยขึ้นอยู่กับค่า ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดแยกโปรตีน ซึ่งจะมีค่าอยู่ในช่วง 0.05 - 0.1 โดยเมื่อ ionic strength มีค่าสูง จะส่งผลต่อการละลายของโปรตีนที่ลดลง โดยสามารถคำนวณหาค่า ionic strength ได้จากสมการ

$$\text{ionic strength } (\mu) = \sum C_i \frac{1}{2} z_i^2$$

โดยที่ μ คือ ionic strength ของบัฟเฟอร์

C คือ ค่าความเข้มข้นของไอออน หน่วยเป็นโมลาร์

Z คือ ค่าประจุของไอออน

3. สารชนิดต่างๆ โดยที่สารแต่ละชนิดที่เติมเข้าไปในขณะที่ทำการสกัดแยกโปรตีนนั้น ล้วนแต่มีความสำคัญต่อสภาพธรรมชาติของโปรตีนทั้งสิ้น เช่น

Detergents และ Chaotropic agents ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการกำจัดสารอื่นๆ ที่เกาะรวมปนเปื้อนอยู่กับโปรตีน โดยการไปลดแรงของพันธะไฮโดรฟอบิก ระหว่างสารนั้นกับโปรตีน เช่น SDS, Triton X-100, Tween 80 และ CHAPS เป็นต้น

Reducing agent ช่วยในการป้องกันหมู่ thiol ของโปรตีน จากการถูกออกซิไดส์จากออกซิเจนในอากาศ เช่น 1,4-dithioerytreitol (DTT), 1,4-dithioerythanol (DTE) และ β-mercaptoethanol เป็นต้น

Chelators ช่วยในการกำจัดไอออนของโลหะ ซึ่งสามารถรวมตัวกับโปรตีน ทำให้โปรตีนตกตะกอน เกิดการเสียสภาพธรรมชาติ เช่น ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) และ ethyleneglycol tetraacetic acid (EGTA) เป็นต้น

Proteolytic inhibitor ช่วยในการป้องกันการถูกย่อยสลายจากโปรตีเอส เช่น ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) เป็นต้น

Bacteriostatic agent ช่วยในการป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เช่น sodium azide, n-butanol และ merthiolate เป็นต้น

จากที่กล่าวมาดังข้างต้น เห็นได้ว่าโปรตีนจะเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อกระบวน การทางชีวภาพเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งบทบาทของการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต นั่นก็คือ

"เอนไซม์" ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ จะมีเอนไซม์หลายชนิด ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในสิ่งมีชีวิตมีทั้งชนิดที่ผลิตแล้วหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และผลิตขึ้นใช้ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ดังนั้นกระบวนการต่างๆ ที่จะได้มาซึ่งโปรตีนที่มีคุณสมบัติตามต้องการนั้น ต้องอาศัยขั้นตอนต่างๆ ซึ่งต้องคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อสภาพธรรมชาติของโปรตีน เพื่อให้โปรตีนที่ได้ยังคงคุณสมบัติตามต้องการอยู่ได้ โดยขั้นตอนต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดแยกโปรตีนมีดังนี้

ขั้นตอนแรก สกัดโปรตีนออกมาจากเซลล์ หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการ เช่น พืช หรือจุลินทรีย์ โดยวิธีการที่นิยมใช้ เช่น การปั่นทำลายเซลล์ (grinding) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) และการแช่แข็ง-ทำละลาย (freeze-thaw) เป็นต้น โปรตีนที่ถูกสกัดออกมาจะอยู่ในรูปของสารละลายแล้ว จะเรียกว่า "crude extract"

ขั้นตอนต่อมา ทำการตกตะกอนโปรตีนออกมาจากสารละลาย โดยการตกตะกอนโปรตีน เป็นการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้บางส่วน เรียกว่า การทำบริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) ซึ่งวิธีการต่างๆ ที่นิยมใช้ดังนี้ เช่น

