

การศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ไฟรีนชนิดใหม่และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2555

การศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ไฟรีนชนิดใหม่และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2555

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ไฟรินชนิดใหม่และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2555

สุดารัตน์ เย็นใจ. (2555). การศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่และสารประกอบเชิงซ้อนของ

โลหะทรานซิชัน. ปริญญาโท วท.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิญา ชัยวิสุทธิราษฎร์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ดร. ธีรยุทธ ลีพรเจริญวงศ์.

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการตัดโปรตีน ด้วยสารสังเคราะห์ D-5-glucopyranosyl-4(1-pyrene) butyramide (Py-glucose) โดยกระตุ้นปฏิกิริยาด้วยแสง ซึ่งจะเกิดการตัดโปรตีนเมื่อฉายแสงไปยังสารละลายผสมของโปรตีน Py-glucose และตัวรับอิเล็กตรอน (Cobalt(III)hexamine trichloride (CoHA)) ที่ความยาวคลื่น 352 nm ซึ่งการตัดโปรตีนจะไม่เกิดขึ้นหากขาดสารตัวใดตัวหนึ่ง หรือแสง จากการศึกษาพบว่า lysozyme และ avidin ถูกตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ โดย lysozyme ถูกตัด 1 ตำแหน่ง โดยปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นเมื่อใช้เวลาในการฉายแสงเพียง 3 นาที เมื่อคำนวณหามวลโมเลกุลโดยประมาณ พบว่ามีมวลโมเลกุล 7.57 และ 4.18 kDa ส่วน avidin ถูกตัด 1 ตำแหน่ง เมื่อทำการฉายแสงที่ 352 nm ไปยังสารละลายผสมเป็นเวลา 5 นาที เมื่อคำนวณหามวลโมเลกุลพบว่ามีมวลโมเลกุลประมาณ 7.01 kDa และ 5.01 kDa นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการตัดโปรตีน ด้วย molybdenum cluster โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกที่ใช้ molybdenum cluster ในการตัดโปรตีนเป็นผลสำเร็จ โดย molybdenum cluster ที่สนใจคือ ammonium heptamolybdate tetrahydrate $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อนำสารละลายผสมของ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.125 mM) และ pepsin 15 (μM) มาบ่มที่ความร้อน 37°C เป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง พบว่าสามารถตัด pepsin ได้ 3 ตำแหน่ง โดยมีมวลโมเลกุลของ fragment ประมาณ 23, 19 และ 16 (kDa) ตามลำดับ โดยการหาลำดับกรดอะมิโนจากปลายด้าน N-terminal ของ fragment ที่เกิดจากการตัด พบว่าการตัดเกิดขึ้นระหว่าง Leu 112-Tyr 113, Leu 166-Leu 167 และ Leu 178-Asn 179 จากการทดลองพบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เมื่อทำการบ่มสารละลายผสมเพียง 2 ชั่วโมงเท่านั้น แต่ถ้าใช้เวลานานถึง 72 ชั่วโมงพบว่าประสิทธิภาพการตัดโปรตีนจะลดลง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ molybdenum cluster ใช้น้อยมากเพียง 0.125 mM ก็เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยา และปฏิกิริยาสามารถเกิดได้โดยไม่ต้องเติม reducing agents ซึ่งกลไกการเกิดปฏิกิริยาคาดว่าเป็นแบบไฮโดรไลซิส ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการออกแบบยาต่อไป

PROTEIN CLEAVAGE STUDIES BY NEW PYRENYL PROBE AND TRANSITION METAL COMPLEX



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

May 2012

Sudarat Yenjai. (2012). *Protein cleavage studies by new pyrenyl probe and transition metal complex*.

Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University.

Advisor Committee: Assistant Professor Dr. Apinya Chaivisuthangkura, Assistant Professor Dr. Teerayuth Liwporncharoenwong.

In this study, the photocleavage of protein by D-5-glucopyranosyl-4(1-pyrene)butyramide (Py-glucose) is examined. The photocleavage of protein was achieved upon irradiation of a mixture of protein, Py-glucose and an electron acceptor (Cobalt(III)hexammine trichloride, CoHA) at 352 nm. The cleavage of protein was not achieved in the absence of either the probe, an electron acceptor or light. From the study, lysozyme and avidin were photocleaved at specific sites. The cleavage of lysozyme showed one cleavage site when the reaction mixture was irradiated at 352 nm only for 3 min, resulting to two fragments with molecular weights of approximately 7.01 and 4.18 kDa. The avidin cleavage resulted to at least two fragments when irradiation of the reaction mixture at 352 nm for 5 min with molecular weights of approximately 7.01 and 5.01 (kDa). In addition, we also study the thermal cleavage of protein using a molybdenum cluster under mild conditions for the first time. Molybdenum cluster of interest here is ammonium heptamolybdate-tetrahydrate $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$. When a mixture of $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.125 mM) and pepsin (15 μM), was incubated at 37°C for 2-24 hr the protein was specifically cleaved into at least three fragments with molecular weights of ~23, ~19 and ~16 kDa which could be observed on the gel. *N*-terminal sequencing of the peptide fragments indicated three cleavage sites of pepsin between Leu 112-Tyr 113, Leu 166-Leu 167 and Leu 178-Asn 179. The cleavage reaction occurs after incubation of the mixture of pepsin and $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ only for 2 hr. Longer incubation time of the metal cluster protein mixture up to 72 hr showed loss of specificity as shown by smeared protein bands on SDS-PAGE. However, molybdenum cluster concentration, as low as 0.125 mM., was adequate for the protein cleavage reaction. Reducing agents was not needed for the reaction to occur. The mechanism for cleavage of pepsin is expected to be hydrolysis. The results from this study could be a benefit for medicinal process in the future.

ปริญญาโท

เรื่อง

การศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน

ของ

สุดาร์ตน์ เย็นใจ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่ เดือน พ.ศ.

คณะกรรมการควบคุมปริญญาโท

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาโท

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ ลีพรเจริญวงศ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ ลีพรเจริญวงศ์)

..... กรรมการ

(ดร. ปฐมาพร อำนาจอนันต์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จาก

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



ประกาศคุณูปการ

ปริญญาโทฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์อย่างยิ่ง จากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร ประธานควบคุมปริญญาโท และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ ลีพรเจริญวงศ์ คณะกรรมการควบคุมปริญญาโท ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำชี้แนะ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการแก้ปัญหาทุกชั้นตอนอันเกิดจากการวิจัยและการเขียนปริญญาโท

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญาโท และ ดร.ปฐมพร อานาจอนันต์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาโท ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้ปริญญาโทฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ ประธานกรรมการบริหารหลักสูตร รวมถึง ดร.พนารัตน์ อรุณรัตติยากร อาจารย์ที่ปรึกษา และคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาเอาใจใส่แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกๆ ท่านเป็นอย่างยิ่ง

ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดาและญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณอาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกๆ ท่านที่มีได้กล่าวรายนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดารัตน์ เย็นใจ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
กรดอะมิโน.....	4
โปรตีน.....	6
อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	9
การหาลำดับกรดอะมิโน.....	17
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	28
การสังเคราะห์และตรวจสอบโครงสร้างของผลิตภัณฑ์.....	30
การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการกระตุ้นด้วยแสง.....	31
การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน.....	31
การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	31
การย้ายโปรตีนโดย Western blot (protein transfer).....	33
4 ผลการวิจัย	35
การตัดโปรตีน ด้วยอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง.....	35
การสังเคราะห์และตรวจสอบโครงสร้างของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่.....	35
การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการกระตุ้นด้วยแสง.....	38
การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	39

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 (ต่อ)	
การตัดโปรตีน ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทนซีชัน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน.....	50
การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน.....	50
การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	50
การย้ายโปรตีนโดย Western blot (protein transfer).....	52
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	53
การตัดโปรตีน ด้วยอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง.....	53
การตัดโปรตีน ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทนซีชัน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน....	56
บรรณานุกรม	58
อภิธานศัพท์	62
ประวัติย่อผู้วิจัย	64

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ช่วงของโปรตีนที่ต้องการแยกโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	12
2 องค์ประกอบของ separating gel และ stacking gel.....	13
3 การเตรียมสารละลายผสม เพื่อศึกษาการตัดโปรตีนด้วยแสง.....	38
4 การคำนวณหามวลโมเลกุลของเพปไทด์ที่ได้จากการตัด lysozyme.....	41
5 การคำนวณหามวลโมเลกุลของเพปไทด์ที่ได้จากการตัด avidin.....	43
6 การเตรียมสารละลายผสม เพื่อศึกษาการตัดโปรตีนด้วยความร้อน.....	50
7 ผลการทดสอบการตัดโปรตีนด้วยแสง.....	54



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน.....	4
2 การเกิด ionization ของกรดอะมิโน.....	5
3 กรดอะมิโนพื้นฐาน 20 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน.....	6
4 การเกิดพันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโน.....	7
5 โครงสร้างทั้ง 4 แบบของโปรตีน.....	8
6 โครงสร้างของอะคริลาไมด์ โครงสร้างของเมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ และโครงสร้างของ <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine (TEMED).....	10
7 ปฏิกริยาการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันของอะคริลาไมด์.....	10
8 โครงสร้างของ SDS และการจับของ SDS กับกรดอะมิโนในโปรตีนทำให้โมเลกุล เหยียดยาวออกและมีประจุเป็นลบ.....	11
9 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ประกอบด้วย stacking gel และ running gel.....	13
10 โครงสร้างของ Tris-HCl โครงสร้างของไทรซีน และโครงสร้างของไกลซีน.....	14
11 การแยกโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี tricine-SDS-PAGE และวิธี glycine-SDS-PAGE.....	14
12 การประกอบเจลเข้ากับอุปกรณ์.....	15
13 การเติมบัฟเฟอร์ที่ขั้วบวก และขั้วลบ รวมถึงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนผ่าน รูพรุนของเจล.....	15
14 โครงสร้างของ 2-mercaptoethanol และโครงสร้างของ dithiothreitol.....	16
15 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล (log M) กับการเคลื่อนที่ของโปรตีน มาตรฐานบนเจล.....	17
16 ปฏิกริยาของ Edman degradation.....	18
17 กลไกที่เป็นไปได้ในการตัดโปรตีน.....	19
18 โครงสร้างอนุพันธ์ของแอนทราซีน.....	20
19 โครงสร้างอนุพันธ์ของไพรีน.....	20
20 การออกแบบโมเลกุลเพื่อใช้ในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ.....	20
21 โครงสร้างของ Py-Phe.....	20
22 โครงสร้างของ Py-Gly-Phe.....	21
23 โครงสร้างของ Py-Gly-X (โดยที่ X = Trp, Tyr และ His).....	21
24 โครงสร้างของ Py-L-Phe และโครงสร้างของ Py-D-Phe.....	22
25 โครงสร้างของ PMA-L-Phe และโครงสร้างของ PMA-D-Phe.....	23