1.1 การเติมเกลือ โดยเกลือที่เติมลงไปจะละลายในสารละลายโปรตีน ซึ่งตอนแรกโปรตีนจะละลายได้ดีขึ้น เนื่องจากค่า ionic strength ยังคงต่ำอยู่ เรียก "salting in" แต่เมื่อเติมเกลือเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ค่า ionic strength จะสูงขึ้น ทำให้โปรตีนละลายได้น้อยลง เกิดการจับรวมตัวกันเองของโปรตีนตกตะกอนลงมา เรียก "salting out" ซึ่งโปรตีนที่ตกตะกอนออกมาได้สามารถนำกลับมาละลายใหม่ได้เมื่อกำจัดเกลือออก ซึ่งยังคงรักษาสภาพธรรมชาติไว้ได้ ซึ่งเกลือที่นิยมใช้ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เป็นต้น

1.2 การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) หรือ พอลิเมอร์ธรรมชาติ (organic polymer) โดยสารเหล่านี้จะไปลดค่า dielectric constant ของสารละลายโปรตีน ทำให้เกิดการจับรวมตัวกันเองของโปรตีนตกตะกอนลงมาได้ง่ายขึ้น แต่ว่าวิธีการนี้อาจทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติได้บางส่วน เช่น เอทานอล อะซีโตน และพอลิ- เอทีลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ดังความสัมพันธ์

$$F = \frac{e_1 \times e_2}{D \times r^2}$$

โดยที่ F คือ แรงดึงดูดระหว่างประจุตรงข้ามของโปรตีน

e_1 และ e_2 คือ ประจุของไอออน

D คือ dielectric constant ของสารละลายโปรตีน

r^2 คือ ระยะห่างระหว่างไอออน

1.3 การปรับพีเอชของสารละลาย โดยการเติมกรด หรือ เบส เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนที่จุด isoelectric pH (pI) ซึ่งที่จุดนี้โปรตีนจะละลายได้น้อยที่สุด เนื่องจากมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ ดังนั้นโปรตีนจึงเคลื่อนที่เข้าหากัน เนื่องจากเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงข้าม เกิดการรวมตัวตกตะกอนลงมา โดยโปรตีนที่ตกตะกอนลงมา สามารถนำกลับมาละลายใหม่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์

หลังจากที่ทำการสกัดแยกโปรตีน และการทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้ว ขั้นตอนต่อมาเป็นการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (chromatography) ซึ่งโครมาโทกราฟี ชนิดต่างๆ ที่นิยมใช้ เช่น

โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเทรชัน (gel filtration chromatography)โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (absorption chromatography) และโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) เป็นต้น

เมื่อทำให้โปรตีนบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นแล้ว ต่อมาเป็นการตรวจสอบหาปริมาณโปรตีน โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ของกรดอะมิโนชนิดที่เป็น aromatic ซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างของโปรตีนโดยตรง โดยวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งค่า 1 หน่วยของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จะมีปริมาณโปรตีนประมาณ 1 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร และอีกวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน คือ วิธีการของ Lowry (Lowry's method) โดยการใช้สาร folin-ciocalteau ทำปฏิกิริยากับหมู่ฟีนอลิก (phenolic group) ของกรดอะมิโนซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำเงินม่วง สามารถวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยเทียบปริมาณกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้ว เช่น สารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin ซึ่งวิธีการนี้สามารถหาปริมาณโปรตีนได้ที่ความเข้มข้นระดับไมโครกรัม

และนอกจากการตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนแล้ว ยังสามารถตรวจสอบหน้าที่ทางชีวภาพได้อีกด้วย เนื่องจากว่าโปรตีนที่สกัดออกมานั้นมีสมบัติเป็นเอนไซม์ จึงใช้การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยการหาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งในเทอมของสารตั้งต้น (substrate) ที่มีปริมาณลดลง หรือเทอมของผลิตภัณฑ์ (product) ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ต่อหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งค่าที่ได้นั้นสามารถบอกปริมาณเอนไซม์ได้ในหน่วยมาตรฐานสากล ดังนี้

1. Enzyme activity มีหน่วยเป็น International Unit (I.U.) หรือ Unit (U) โดยที่ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารตั้งต้น เป็นผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่กำหนด
2. Specific activity มีหน่วยเป็นยูนิตของเอนไซม์ทั้งหมด ต่อ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด

จากแต่ละขั้นตอนของการสกัดแยก และการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนนั้น อาจจะมีการสูญเสียสภาพธรรมชาติไปบ้างบางส่วน ดังนั้นการตรวจสอบปริมาณของโปรตีน หรือ เอนไซม์ที่ได้มาว่าเสียสภาพธรรมชาติไปมากน้อยเพียงใด โดยเทียบกับโปรตีน หรือ เอนไซม์ตอนตั้งต้น ซึ่งคือ crude extract ดังนี้

โดยถ้าสนใจ % Yield ในเทอมของโปรตีน

$$\%\ \text{Yield ของขั้นที่สนใจ} = \frac{\text{Total protein content ของขั้นที่สนใจ}}{\text{Total protein content ของขั้นตั้งต้น}} \times 100$$

โดยถ้าสนใจ % Yield ในเทอมของ activity

$$\%\ \text{Yield ของขั้นที่สนใจ} = \frac{\text{Total enzyme activity ของขั้นที่สนใจ}}{\text{Total enzyme activity ของขั้นตั้งต้น}} \times 100$$

และยังสามารถเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละขั้นตอน เมื่อเทียบกับขั้นตอนตั้งต้น ดังนี้

$$\text{Purification fold ของขั้นที่สนใจ} = \frac{\text{Specific activity ของขั้นที่สนใจ}}{\text{Specific activity ของขั้นตั้งต้น}}$$

โดยในการทดลองนี้สนใจแยก และสกัดโปรตีนจากพืช โดยอาศัยการปั่นทำลายเซลล์พืช จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน จากนั้นทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้ตัวกลางในการแลกเปลี่ยนประจุเป็น CM-cellulose หรือ DEAE-cellulose ซึ่งเป็นตัวกลางแลก เปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger) และลบ (antion exchanger) ตามลำดับ และอาศัยการเพิ่มขึ้นของ ionic strength ของบัฟเฟอร์ในการชะ (elute) โปรตีนออกจากตัวกลาง

และสุดท้ายโปรตีนสนใจที่ใช้ในการสกัดแยก และทำให้บริสุทธิ์นั้น มีสมบัติเป็นเอนไซม์ที่เรียกว่าเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ซึ่งทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการ reduce H_2O_2 ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งที่พืชใช้ในการป้องกันอันตราย และในขบวนการเมแทบอลิซึมของฮอร์โมนพืชด้วย โดยการวัดการทำงานของเปอร์ออกซิเดส (peroxidase activity) นั้น อาศัยสารละลาย 3,3-diamino benzidine เป็นสารตั้งต้นร่วมในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากเปอร์ออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน - รีดักชัน ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร

<u>การทดลอง</u>

<u>ตอนที่ 1 การสกัดแยกและตกตะกอนโปรตีนจากพืชตัวอย่าง</u>

<u>วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. กระติกน้ำแข็ง
2. ขวดเก็บตัวอย่าง
3. เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer, magnetic bar)
4. เครื่องชั่ง (balance)
5. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ (kitchen blender)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
7. ถุง Dialysis
8. แท่งแก้ว (stirring rod)
9. บีกเกอร์ (beaker)
10. ผ้าขาวบาง
11. พาราฟิล์ม (parafilm)
12. มีดและเขียง
13. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube)
14. หลอดทดลอง (test tube)

<u>สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$
2. น้ำกลั่น
3. น้ำแข็ง
4. พืชตัวอย่าง
5. สารละลายบัฟเฟอร์ acetate ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.5 (buffer A)
6. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.5 (buffer A)
7. Dowex