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
26 โครงสร้างของ Py-biotin.....	24
27 โครงสร้างของ D-(+)-glucose.....	24
28 โครงสร้างของ 1-OAc sugar โครงสร้างของ anthracene derivative โครงสร้างของ 2-anthrylmethyl 3-N,N'-dimethylamino-2,3,6-trideoxy- α -D-arabino-hexopyranoside และโครงสร้างของ 2-anthrylmethyl 3-N,N'-dimethylamino-2,3,6-trideoxy- β -D-arabino-hexopyranoside.....	25
29 โครงสร้างของ glycosyl acetate โครงสร้างของ 2-anthrylmethyl 3-amino-2,3,6-trideoxy- α -D-arabino-hexopyranoside และโครงสร้างของ 2-anthrylmethyl 3-amino-2,3,6-trideoxy- β -D-arabino-hexopyranoside.....	25
30 ปฏิกริยาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีน.....	30
31 การเตรียมอุปกรณ์สำหรับการย้ายโปรตีน.....	34
32 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-glucose.....	36
33 กราฟมาตรฐาน Py-glucose.....	36
34 สเปกตรัมการคายแสงของ Py-glucose.....	37
35 SDS-PAGE ของการตัด lysozyme ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง.....	39
36 SDS-PAGE ของการตัด lysozyme ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง.....	40
37 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล (log MW) ของโปรตีนมาตรฐานกับ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเพปไทด์บนเจล.....	41
38 SDS-PAGE ของการตัด avidin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง.....	42
39 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล (log MW) ของโปรตีนมาตรฐานกับ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเพปไทด์บนเจล.....	43
40 SDS-PAGE ของ BSA.....	44
41 SDS-PAGE ของ lectin.....	45
42 SDS-PAGE ของ L-amino acid.....	45
43 SDS-PAGE ของ myoglobin.....	46
44 SDS-PAGE ของ β -glucosidase.....	46
45 SDS-PAGE ของ α -casein.....	47
46 SDS-PAGE ของ α -chymotrypsin.....	47
47 SDS-PAGE ของ pepsin.....	48

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
48 SDS-PAGE ของ β -lactoglobulin B.....	48
49 SDS-PAGE ของ concanavalin A.....	49
50 SDS-PAGE ของการตัด pepsin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยความร้อน.....	51
51 SDS-PAGE ของการตัด pepsin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยความร้อน.....	52
52 กลไกที่เป็นไปได้ในการตัดโปรตีน.....	56
53 โครงสร้างของ ammoniumheptamolybdate-tetrahydrate.....	56
54 มวลโมเลกุลของ pepsin และมวลโมเลกุลของทั้ง 6 fragments.....	57



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การตัดโปรตีนหรือเปปไทด์ขนาดใหญ่ให้เล็กลง โดยทั่วไปจะใช้เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ส่วนใหญ่มีราคาแพง จึงได้มีนักวิจัยต่างๆ พยายามที่จะออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลที่สามารถตัดโปรตีนได้ แต่ในปัจจุบันสารเคมีที่สามารถใช้ตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงมีน้อยมาก เนื่องจากพันธะเปปไทด์มีความเสถียรสูง กล่าวคือมีครึ่งชีวิต (half life) ประมาณ 7 ปี ที่อุณหภูมิ 25°C และ pH 7 (Kahne; & Skill. 1988: 7529) โมเลกุลเหล่านี้นอกจากจะใช้ตัดโปรตีนหรือเปปไทด์ขนาดใหญ่ให้เล็กลง เพื่อเป็นประโยชน์ในการหาลำดับของกรดอะมิโนแล้ว (amino acid sequencing) ยังสามารถทำหน้าที่เป็น probe ในการศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีน (protein structural domains) (Rana; & Meares. 1991: 1859); (Ettner; et al. 1995: 22) และความสัมพันธ์ของ activity กับโครงสร้างของโปรตีน รวมทั้งการศึกษาถึงอันตรกิริยาของโมเลกุลขนาดเล็กกับโปรตีน (ligand-protein binding interaction) ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการออกแบบและผลิตยาชนิดใหม่ได้ในอนาคต (Hegg; et al. 1999: 2961)

การกระตุ้นปฏิกิริยาเมื่อโมเลกุลเหล่านี้จับกับโปรตีน สามารถทำได้ 2 ทางคือ ปฏิกิริยาทางแสง (photo reaction) และปฏิกิริยาทางความร้อน (thermal reaction)

กรณีปฏิกิริยาที่กระตุ้นด้วยแสง เป็นการตัดโปรตีนโดยใช้โมเลกุลสังเคราะห์เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่รับแสง (probe) เช่น การตัดโปรตีน bovine serum albumin (BSA) และ chicken egg-white lysozyme โดยใช้อนุพันธ์ไพรีน *N*-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene) butyramide (Py-Phe) (Kumar; et al. 1997: 2085); (Kumar; et al. 1998: 10361) และอนุพันธ์ไพรีนในรูป Py-(Gly)_n-Phe (n=0, 1, 2) (Kumar; et al. 1999: 4202) รวมถึงอนุพันธ์ไพรีนในรูป Py-Gly-X (X = Tyr, Trp, His) (Buranaprapuk; et al. 2000: 7019) ซึ่งการตัดโปรตีนจะเกิดขึ้นได้เมื่อฉายแสงที่มีความยาวคลื่น 344 nm (λ_{max} ของ pyrene) ไปยังสารละลายผสมของโปรตีน probe และตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) โดยกลไกของปฏิกิริยาจะเกิดการรับอิเล็กตรอนของ electron acceptor จาก Py* แล้วเกิดอนุมูลประจุบวกของไพรีน (pyrene cation radical; Py⁺) เป็น intermediate ซึ่ง Py⁺ ที่เกิดขึ้นสามารถดึงอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom abstraction) บนคาร์บอนตำแหน่งแอลฟาของกรดอะมิโนในโปรตีน ก่อให้เกิดการสลายของพันธะเปปไทด์ได้

กรณีปฏิกิริยาที่กระตุ้นด้วยความร้อน เป็นการนำสารประกอบเชิงซ้อน หรือไอออนของ โลหะแทรนซิชันมาใช้ในการตัดโปรตีน และดีเอ็นเอ (DNA) (Buranaprapuk; et al. 1998: 309) เช่น โลหะ Fe^{2+} , Co^{3+} เป็นต้น ยกตัวอย่างการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนที่มี trifluoperazine (TFE) ต่อกับ iron(II) ethylenediamine (Fe(EDTA)) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน TFE-Fe(EDTA) เพื่อใช้ในการจับ calmodulin (Schepartz; & Cuenoud. 1990: 3247) เนื่องจาก TFE สามารถจับกับ calmodulin ได้ที่ ตำแหน่งจำเพาะ ดังนั้น TFE จะพาสารประกอบเชิงซ้อนไปที่ binding site ของ TFE ใน calmodulin จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนจะถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา โดยการเติม reducing agent และ H_2O_2 กลไก การเกิดปฏิกิริยาเป็นแบบออกซิเดชัน (oxidative mechanism) โดยเกิด hydroxyl radical (OH^{\cdot}) ซึ่งเป็น โมเลกุลที่เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีน และทำให้เกิดการแตกของพันธะเพปไทด์ จากการทดลองพบว่า calmodulin ถูกตัดได้ 6 เพปไทด์ย่อย แต่วิธีนี้ได้ผลผลิตของเพปไทด์ที่ถูกตัดในปริมาณที่ต่ำ และการ ตัดแปลงโปรตีนที่กรดอะมิโนจำเพาะทำได้ยากนอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอาจทำลาย โปรตีนตรงบริเวณที่ถูกตัด ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ของสายเพปไทด์ที่ถูกตัดได้ นอกจากนี้ การใช้สารประกอบเชิงซ้อนของ Co^{3+} ได้แก่ pentammineaquocobalt(III) chloride และ tetramminediaquocobalt(III) chloride ในการตัด lysozyme โดยพบว่า lysozyme ถูกตัดระหว่างกรดอะมิโน Ala (110) และ Trp (111) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้น เมื่อนำสารละลายผสมระหว่าง lysozyme กับ pentammineaquocobalt(III) chloride หรือ tetramminediaquocobalt(III) chloride มาบ่ม (incubate) ที่ $37^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งก่อให้เกิดการ สลายของพันธะเพปไทด์ (Kumar; et al. 2000: 597) และคาดว่ากลไกของการตัดโปรตีนที่เกิดขึ้น เป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolytic reaction) ของพันธะเอไมด์ (amide bond) โดยโมเลกุลของน้ำ เข้ามาจับกับไอออนของโลหะ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ $Co(III)$ complex ซึ่งกลไกการตัดโปรตีนแบบไฮโดรไลซิสเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เนื่องจากกลไกการตัดโปรตีนแบบไฮโดรไล ซิสนี้ดีกว่ากลไกการตัดโปรตีนแบบออกซิเดชัน เพราะการเกิดไฮโดรไลซิส ไม่จำเป็นต้องใช้ reducing agent และไม่ทำลายโปรตีนตรงบริเวณที่ถูกตัด ทำให้สามารถวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนได้

จากที่กล่าวมาข้างต้น การสังเคราะห์โมเลกุลขนาดเล็กที่มีหมู่ที่ทำหน้าที่รับแสง เพื่อ เกิดปฏิกิริยาเคมีแสง ในการตัดโปรตีน และการพัฒนาสารประกอบเชิงซ้อน หรือไอออนของ โลหะแทรนซิชันชนิดใหม่ โดยไม่ใส่ reducing agent เพื่อใช้ในการตัดโปรตีนผ่านกลไกแบบ ไฮโดรไลซิส จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และท้าทาย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. สังเคราะห์โมเลกุลของอนุพันธ์ไฟรีนชนิดใหม่
2. ศึกษาปฏิกิริยาและกลไกการตัดโปรตีนโดยอนุพันธ์ไฟรีน และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะอย่างมีประสิทธิภาพ