8. Polyvinylpoyrrolidone (PVPP)

วิธีการทดลอง

1. ให้แต่ละโต๊ะปฏิบัติการ (4 กลุ่ม) เตรียมตัวอย่างผักสด โต๊ะละ 200 กรัม ล้างให้สะอาด
2. ใช้มีดหั่นตัวอย่างผักสดให้มีขนาดเล็ก นำเข้าเครื่องปั่น เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.5 (สำหรับกลุ่มที่ใช้ตัวกลางเป็น DEAE-cellulose) หรือ สารละลายบัฟเฟอร์ acetate ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.5 5 (สำหรับกลุ่มที่ใช้ตัวกลางเป็น CM-cellulose) ที่เย็น ในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร และเติมสาร PVPP ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ทำการปั่นให้ละเอียด (ควรปั่นแล้วหยุดเป็นครั้งคราว เพื่อป้องกันความร้อนที่เกิดขึ้นจาก มอเตอร์ของเครื่องปั่น ซึ่งทำให้เอนไซม์เสียสภาพ)
3. เมื่อปั่นเสร็จแล้ว กรองส่วนที่ปั่นได้ด้วยผ้าขาวบางซ้อนทับกัน 2-3 ชั้น นำส่วนใสที่กรองได้มาเติมสาร Dowex ประมาณ 100 กรัม คนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่เย็นประมาณ 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว เทแยกส่วนใสออกมา นำไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ เรียกส่วนใสที่ได้นี้ว่า "**Cude extract**"
4. นำ crude extract ที่ได้มาแบ่งให้แต่ละกลุ่มภายในโต๊ะ (4 กลุ่ม) ในปริมาณที่เท่ากัน แต่ให้แบ่ง crude extract เก็บไว้ส่วนหนึ่งประมาณ 50 มิลลิลิตร เพื่อเป็น crude extract ของแต่ละกลุ่ม
5. แต่ละกลุ่มนำ crude extract ที่แบ่งได้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ตามตาราง ทำการตกตะกอน crude extract โดยค่อยๆ เติมเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ลงไปทีละน้อยพร้อมทั้งค่อยๆ คนเป็นวงกลมอย่างช้าๆ จนเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ละลายหมด (ตลอดการคนต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา)
6. เมื่อเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ละลายหมดแล้ว ให้นำไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนใสที่เรียกว่า "**Supernatant**" หรือ **"S"** และส่วนที่เป็นตะกอน โดยนำส่วนของตะกอนไปละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตรน้อยๆ พอให้ตะกอนละลายหมด ได้ส่วนที่เรียกว่า **"P_1"** (precipitate$_1$)
7. นำส่วน supernatant มาทำการตกตะกอนต่อด้วยเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นของเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ตามที่กำหนด ค่อยๆเติมเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ลงไปทีละน้อยพร้อมทั้งค่อยๆ คนเป็นวงกลมอย่างช้าๆ จนเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ละลายหมด (ตลอดการคนต้องแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา)
8. เมื่อเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ละลายหมดแล้ว ให้นำไปเซนติฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนใสที่เรียกว่า supernatant และส่วนที่เป็นตะกอน โดยนำส่วนของตะกอนไปละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ปริมาตรน้อยๆ พอให้ตะกอนละลายหมด ได้ส่วนที่เรียกว่า **"P_2"** (precipitate$_2$)
9. นำ P_2 ไปทำ Dialysis ในสารละลายบัฟเฟอร์
10. เก็บส่วนของ crude extract, P_1, P_2 และ supernatant ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

***หมายเหตุ** โดยตลอดการทดลองในทุกตอนของการทดลองห้ามทิ้งส่วนหนึ่งส่วนใดที่ได้จากการสกัดแยกและการทำให้บริสุทธิ์ ทั้งหมด เว้นแต่อาจารย์ผู้ควบคุมการทดลองสั่งให้ทิ้งได้

ตอนที่ 2 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี ชนิด Ion-exchange

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คิวเวตต์ (cuvette)
2. คอลัมน์บรรจุตัวกลาง (chromatography column)
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
5. แท่งแก้ว (stirring rod)
6. แท่นพร้อมที่ยึดคอลัมน์ (stand, base, clamp)
7. บีกเกอร์ (beaker)
8. ปิเปตต์ (pipette)
9. แร็ก (rack)
10. ลูกยาง (rubber bulb)
11. สายยาง (tubing)
12. หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube)
13. หลอดทดลอง (test tube)
14. หลอดหยด (dropper)
15. ออโตปิเปตต์พร้อมทิป (auto pipette, tip)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวกลาง (เรซิน) ชนิด CM-cellulose หรือ DEAE-cellulose
2. สารละลายบัฟเฟอร์ acetate ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.5 (buffer A)
3. สารละลายบัฟเฟอร์ acetate ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.5 + เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (buffer B)
4. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.5 (buffer A)
5. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.5 + เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (buffer B)
6. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์
7. สารละลาย DAB ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์

วิธีการทดลอง

1. ยึดคอลัมน์กับที่ยึดที่ประกอบอยู่แท่นยึดบนฐาน โดยปล่อยให้ปลายสายยางอยู่ด้านล่าง จากนั้นทำการไล่ฟองอากาศออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำ โดยปล่อยให้น้ำไหลออกจากปลายสายยางจนหมดฟองอากาศ จากนั้นเลื่อนลูกกลิ้งปิดสายยาง
2. เติม buffer A ลงไปประมาณ 1 ใน 3 ของคอลัมน์ จากนั้นค่อยๆ เติมเรซินที่ equilibrate ด้วย buffer A แล้ว โดยใช้แท่งแก้วช่วยคน และนำทางการไหลของเรซินลงสู่คอลัมน์
3. ปล่อยปลายสายยางออก เพื่อให้บัฟเฟอร์ไหลออก โดยปรับอัตราการไหลให้ได้ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 1 นาที เมื่อได้อัตราการไหลที่ต้องการแล้ว ให้ทำการ equilibrate resin ต่อด้วย buffer A อีก ประมาณ 1-2 เท่าของปริมาณเรซิน(ประมาณ 20 มิลลิลิตร) จากนั้นปล่อย buffer A ไหลออกจนเหลือระดับของ buffer A สูงจาก เรซินประมาณ 0.5 เซนติเมตร

4. นำ P_2 ที่ทำการ dialysis แล้ว ไปเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาโหลดลงในคอลัมน์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
5. ทำการ run column ด้วย buffer A โดยเก็บ fraction ที่ออกมา fraction ละ 3 มิลลิลิตร เรียกส่วนที่เก็บได้นี้ว่า **"Unbound fraction"** นำแต่ละ fraction ที่ออกมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ buffer A เป็น blank จนได้ค่า OD ประมาณ 0.05 (ไม่จำเป็นต้องวัดทุกหลอด จะวัดหลอดเว้นหลอดก็ได้)
6. จากนั้นทำการชะคอลัมน์ (elute column) ด้วย buffer B เก็บ fraction ละ 3 มิลลิลิตร เรียกส่วนที่เก็บได้นี้ว่า **"Bound fraction"** วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ buffer B เป็น blank จนได้ค่า OD ประมาณ 0.05 (ไม่จำเป็นต้องวัดทุกหลอด จะวัดหลอดเว้นหลอดก็ได้)
7. ตรวจสอบ activity ของแต่ละ fraction โดยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร โดยใช้ fraction ละ 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DAB ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในคิวเวตต์โดยใช้แผ่นพาราฟิล์มปิดปากคิวเวตต์ แล้วพลิกคิวเวตต์กลับไปมา ทำการ set blank จากนั้นเติม สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีเดิม วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 30 วินาที กับ 1 นาที (เริ่มจับเวลาตั้งแต่เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) บันทึกผล
8. นำค่าที่วัดได้จากการทดลองในข้อที่ (6) และ (7) มาสร้างกราฟ โดยให้แกน x เป็นจำนวน fraction (fraction No.) และแกน y เป็นค่า A_{280} และ A_{465}
9. ทำการรวมแต่ละ fraction (pool fraction) ที่มี activity สูง ทั้งส่วนของ unbound fraction (**Pool unbound**) และ bound fraction (**Pool bound**) (โดยนำค่าที่ได้ให้อาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง)
10. จากนั้นนำส่วนของ pool fraction ทั้ง pool unbound และ pool bound รวมทั้ง crude extract, P_1, P_2 และ supernatant นำส่งอาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง

***หมายเหตุ** สารละลาย DAB จัดเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง จึงควรใช้อย่างระมัดระวังไม่ให้สัมผัสถูกร่างกาย)

ตอนที่ 3 การตรวจหาและเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน และ enzyme activity จากที่สกัด ได้ และจากการทำให้บริสุทธิ์

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คิวเวตต์ (cuvette)
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer)
3. เครื่องผสมสาร (vortex mixture)
4. บีกเกอร์ (beaker)
5. ปิเปตต์ (pipette)
6. แร็ก (rack)
7. ลูกยาง (rubber bulb)
8. หลอดทดลอง (test tube)
9. ออโตปิเปตต์พร้อมทิป (auto pipette, tip)