ความสำคัญของงานวิจัย

1. ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมที่เกิดการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยอนุพันธ์ไฟรีน และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน
2. ทำให้ทราบถึงลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยอนุพันธ์ไฟรีน และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน
3. เป็นพื้นฐานสำหรับงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง และเพื่อเป็นการประยุกต์ใช้ และเป็นประโยชน์ในการออกแบบยาที่สามารถจับกับเอนไซม์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ขอบเขตของการวิจัย

1. สังเคราะห์โมเลกุลของอนุพันธ์ไฟรีนชนิดใหม่
2. ศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ไฟรีน และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันแล้วตรวจสอบผลการตัดโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
3. หาลำดับกรดอะมิโนของสายพอลิเพปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีน

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. สังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของอนุพันธ์ไฟรีนชนิดใหม่
2. ศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ไฟรีนชนิดใหม่โดยใช้ปฏิกิริยาเคมีแสง และสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชันโดยใช้ปฏิกิริยาทางความร้อน
3. หาลำดับกรดอะมิโนของสายพอลิเพปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีน

บทที่ 2

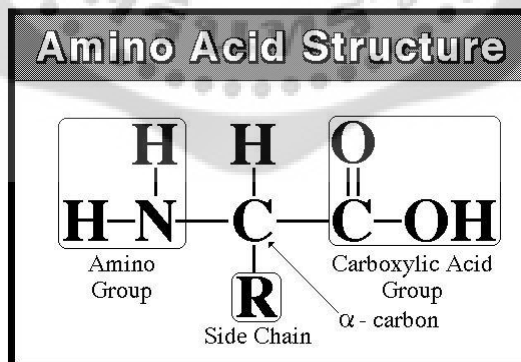
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้อนุพันธ์ขนาดเล็กในการตัดโปรตีน โดยปฏิกิริยาสามารถถูกกระตุ้นด้วยแสงหรือด้วยความร้อน การตัดโปรตีนโดยการกระตุ้นด้วยแสงนั้นจะใช้อนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ ส่วนการตัดโปรตีนโดยการกระตุ้นด้วยความร้อนจะใช้สารประกอบเชิงซ้อนหรือไอออนของโลหะแทรนซิชัน ผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

1. กรดอะมิโน
2. โปรตีน
3. อิเล็กโทรโฟรีซิส
4. การหาลำดับกรดอะมิโน
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กรดอะมิโน

กรดอะมิโน (amino acid) เป็นโครงสร้างพื้นฐานของโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด กรดอะมิโนแต่ละชนิดประกอบไปด้วย หมู่ฟังก์ชันอะมิโน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) หมู่ฟังก์ชัน ($-R$) ซึ่งเป็นแขนด้านข้าง (side chain) ซึ่งมีความเฉพาะสำหรับกรดอะมิโนแต่ละตัว ต่ออยู่กับคาร์บอนตำแหน่งกลางที่เรียกว่า α -carbon (ภาพประกอบ 1)

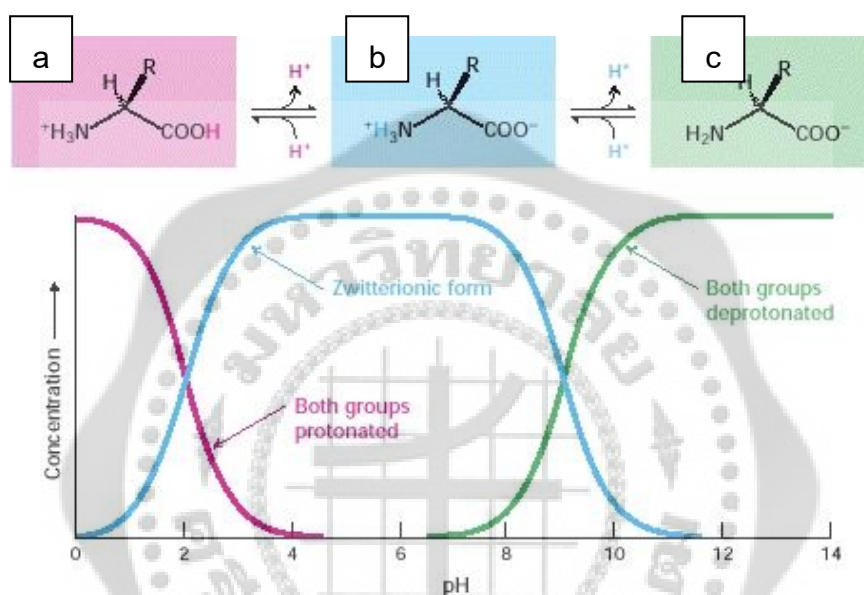


ภาพประกอบ 1 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน ในรูป un-ionized form
ที่มา : Nelson, D.L.; and Cox, M.M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*.

ถ้ากรดอะมิโนอยู่ในสารละลายที่มี pH เป็นกลาง (neutral pH) จะอยู่ในรูป dipolar ions (zwitterions) มากกว่าในรูปที่ไม่มีประจุ (un-ionized form) โดยหมู่อะมิโนเกิด -NH_3^+ และหมู่คาร์บอกซิลิกเกิด -COO^- (ภาพประกอบ 2(b))

ถ้ากรดอะมิโนอยู่ในสารละลายที่มี pH เป็นกรด (acid solution) (ภาพประกอบ 2(a)) คือ หมู่อะมิโนเกิด -NH_3^+ ส่วนหมู่คาร์บอกซิลิกอยู่ในรูปที่ไม่มีประจุ -COOH

ถ้ากรดอะมิโนอยู่ในสารละลายที่มี pH เป็นเบส (alkaline solution) (ภาพประกอบที่ 2(c)) คือ หมู่อะมิโนอยู่ในรูปที่ไม่มีประจุ -NH_2 ส่วนหมู่คาร์บอกซิลิกเกิด -COO^-



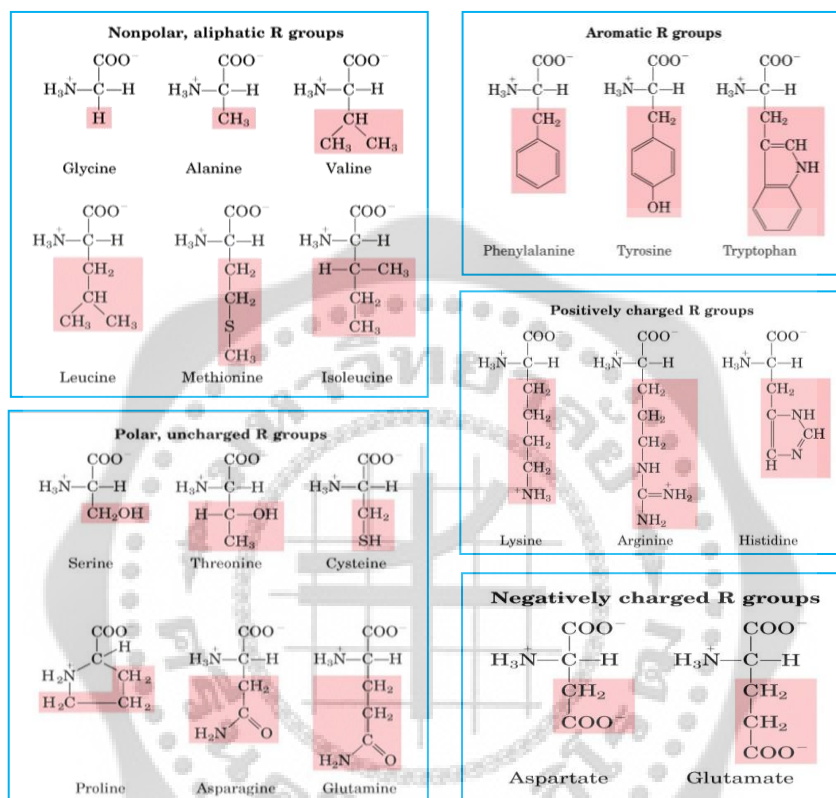
ภาพประกอบ 2 การเกิด ionization ของกรดอะมิโน

ที่มา : Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; and Stryer, L. (2002). *W.H. Biochemistry*.

สิ่งมีชีวิตสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้จากการใช้กรดอะมิโนเป็นสารตั้งต้น โดยกรดอะมิโนพื้นฐานมี 20 ชนิด สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่มตามความมีขั้วของหมู่ R ที่ pH 6.0-7.0 (ช่วง pH ที่พบภายในเซลล์) (ภาพประกอบ 3)

1. กลุ่มที่ไม่มีขั้ว (nonpolar)
2. กลุ่มที่มีวงแโรมาติก (aromatic)
3. กลุ่มที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุ (uncharged polar)
4. กลุ่มที่มีประจุบวก (positively charge)
5. กลุ่มที่มีประจุลบ (negatively charge)

จากกรดอะมิโนพื้นฐานทั้ง 20 ชนิด บางชนิดร่างกายสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เอง บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ ซึ่งกรดอะมิโนที่ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้นั้น เรียกว่า กรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) โดยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อมนุษย์ ได้แก่ เมไทโอนีน (methionine), ไลซีน (lysine), เวลีน (valine), ลิวซีน (leucine), ไอโซลิวซีน (isoleucine), เบนซิลอะลานีน (phenylalanine) และทริปโตเฟน (tryptophan)

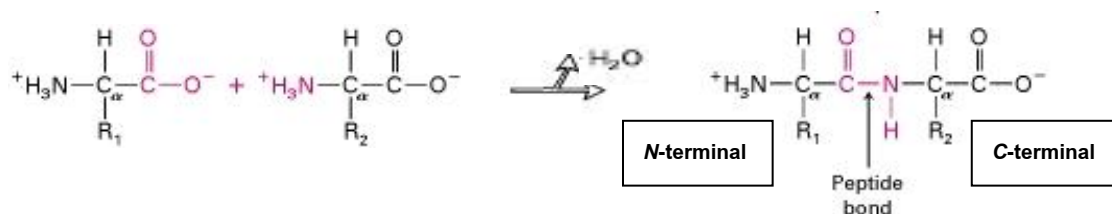


ภาพประกอบ 3 กรดอะมิโนพื้นฐาน 20 ชนิด

ที่มา : Nelson, D.L.; and Cox, M.M. (2008). *Principle of biochemistry*.

2. โปรตีน

โปรตีน เกิดจากหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวหนึ่ง เชื่อมต่อกับหมู่เอมิโนของกรดอะมิโนตัวถัดไป เกิดการสูญเสียน้ำไป 1 โมเลกุล พันธะที่เกิดขึ้นเรียกว่า พันธะเพปไทด์ (peptide bond) (ภาพประกอบ 4) เมื่อกรดอะมิโนมากกว่า 10 หน่วยขึ้นไป เกิดการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ไปเรื่อยๆ จะเกิดเป็นสายพอลิเพปไทด์ขึ้น โดยปลายสายของพอลิเพปไทด์ด้านหนึ่งที่มีหมู่เอมิโนอิสระ (ทางด้านซ้ายของสายพอลิเพปไทด์) เรียกว่า amino terminal หรือปลาย N (N-terminal) ส่วนปลายสายของพอลิเพปไทด์ ที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (ทางด้านขวาของสายพอลิเพปไทด์) เรียกว่า carboxyl terminal หรือปลาย C (C-terminal)



ภาพประกอบ 4 การเกิดพันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโน

ที่มา : Lodish, H.; Berk, A.; et al. (2000). *Molecular cell biology*.

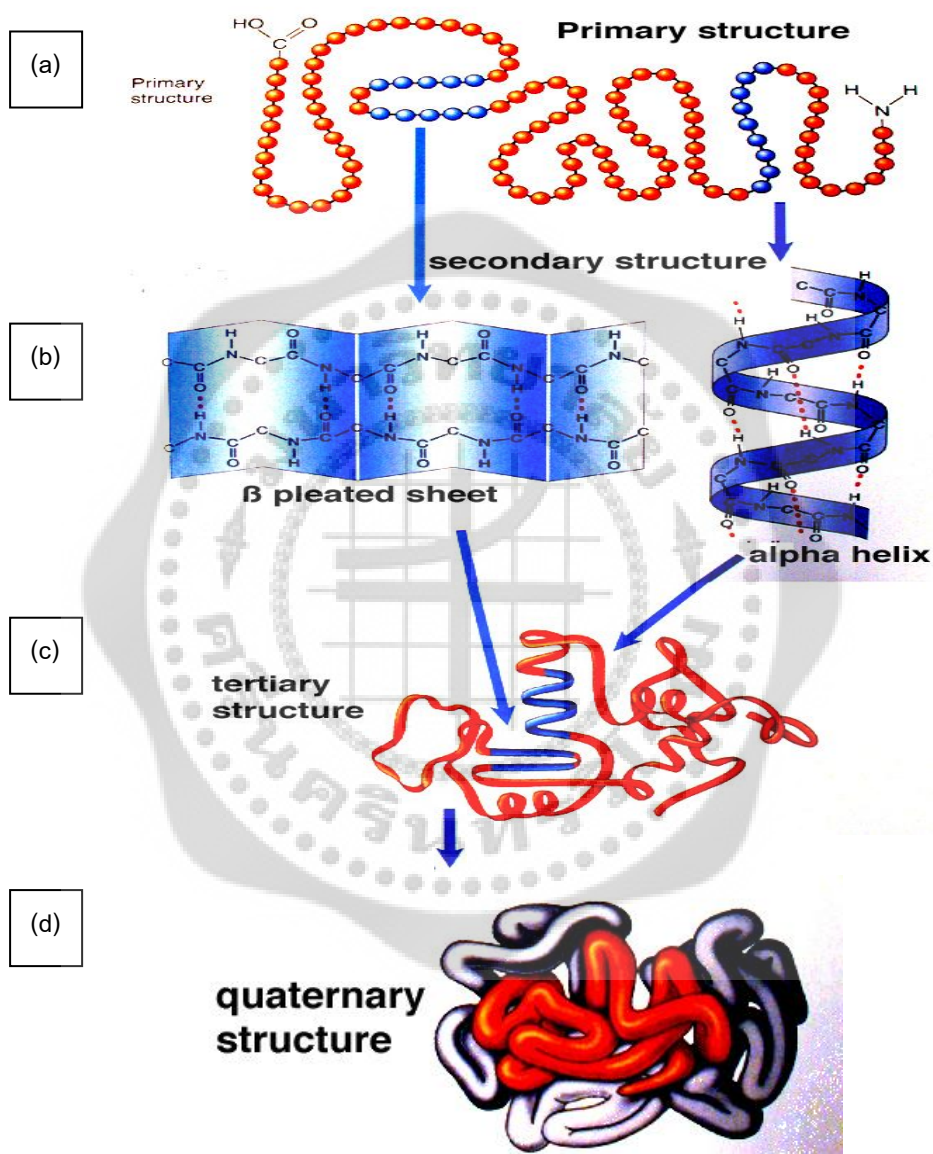
โปรตีนประกอบไปด้วยสายพอลิเพปไทด์อย่างน้อย 1 สาย และมีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่จำเพาะ โดยมีระดับโครงสร้างของโปรตีนแบ่งเป็น 4 ระดับดังนี้

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เป็นโครงสร้างพื้นฐาน แสดงถึงชนิดและจำนวน รวมถึงลำดับของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์หรือโปรตีนที่จำเพาะ โดยสายพอลิเพปไทด์จะมีความยาวแตกต่างกันไป โดยทั่วไปมีความยาวตั้งแต่ 50 -1000 หน่วย (ภาพประกอบ 5(a))

2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เป็นโครงสร้างที่มักจะไม่มีอยู่ในสภาพเส้นตรง เนื่องจากกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบมีหมู่ $-R$ ที่แตกต่างกัน จึงทำให้โครงสร้างทุติยภูมิจะขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโนในโครงสร้างปฐมภูมิ ที่พบมาก คือ โครงสร้างเกลียวแอลฟา (α -helix) และโครงสร้างแบบแผ่นเบต้า (β -sheet) ซึ่งโครงสร้างแบบ α -helix สายเพปไทด์จะม้วนเป็นเกลียวเนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างออกซิเจนในหมู่ $-CO$ ของกรดอะมิโนตัวหนึ่ง กับไฮโดรเจนของหมู่ $-NH$ ของกรดอะมิโนที่อยู่ถัดไป 4 ตำแหน่ง โดยจะเกิดพันธะเช่นนี้ตลอดสายพอลิเพปไทด์จึงทำให้สายบิดเป็นเกลียวอย่างเป็นระเบียบ และเป็นการสร้างพันธะไฮโดรเจนภายในสายเดียวกัน (intrachain hydrogen bonds) หมู่ $-R$ ของกรดอะมิโนจะยื่นออกด้านนอกของเกลียว ส่วนโครงสร้างแบบ β -sheet ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์หลายสายเรียงขนานกัน และยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ $-CO$ ของเพปไทด์สายหนึ่ง กับหมู่ $-NH$ ของเพปไทด์สายที่เคียงคู่กันเป็นการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างสาย (interchain hydrogen bonds) ส่วนหมู่ $-R$ ของกรดอะมิโนจะยื่นออกด้านล่างและด้านบนของสายพอลิเพปไทด์ (ภาพประกอบ 5(b))

3. โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เกิดจากการม้วนพับตัวของเกลียวแอลฟาและแผ่นเบต้าเป็นโครงสร้าง 3 มิติอย่างไม่มีระเบียบ ในกระบวนการพับตัวนั้น กรดอะมิโนที่มีหมู่ $-R$ ที่ไม่ชอบน้ำมักจะอยู่ด้านในโมเลกุลของโปรตีน ในขณะที่หมู่ $-R$ ที่ชอบน้ำมักจะอยู่ภายนอก โดยพันธะที่ทำให้เกิดโครงสร้างตติยภูมิ คือ พันธะไดซัลไฟด์ เป็นแรงดึงดูดระหว่างหมู่ $-SH$ ซึ่งอาจจะสร้างพันธะภายในสายเพปไทด์ หรือระหว่างสายเพปไทด์ก็ได้ และเป็นพันธะที่มีความแข็งแรงมากที่สุด พันธะไอออนิก เป็นแรงดึงดูดระหว่างไอออนที่มีประจุตรงข้ามกัน พันธะไฮโดรเจน เป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อนๆ ที่ไฮโดรเจนสร้างพันธะโควาเลนต์กับธาตุที่มีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูง (electronegativity) เช่น ไนโตรเจน ออกซิเจน และพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic bond) เป็นแรงดึงดูดระหว่างหมู่ $-R$ ที่ไม่ชอบน้ำ แม้พันธะนี้จะไม่ค่อยแข็งแรง แต่ด้วยจำนวนที่มากจึงเป็นแรงที่สำคัญ (ภาพประกอบ 5(c))

4. โครงสร้างจตุรภูมิ (quarternary structure) เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์มากกว่า 1 สาย (ภาพประกอบ 5(d)) เช่น ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 4 สาย โดยมี α -globin 2 สาย และ β -globin 2 สาย มีการเรียงตัวของหน่วยย่อย (subunit) เหล่านั้นเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ (quarternary structure) โดยอาศัยแรงดึงดูดระหว่างขั้วและพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดความเสถียรของโครงสร้างนี้ขึ้น



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทั้ง 4 แบบของโปรตีน

ที่มา: Neil, C. (1999). *Structures and properties of biological molecules*.

3. อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า เช่น กรดอะมิโน โปรตีน เป็นต้น อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นขบวนการใช้สนามไฟฟ้าในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุ การเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่างชนิดกันจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของโมเลกุล และระบบที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งโปรตีนเป็นสารที่มีประจุ เกิดจากการแตกตัวของหมู่ $-R$ หมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิลที่ปลายสายพอลิเพปไทด์ จากการแตกตัวของหมู่ต่างๆดังกล่าว จะทำให้ประจุรวมของโปรตีนเป็นบวก ลบ หรือเป็นกลาง ขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลายที่ใช้ เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปในสารละลาย โปรตีนที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ ส่วนโปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก ซึ่งอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุล (V) ขึ้นกับประจุสุทธิบนโมเลกุล (Z) ความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าที่ใช้ (E) และค่าสัมประสิทธิ์ความฝืด (f) ดังสมการ 1

$$V = \frac{E \times Z}{f} \quad \text{-----1}$$

อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลมีหน่วยเป็นเมตรต่อวินาที (ms^{-1}) ประจุสุทธิของโมเลกุลไม่มีหน่วย แต่สามารถหาได้จากจำนวนของประจุบวกและประจุลบบนโมเลกุลนั้น ความเข้มข้นของสนามไฟฟ้ามีหน่วยเป็น volt m^{-1} และค่าสัมประสิทธิ์ความฝืดมีหน่วยเป็น kg s^{-1}

การเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า (U) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของความเร็วในการเคลื่อนที่ต่อความเข้มข้นของสนามไฟฟ้า ดังสมการ 2

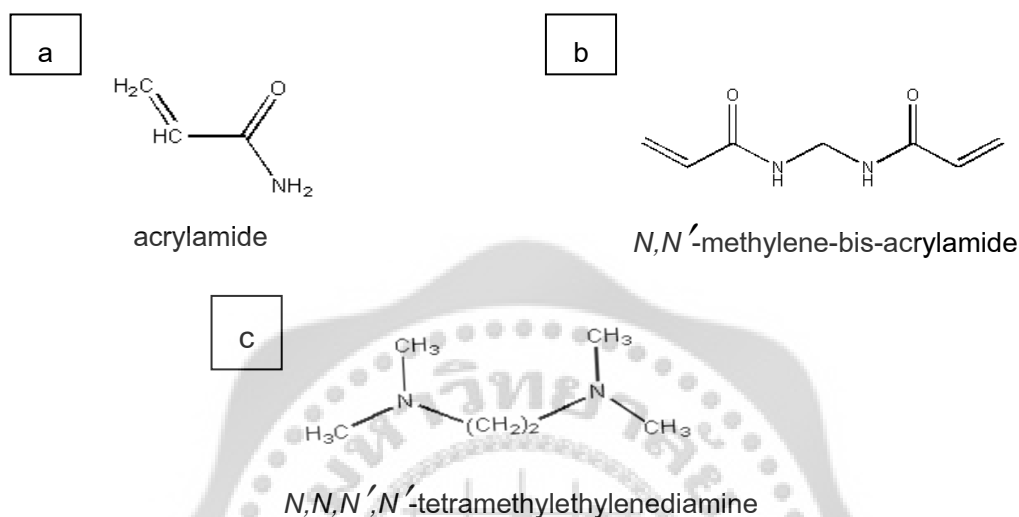
$$U = \frac{V}{E} = \frac{EZ}{fE} = \frac{Z}{f} \quad \text{-----2}$$

ค่าสัมประสิทธิ์ความฝืดจะขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลที่มีรัศมีของโมเลกุลทรงกลม (r) ที่เคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่มีความหนืด (viscosity, η) ดังสมการ 3

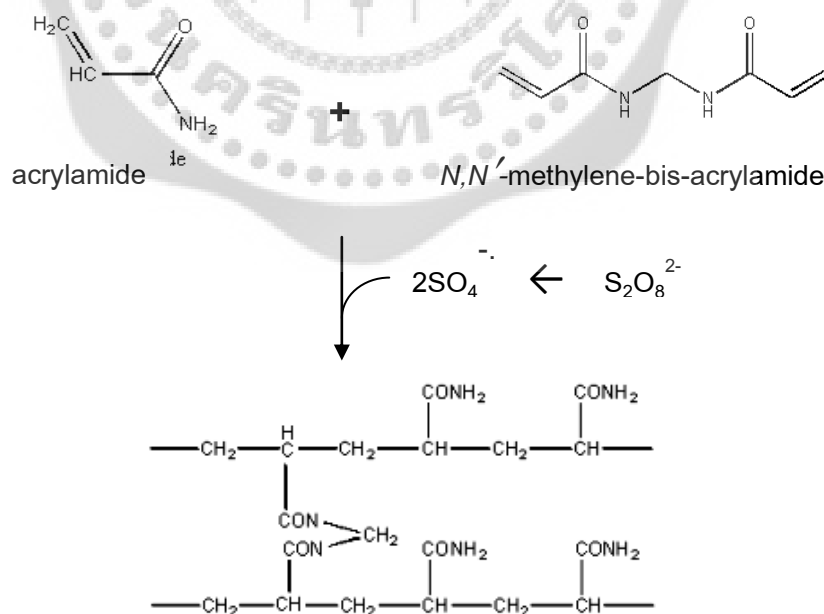
$$f = 6\pi\eta r \quad \text{-----3}$$

อย่างไรก็ตาม ในการแยกสารชีวโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสส่วนใหญ่ทำโดยใช้เจลเป็นตัวกลาง เจลที่ใช้เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ (polymer) ตัวอย่างเช่น อะกาโรส (agarose) และพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) เป็นต้น ซึ่งการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าหรือที่เรียกว่า อิเล็กโทรโฟรีซิส นิยมใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) โดยเจลพอลิอะคริลาไมด์เตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) แบบสายตรงของอะคริลาไมด์ (acrylamide) (ภาพประกอบ 6(a)) และแบบระหว่างสาย (cross-link) โดยใช้เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (methylenebisacrylamide) (ภาพประกอบ 6(b)) ซึ่งเจลที่ได้จากเจลพอลิเมอไรเซชัน จะเป็นแผ่นบาง และมีรูพรุน โดยขนาดของรู

พอรุนจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ และเมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ที่ใช้ การเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันทำได้ โดยการเติมตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งนิยมใช้ *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) (ภาพประกอบ 6(c)) ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ของซัลเฟต ($\text{SO}_4^{\cdot-}$) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ที่เติมลงในสารละลายเจล (ภาพประกอบ 7)



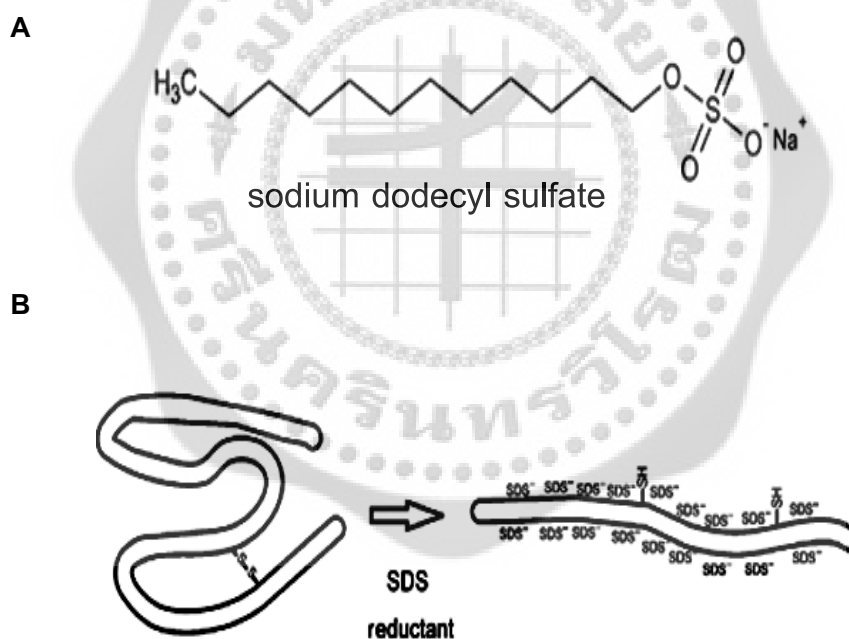
ภาพประกอบ 6 (a) โครงสร้างของอะคริลาไมด์, (b) โครงสร้างของเมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ และ (c) โครงสร้างของ *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)



ภาพประกอบ 7 ปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันของอะคริลาไมด์

ที่มา : Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; and Stryer, L. (2002). *W.H. Biochemistry*.

โดยโปรตีนแต่ละชนิดมีประจุสุทธิต่างกัน และมีโครงสร้างต่างกัน ทำให้การเคลื่อนที่ของโปรตีนแตกต่างกันด้วยเมื่อมีการต่อเข้ากับขั้วไฟฟ้า ดังนั้น ประจุของโปรตีนจึงมีผลต่อการเคลื่อนที่บนเจล การแยกโปรตีนจึงมักทำในสภาพที่โปรตีนถูกทำให้เสียสภาพ (denaturing condition) โดยการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) (ภาพประกอบ 8(A)) ลงในบัฟเฟอร์ โดย SDS จะจับกับกรดอะมิโนในโปรตีนในอัตราส่วนของ 1 โมเลกุลของ SDS ต่อกรดอะมิโน 2 ตัวโดยประมาณ จึงเรียกรวิธีวิเคราะห์นี้ว่า SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังนั้นโครงสร้างจตุรภูมิ ตติยภูมิ และทุติยภูมิ ของโปรตีนจะถูกทำลาย เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน SDS-พอลิเปปไทด์ (SDS-polypeptide complex) ซึ่งมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) เนื่องจากสายโซ่พอลิเปปไทด์ จะคลายการม้วนออกเป็นสายยาว เมื่อถูกจับด้วย SDS และประจุลบบน SDS จะทำให้ประจุสุทธิบนโปรตีนเป็นลบ (ภาพประกอบ 8(B)) จึงทำให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือ เคลื่อนที่เข้าหาขั้วทางขั้วบวก (anode) ดังนั้นการแยกโปรตีนบนเจลจะขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลโปรตีนโดยไม่มีผลของประจุและรูปร่างเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งเราสามารถนำเทคนิค SDS-PAGE มาใช้ในการหามวลโมเลกุลของโปรตีนและพอลิเปปไทด์โดยประมาณได้



ภาพประกอบ 8 (A) โครงสร้างของ SDS (B) การจับของ SDS กับกรดอะมิโนในโปรตีนทำให้โมเลกุลเหยียดยาวออก และมีประจุเป็นลบ
ที่มา : Gallagher, S. R. (2008). (online)

การเลือกความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE จะขึ้นอยู่กับมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการแยก โดยขนาดของรูพรุนของเจลจะขึ้นอยู่กับปริมาณของอะคริลาไมด์ (%T) และความเข้มข้นของเมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (%C) ดังสมการที่ 4 และสมการที่ 5 ตามลำดับ โดยแสดงช่วงของมวลโมเลกุลของโปรตีนที่เหมาะสมต่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ ดังตาราง 1

$$\%T = \frac{(a + b) \times 100}{V} \quad \text{-----4}$$

$$\%C = \frac{b}{(a + b)} \times 100 \quad \text{-----5}$$

โดยที่ a = น้ำหนักของอะคริลาไมด์ (มีหน่วยเป็นกรัม)
 b = น้ำหนักของเมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (มีหน่วยเป็นกรัม)
 V = ปริมาตรของสารละลายเจล (มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร)

ตาราง 1 ช่วงของโปรตีนที่ต้องการแยกโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ (%w/v)	ช่วงการแยกโปรตีน (kDa)
3.5	-
5.0	> 1000
8.0	300 - 1000
12.0	50 - 300
15.0	10 - 80
20.0	5 - 30

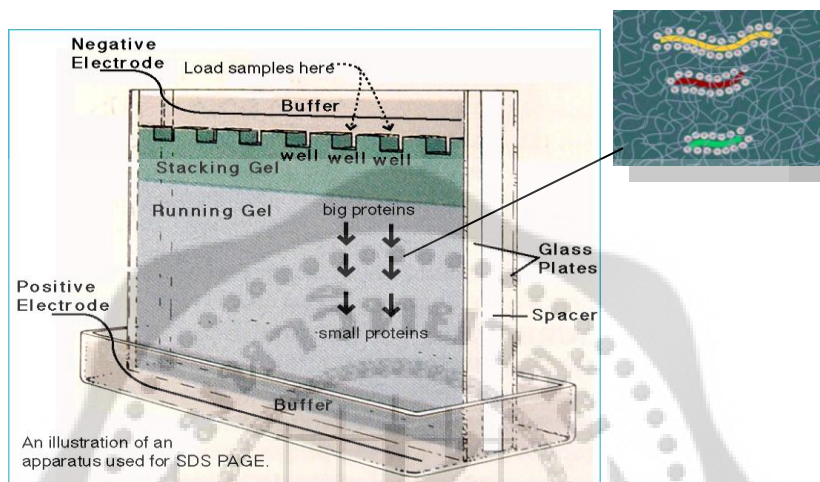
ที่มา: Sheehan, D. (2000). *Physical biochemistry*.

สำหรับการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าจะกระทำภายใต้ระบบที่ไม่ต่อเนื่อง (discontinuous system) เพื่อให้มีความคมชัดของแถบโปรตีนดีขึ้น วิธีนี้ประกอบด้วยเจล 2 ช่วง

Stacking gel หรือ spacer gel เป็นเจลช่วงบน มี pH 6.9 ซึ่งใน stacking gel นี้จะประกอบไปด้วย สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (Tris มีค่า pK_a เท่ากับ 8.3 ที่ 20 °C) และมีความเข้มข้นของ polyacrylamide ต่ำ (4%), ionic strength ต่ำ และมี pH ที่เป็นกลาง จากการที่มีรูพรุนขนาดใหญ่จึงเป็นเหตุให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งจะถูกบีบให้ band แคบลง

Running gel หรือ separating gel เป็นเจลช่วงล่าง มี pH ~8-9 ซึ่ง running gel จะมีความเข้มข้นของ polyacrylamide สูง (8-20%) มี ionic strength สูง และมี pH ที่แตกต่าง จึงเป็นเหตุให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ได้ช้าลง เนื่องจากความเป็นรูพรุนเล็กกลอง และจะทำให้เกิดการแยกกันของโปรตีนตัวอย่างเป็นแถบตามขนาดและปริมาณของประจุ (ภาพประกอบ 9)

องค์ประกอบของ separating gel และ stacking gel สำหรับทำ SDS-PAGE 1 แผ่น ที่ใช้สำหรับการแยกโปรตีนในช่วง 1 ถึง 100 kDa แสดงในตาราง 2



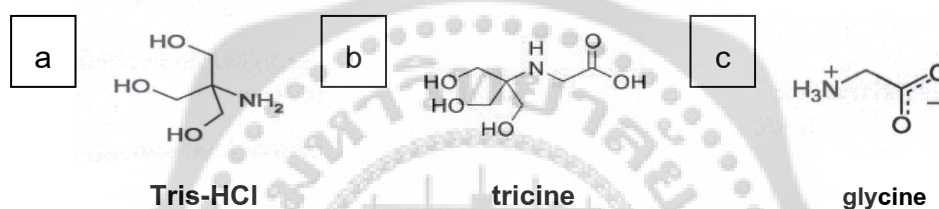
ภาพประกอบ 9 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ประกอบด้วย stacking gel และ resolving gel
ที่มา: Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; et al. (2002). *Molecular biology of the cell*.

ตาราง 2 องค์ประกอบของ separating gel และ stacking gel

ตาราง 2 แสดงองค์ประกอบของ separating gel และ stacking gel	stacking gel	separating gel
	4% T, 3%C	10% T, 3%C
acrylamide/bisacrylamide solution (49.5%T,3%C)	0.125 ml	0.76 ml
gel buffer	0.39 ml	1.25 ml
80 % glycerol	-	0.625 ml
deionized water	1.05 ml	1.11 ml
10% ammonium persulphate	13.75 μ l	18.75 μ l
TEMED	1.38 μ l	1.88 μ l

ที่มา: Shangger, H.; & Jagow, V. G. (1987). *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. p. 368.

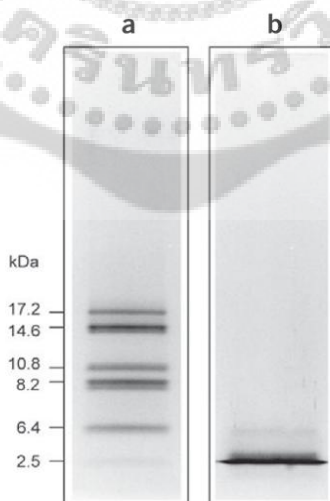
โดยบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคือ Tris-HCl (Tris hydroxyl methyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$) (ภาพประกอบ 10(a)) ซึ่งมีส่วนผสมของไทรซีน (tricine) (ภาพประกอบ 10(b)) หรือไกลซีน (glycine) อยู่ด้วย (ภาพประกอบ 10(c)) กรณีที่มีส่วนผสมของไทรซีนจะเรียกวิธีการแยกโปรตีนแบบนี้ว่า tricine-SDS-PAGE สามารถใช้ในการแยกโปรตีนหรือพอลิเพปไทด์ที่มีขนาดเล็ก (1-100 kDa) ได้ดีกว่าวิธี glycine-SDS-PAGE และใช้เปอร์เซ็นต์ของอะคริลาไมด์ที่ต่ำกว่าวิธี glycine-SDS-PAGE เนื่องจากค่า pK_a ที่แตกต่างของ functional group ของสารทั้งสอง (ค่า pK_a ของ glycine = 9.69 และ pK_a ของ tricine = 8.15 ที่ $20^\circ C$) ซึ่ง tricine จะอยู่ในรูป zwitterionic acid ในช่วง pH 7.4-8.8 ทำให้การเคลื่อนที่ของ trailing ion ของ glycine และของ tricine แตกต่างกัน และเนื่องจาก tricine มีประจุลบที่ต่ำกว่าและมี ionic strength ที่สูงกว่า glycine จึงสามารถเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกได้เร็วกว่า (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 10 (a) โครงสร้างโมเลกุลของ Tris-HCl , (b) โครงสร้างโมเลกุลของไทรซีน และ (c) โครงสร้างโมเลกุลของไกลซีน

ที่มา : Good, N.E.; et al. (1966). *Hydrogen ion buffers for biological research.*

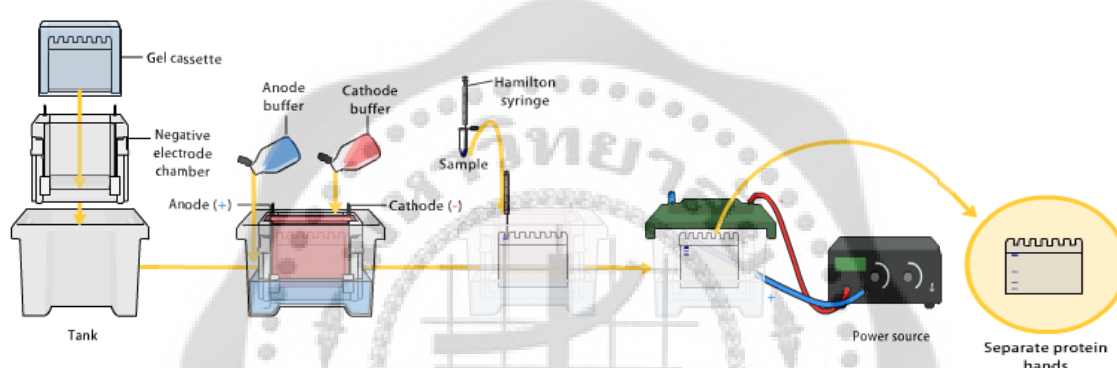
Biochemistry. p. 467-477.



ภาพประกอบ 11 การแยกโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี (a) tricine-SDS-PAGE, (b) glycine-SDS-PAGE

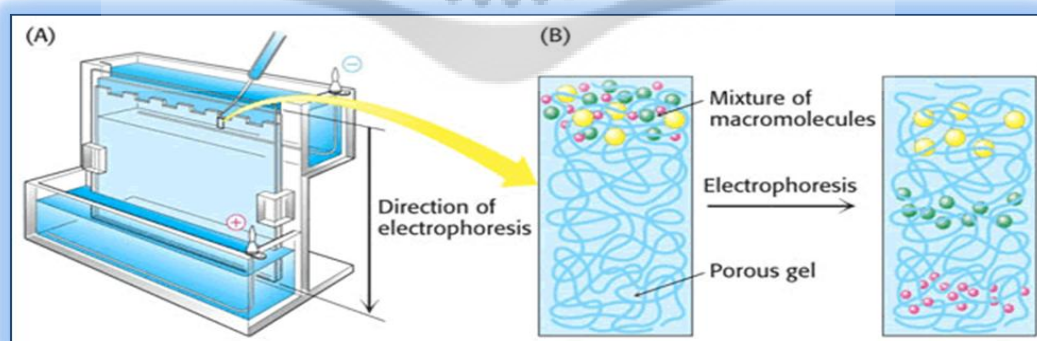
ที่มา: Shangger, H.; & Jagow, V. G. (1987). *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.* p. 368.