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำกลั่น
2. ส่วนของโปรตีนที่ได้จากการสกัดแยก และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ได้แก่ crude extract, P_1, P_2, supernatant, pool unbound และ pool bound
3. สารละลายคอปเปอร์ (copper solution)
4. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
5. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์
6. สารละลาย DAB ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์
7. สารละลาย folin phenol : H_2O (อัตราส่วน 1:1)

วิธีการทดลอง

3.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry หรือ Folin-Ciocalteau Method

1. ปิเปตต์สารต่างๆ ตามปริมาตรในตาราง ลงในหลอดทดลองที่ 1-11

หลอด / สาร	ปริมาตร (มิลลิลิตร)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Std.BSA 1 mg/ml	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	-	-	-	-	-
H_2O	0.10	0.08	0.06	0.04	0.02	0.00	0.08	-	-	-	-
Crude	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	-	-
P_1	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-	-	-
P_2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-	-
pool unbound	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-
pool bound	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10

2. เติมสารละลายคอปเปอร์ ปริมาตรหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
3. เติมสารละลาย folin phenol reagent : H_2O (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตรหลอดละ 0.3 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร บันทึกผล

3.2 การหา activity ของเอนไซม์ในแต่ละส่วนที่แยกออกมาได้

1. ตรวจสอบ activity ของแต่ละตัวอย่าง (crude, P_1, P_2, pool unbound และ pool bound) โดยการใช้ตัวอย่างๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DAB ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในคิวเวตต์โดยใช้แผ่นพาราฟิล์มปิดปากคิวเวตต์ แล้วพลิกคิวเวตต์กลับไปมา ทำการ set blank
2. จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีเดิม วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 30 วินาที กับ 1 นาที (เริ่มจับเวลาตั้งแต่เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) บันทึกผล

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย Potassium sodium tartrate-$CuSO_4$

- เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในน้ำกลั่น ปริมาตร 960 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้น 3 นอร์มอล ลงไปในปริมาตร 35 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เรียกว่า "สารละลาย A"
- เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เรียกว่า "สารละลาย B"
- เตรียมสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต ($KNaC_4H_4O_6 . 4H_2O$) ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เรียกว่า "สารละลาย C"
- นำสารละลาย B ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย C ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรจากนั้นเติมสารละลาย A ลงไปปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และใช้ทันที

2. สารละลาย DAB

- ละลาย diamino benzidine hydrochloride ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0