ซึ่งการประกอบเจลเข้ากับอุปกรณ์ (ภาพประกอบที่ 12) จะทำโดยการเตรียมสารละลายเจลในบัฟเฟอร์ แล้วเทลงระหว่างกระจกสองแผ่นซึ่งมีแผ่นกั้น (spacer) วางระหว่างกระจกทั้งสอง ความหนาของเจลจะขึ้นกับความหนาของแผ่นกั้นที่ใช้ จากนั้นจึงใส่หวี (comb) เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับใส่สารตัวอย่าง (well) หลังเจลแข็งตัวแล้ว ซึ่งการแข็งตัวของเจลใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที แล้วจึงประกอบเจลเข้ากับอุปกรณ์ (gel electrophoresis apparatus) ขอบด้านบนของเจลจะจุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เรียกว่า cathode buffer ซึ่งอยู่ในภาชนะ (chamber) ที่ต่อเข้ากับขั้วลบ (cathode) ส่วนขอบด้านล่างของเจลจะจุ่มอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เรียกว่า anode buffer ซึ่งต่อเข้ากับขั้วบวก (anode) (ภาพประกอบที่ 13A) เมื่อประกอบอุปกรณ์ตั้งรูปแล้วจึงต่อขั้วทั้งสองเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะมีทิศทางจากบนลงล่าง (ภาพประกอบที่ 13B)



ภาพประกอบ 12 การประกอบเจลเข้ากับอุปกรณ์

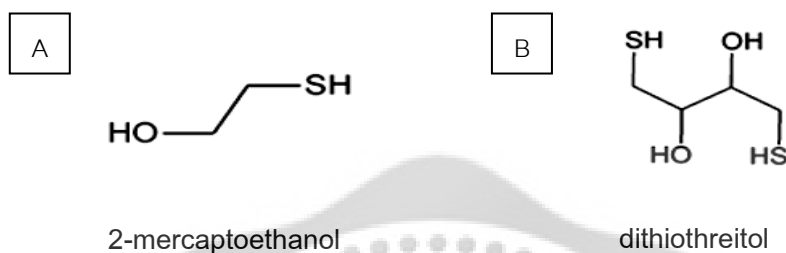
ที่มา : Burnette, W.N. (1981). *Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Analytical Biochemistry*. p. 195–203



ภาพประกอบ 13 (A) การเติมบัฟเฟอร์ที่ขั้วบวก-ขั้วลบ (B) การเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนผ่านรูพรุนของเจล

ที่มา : Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; and Stryer, L. (2002). *W.H. Biochemistry*

สารผสมที่ต้องการแยกและหามวลโมเลกุลต้องถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ โดยให้ความร้อนที่ 100 °C อย่างน้อย 3 นาที ใน loading buffer ที่มี SDS ปริมาณมากเกินไป และมีตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ซึ่งจะทำให้เกิดการสลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ในโปรตีนทำให้พันธะไดซัลไฟด์แยกออกจากกันโดยเปลี่ยนเป็นหมู่ sulfhydryl (SH) พันธะไดซัลไฟด์จะเกิดจากการจับกันของ cysteine ในโปรตีน ซึ่ง reducing agent ที่นิยมใช้ในการสลายพันธะไดซัลไฟด์ คือ 2-mercaptoethanol (หรือ β -mercaptoethanol) (ภาพประกอบ 14(A)) และ dithiothreitol (DTT) (ภาพประกอบ 14(B))



ภาพประกอบ 14 (A) โครงสร้างของ 2-mercaptoethanol, (B) โครงสร้างของ dithiothreitol
ที่มา : Gallagher, S. R. (2008). (online)

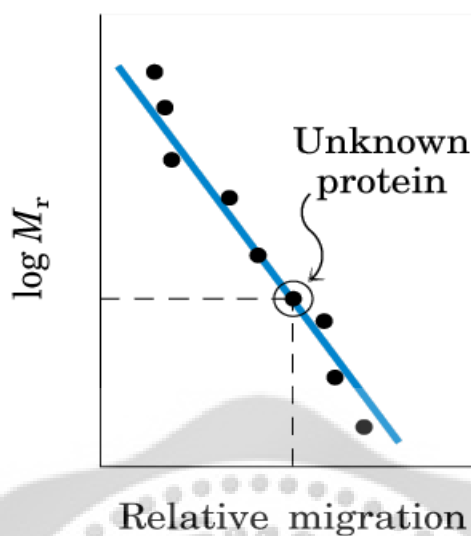
หลังจากให้ความร้อนสารตัวอย่างโปรตีนแล้ว ต้องปล่อยให้สารตัวอย่างเย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ แต่ถ้ายังไม่ต้องการวิเคราะห์ทันที ให้เก็บสารตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ซึ่งโปรตีน หรือพอลิเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงเคลื่อนที่ในระยะทางที่มากกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ในเวลาเท่ากัน โดยสามารถใช้แยกโปรตีนที่มีปริมาณน้อยได้ถึง $0.1\ \mu\text{g}$ ($\sim 2\ \text{pmol}$) และแยกโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่างกันเพียง 2% ได้

อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ (mobility) ของสายพอลิเพปไทด์ ในสภาวะนี้จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับ logarithm ของมวลโมเลกุลของโปรตีน ($\log M$) ดังสมการ 6

$$\text{Log } M = a - bx \quad \text{-----6}$$

โดยที่ a และ b เป็นค่าคงที่ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะของเจลที่ใช้ และ x คืออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายพอลิเพปไทด์

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล ($\log M$) กับการเคลื่อนที่บนเจลจากการใช้โปรตีนมาตรฐาน ทำให้สามารถสร้างเส้นกราฟมาตรฐาน ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรง(ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 15 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล ($\log M$) กับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานบนเจล

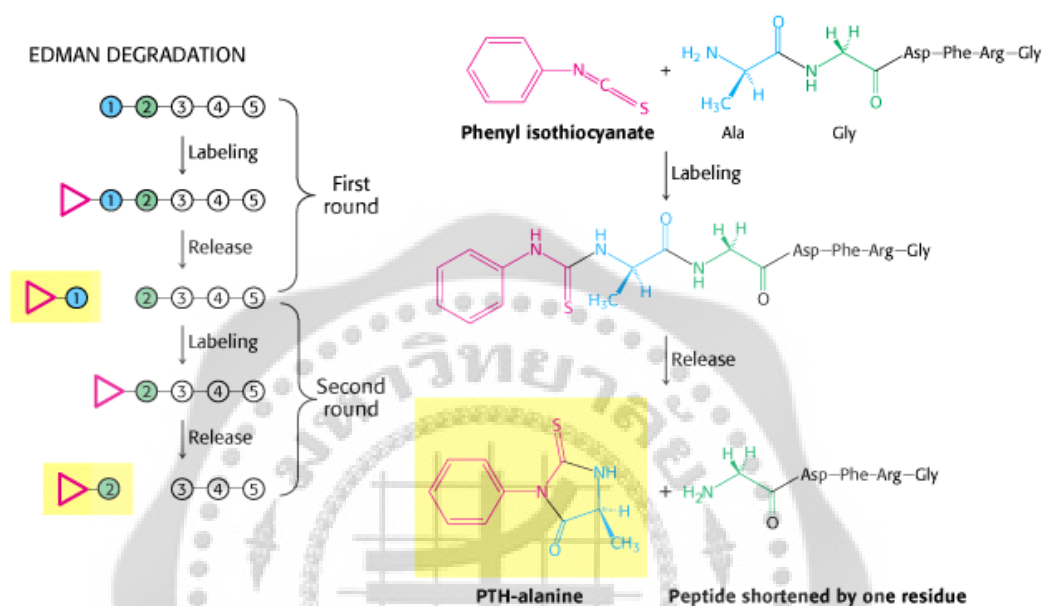
ที่มา : David, L. N.; et al. (2008). *Principle of biochemistry*.

เมื่อเคลื่อนที่ถึงตำแหน่งที่ต้องการบนเจลแล้วเป็นการสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (โดยการปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า) จากนั้นจึงนำเจลมาทำการย้อมสี เพื่อดูแถบของโปรตีน สีย้อม (dye) ที่นิยมใช้คือ coomassie blue ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่จะถูกย้อมด้วยสีย้อมชนิดนี้ การย้อมด้วย coomassie blue จะต้องใช้ตัวกลางที่เป็นกรดเพื่อให้เกิดแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force) ระหว่างโมเลกุลของสีย้อมกับหมู่แอมโมเนียมไอออน ($-\text{NH}_3^+$) ของโปรตีน

4. การหาลำดับกรดอะมิโน (Amino acid sequencing)

โปรตีนที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วถ้าเป็นโปรตีนที่มีหน่วยย่อยหรือมีโครงสร้างจตุรภูมิจะต้องทำการแยกหน่วยย่อยดังกล่าวออกจากกันเสียก่อน โดยการทำลายแรงยึดระหว่างหน่วยย่อยๆ เหล่านั้น ถ้าต้องการหาลำดับกรดอะมิโนจะต้องทำลายแรงเหล่านั้นให้เหลือเป็นเส้นพอลิเปปไทด์ที่เป็นโครงสร้างปฐมภูมิ วิธีการหาลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนถูกคิดขึ้นโดยแซนเจอร์ (Sanger) ต่อมาได้มีการแก้ไขวิธีการให้ดีขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งวิธีการหาลำดับกรดอะมิโนที่นิยมกันวิธีหนึ่ง คือวิธี Edman degradation เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกที่สุด โดยที่หมู่เอมีนที่ปลาย N (*N*-terminal) ของโปรตีนหรือพอลิเปปไทด์จะถูก label ด้วยโมเลกุลของ phenyl isothiocyanate (PITC) เกิดเป็นอนุพันธ์ phenylthiocarbamoyl แล้วเกิดการไฮโดรไลต์พันธะเพปไทด์ ในสภาวะกรดที่เจือจาง จะทำให้กรดอะมิโนเฉพาะที่ปลาย *N*-terminal หลุดออก โดยจะเกิดการหลุดออกทีละตัว ทำให้สามารถหาลำดับของกรดอะมิโนได้ เช่น trifluoroacetic

acid (TFA) จะเกิดสารประกอบเป็นวง (cyclic compound) ของ phenylthiohydantoin (PTH)-amino acid หลุดออกจากสายเปปไทด์ ทำให้สายเปปไทด์สั้นลง 1 กรดอะมิโน (ภาพประกอบ 16) และทำการวิเคราะห์ PTH-amino acid ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (HPLC) เทียบกับ PTH-กรดอะมิโนมาตรฐาน ส่วนสายเปปไทด์ที่เหลือสามารถนำกลับไปทำปฏิกิริยาใน cycle ต่อไปเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนตัวต่อไปตามลำดับ ทำให้ทราบลำดับของกรดอะมิโนบนสายเปปไทด์ได้



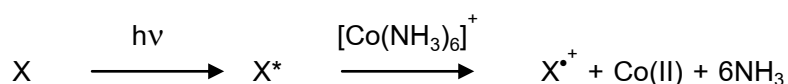
ภาพประกอบ 16 ปฏิกิริยาของ Edman degradation

ที่มา : Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; and Stryer, L. (2002). *W.H. Biochemistry*.