<u>รายงานผลการทดลอง</u>

<u>เรื่อง การสกัดแยกโปรตีนจากพืชบางชนิด</u>

ชื่อผู้ทดลองและเขียนรายงาน_____รหัส_____

ชื่อผู้ร่วมทดลอง 1. _____ รหัส_____

2. _____ รหัส_____

กลุ่มที่_____section/วันที่ทำการทดลอง_____เวลา_____

ห้องที่ทำการทดลอง_____

อาจารย์ผู้ควบคุมการทดลอง 1. _____

2. _____

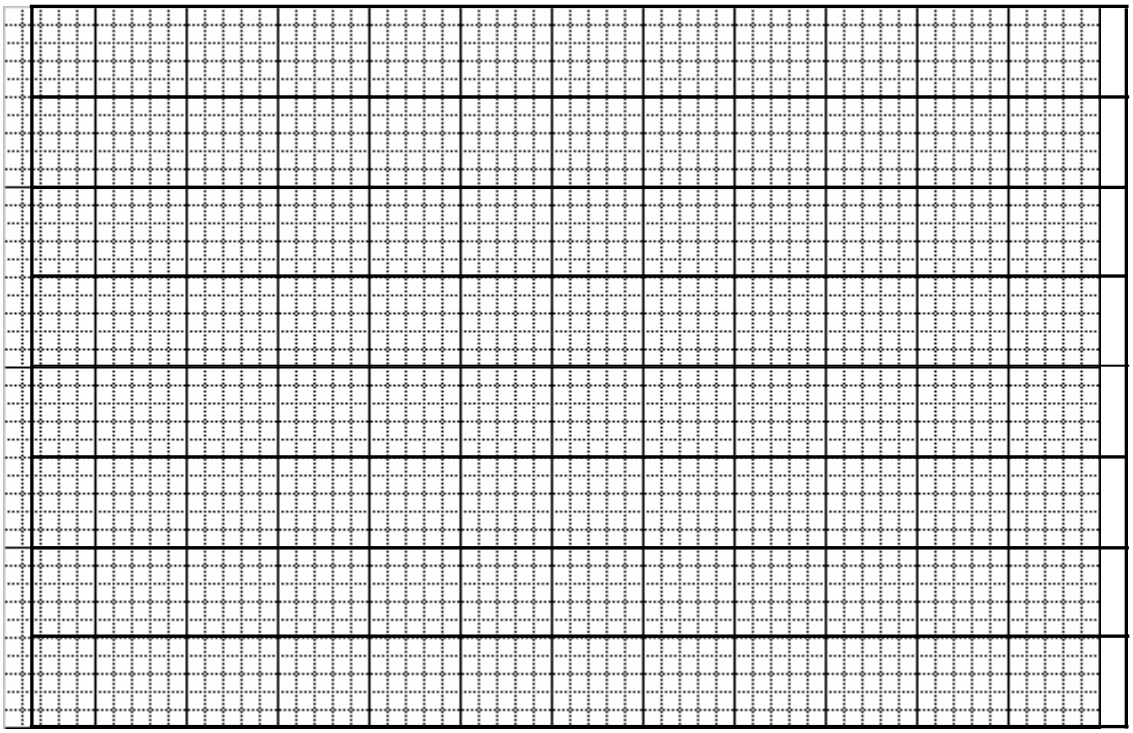
.....

<u>ตอนที่ 1</u> การสกัดแยกและตกตะกอนโปรตีนจากพืชตัวอย่าง

วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง
1.1 น้ำหนักของพืชตัวอย่างที่ใช้	.....กรัม
1.2 ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่เติม	.....มิลลิลิตร
1.3 ปริมาตรของ Crude enzyme ที่ได้ทั้งหมด	.....มิลลิลิตร
1.4 ปริมาตรของ Crude enzyme ที่ใช้ตกตะกอน	.....มิลลิลิตร
1.5 ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เติมครั้งแรก (.....%)	.....กรัม
1.6 ปริมาตรของตะกอนที่ละลายได้ในการตกตะกอนครั้งแรก (P_1)	.....มิลลิลิตร
1.7 ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เติมครั้งที่สอง (.....%)	.....กรัม
1.8 ปริมาตรของตะกอนที่ละลายได้ในการตกตะกอนครั้งที่สอง (P_2)	.....มิลลิลิตร
1.9 ปริมาตรของ Supernate	.....มิลลิลิตร
2.0 ปริมาตรของ P_2 หลังจาก dialysis	.....มิลลิลิตร

<u>ตอนที่ 2</u> ผลการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีชนิด.....

วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง
2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการโหลดคอลัมน์	.....
2.2 ปริมาณที่ใช้ในการโหลด	.....มิลลิลิตร
2.3 ค่า A_{280} และ A_{465} ของ	
-fraction ที่	..... , ...
-fraction ที่	..... , ...
-fraction ที่	..... , ...



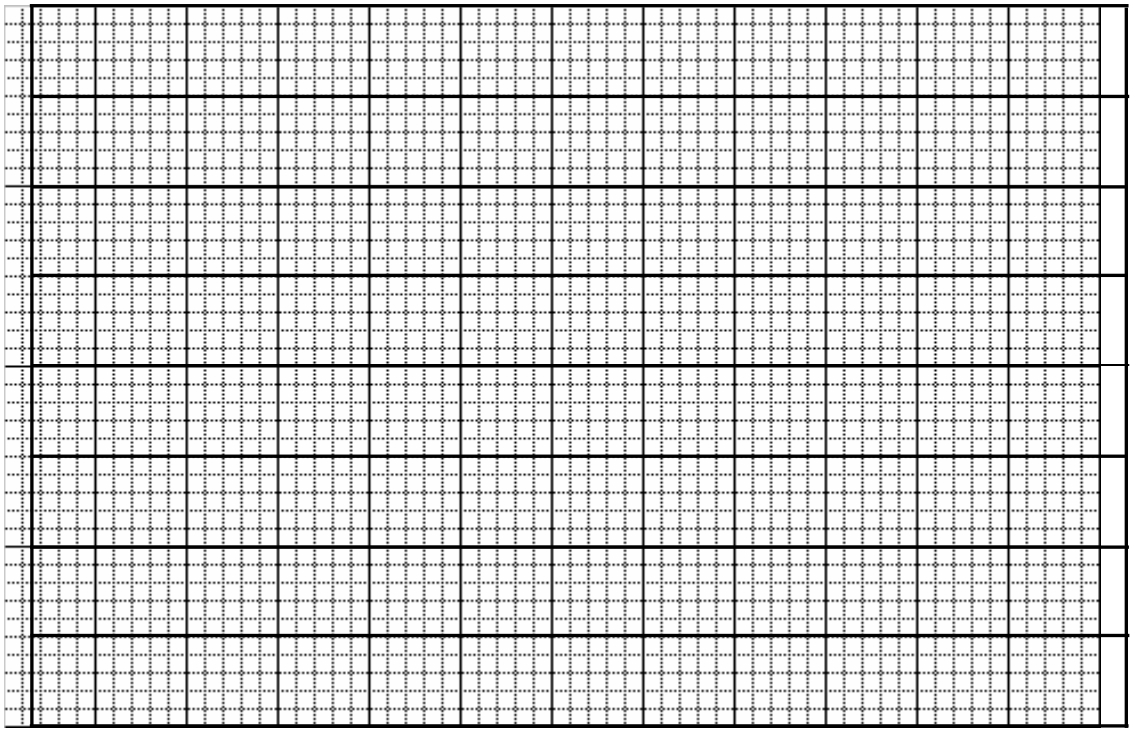
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ fraction ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบ ion-exchange กับค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และ 465 นาโนเมตร

<u>ตอนที่ 3</u> การตรวจหาและเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน และ enzyme activity จากที่สกัดได้ และจากการทำให้บริสุทธิ์

3.1 ผลการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry หรือ Folin-Ciocalteau Method

หลอด / สาร	ปริมาตร (มิลลิลิตร)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Std.BSA 1 mg/ml	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	-	-	-	-	-
H_2O	0.10	0.08	0.06	0.04	0.02	0.00	0.08	-	-	-	-
Crude	-	-	-	-	-	-	0.02	-	-	-	-

P_1	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-	-	-
P_2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-	-
Pool unbound	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	-
Pool bound	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10
OD 650	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
mg protein/ml	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Total mg protein	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 650 และปริมาณโปรตีนมาตรฐาน BSA (ไมโครกรัม)

<u>วิธีการหาปริมาณโปรตีน</u>

3.2 ผลการหา activity ของเอนไซม์ในแต่ละส่วนที่แยกออกมาได้

สารตัวอย่าง	OD465	Activity/ml	Total activity
Crude	.....	.....	.....
P_1	.....	.....	.....
P_2	.....	.....	.....
Pool unbound	.....	.....	.....
Pool bound	.....	.....	.....

<u>วิธีการคำนวณค่า Activity, Total activity และ Specific activity</u>

ตารางสรุปผลการทำบริสุทธิ์ของโปรตีนที่สกัดได้ (Table of purification)

Fraction	Volume (ml)	Total activity (OD465)	Total protein (mg)	% Yield	Specific activity (OD465/mg)	Fold of purification
Crude	……..	……	……	……..	……...	……...
P_1	……..	……	……	……..	……..	……...
P_2	……..	……	……	……..	……..	……...
Pool unbound	……..	……	……	……..	……...	……...
Pool bound	……...	……	……	……..	……...	……...

<u>สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง</u>

<u>คำถามท้ายบท</u>

1. เพราะเหตุใด ในทุกขั้นตอนของการสกัดแยก และการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนจึงต้องคำนึงถึงภาวะสภาพตามธรรมชาติของโปรตีน
2. เพราะเหตุใด ในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนจึงเป็นการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้บางส่วน จงอธิบาย
3. เพราะเหตุใด ในปฏิบัติการขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ได้ใช้ชนิดของเรซินต่างกัน จึงต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต่างกันด้วย จงอธิบาย
4. จากตารางการทำบริสุทธิ์ (Table of purification) นักศึกษาสามารถทราบข้อมูลอะไรได้บ้าง
5. จากการทดลองการสกัดแยก และการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์นั้น นักศึกษาคิดว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรมได้อย่างไรบ้าง