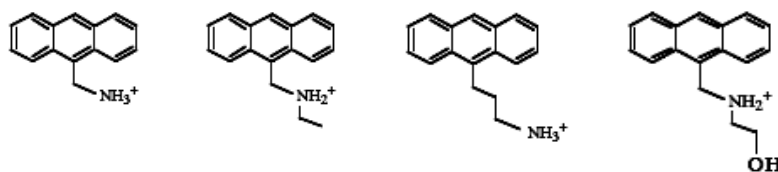
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การตัดโปรตีนหรือพันธะเปปไทด์ขนาดใหญ่ให้เล็กลง สามารถถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ 2 ทางคือปฏิกิริยาทางแสง (photo reaction) และปฏิกิริยาทางความร้อน (thermal reaction) ซึ่งผู้วิจัยหลายท่านได้พยายามพัฒนางานวิจัย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการออกแบบและผลิตยาชนิดใหม่ได้ในอนาคต

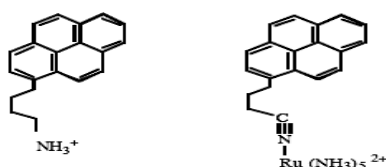
กรณีปฏิกิริยาที่กระตุ้นด้วยแสง เป็นการตัดโปรตีนโดยใช้โมเลกุลสังเคราะห์เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่รับแสง (ภาพประกอบ 17)



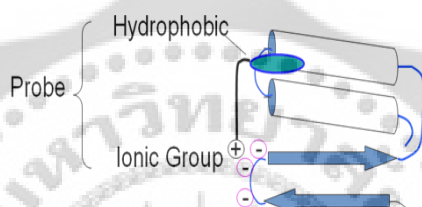
โดย X = โมเลกุลสังเคราะห์ที่ทำหน้าที่รับแสง



ภาพประกอบ 18 โครงสร้างอนุพันธ์ของแอนทราซีน (anthracyl derivatives)

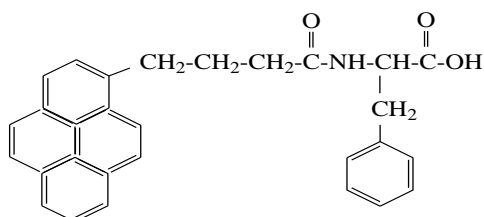


ภาพประกอบ 19 โครงสร้างอนุพันธ์ของไพรีน (pyrenyl derivatives)



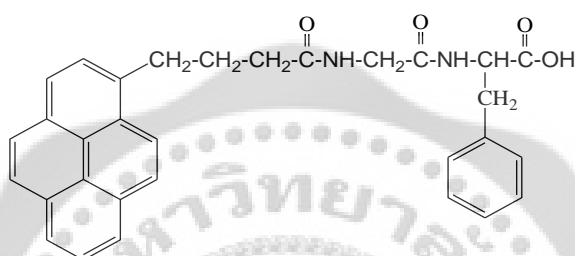
ภาพประกอบ 20 การออกแบบโมเลกุลเพื่อใช้ในการจับกับโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ

ต่อมา कुमार และบุรณประพฤกษ์ (Kumar; & Buranaprapuk. 1997: 2085-2087) ได้มีการออกแบบและพัฒนาโมเลกุลของอนุพันธ์ของไพรีน โดยใช้กรดอะมิโน L-phenylalanine เชื่อมต่อเข้ากับ 4(1-pyrene)butyric acid (PBA) ได้เป็นโมเลกุล N-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene) butyramide (py-phe) (ภาพประกอบ 21) ทำให้โมเลกุลนี้มีปลายด้านหนึ่งมีขั้ว (หมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) ของ L-phenylalanine) และปลายอีกด้านหนึ่งไม่มีขั้ว (หมู่ไพรีน) จากการศึกษาการตัดโปรตีน bovine serum albumin และ chicken egg-white lysozyme พบว่าการตัดโปรตีนเกิดขึ้นได้เมื่อฉายแสงที่ความยาวคลื่น 344 nm (λ_{max} ของ Py-Phe) ไปยังสารละลายผสมของโปรตีน Py-Phe และ Cobalt(III)hexamine trichloride ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ หรือ CoHA) ซึ่ง CoHA ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) การแยกเปปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีนด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และการหาลำดับกรดอะมิโน พบว่า BSA ถูกตัดระหว่าง Leu 348 และ Arg 349 ในขณะที่ lysozyme ถูกตัดระหว่าง Val 108 และ Trp 109



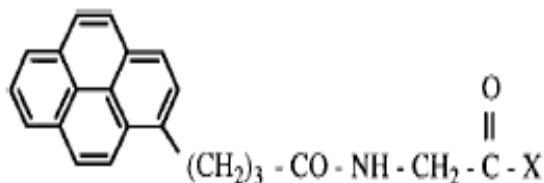
ภาพประกอบ 21 โครงสร้างของ Py-Phe

หลังจากนั้น कुमार และบูรณประพฤกษ์ (Kumar; & Buranaprapuk. 1999: 4262-4270) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของความยาวของโมเลกุลต่อการตัดโปรตีน โดยนำ glycine มาขึ้นระหว่าง 4(1-pyrene)butyric acid กับ L-phenylalanine เกิดเป็นอนุพันธ์ของไพรีน ในรูปของ Py-(Gly)_n-Phe (n=0, 1, 2) (ภาพประกอบ 22) พบว่าความยาวของโมเลกุลมีผลต่อคุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปี และคุณสมบัติการตัดโปรตีนด้วยแสง โดยความยาวของโมเลกุลไม่ช่วยให้การตัดโปรตีนดีขึ้น ในทางกลับกันทำให้ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนลดลงเมื่อโมเลกุลมีความยาวเพิ่มขึ้น และเกิดการตัด lysozyme โดยใช้โมเลกุลของ Py-(Gly)_n-Phe ขึ้น 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งแรกเกิดขึ้นระหว่าง Val 108 และ Trp 109 (major cleavage site) และอีกตำแหน่งหนึ่งคือ ระหว่าง Ala 110 และ Trp 111 (minor cleavage site)



ภาพประกอบ 22 โครงสร้างของ Py-Gly-Phe

บูรณประพฤกษ์ และ कुमार (Buranaprapuk; & Kumar. 2000: 7019-7025) ได้มีการศึกษาการตัดโปรตีน โดยนำกรดอะมิโนชนิดอื่นมาใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีน ได้แก่ L-tryptophan, L-tyrosine และ L-histidine แทน L-phenylalanine โดยต่อเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของ 4(1-pyrene)butyric acid และมีโมเลกุลของ glycine เป็น linker เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น (flexibility) ของโมเลกุล เกิดเป็นโมเลกุลในรูปของ Py-Gly-X (X = Trp, Tyr, His) (ภาพประกอบ 23) พบว่าโปรตีนจะไม่ถูกตัดเมื่อใช้โมเลกุลที่มี Trp และ Tyr เนื่องจากเกิด intramolecular quenching โดยโมเลกุลของ Trp และ Tyr ในการยับยั้งการเกิด Py⁺ จาก Py*

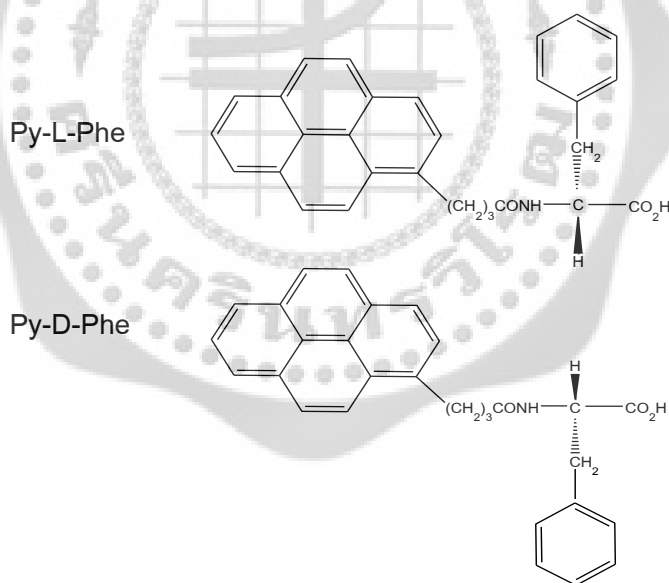


ภาพประกอบ 23 โครงสร้างของ Py-Gly-X (โดยที่ X = Trp, Tyr, His)

คูมาร์ และคนอื่นๆ (Kumar; et al. 2001: 297-298) ได้มีการศึกษาถึงผลของ chiral center ของ phenylalanine บน probe ต่อการจับและตัดโปรตีน โดยการสังเคราะห์โมเลกุล Py-L-Phe และ Py-D-Phe (ภาพประกอบ 24) เมื่อไอโซเมอร์ทั้งสองจับกับ BSA พบว่าค่าคงที่การจับ (binding constant, K_b) ของ L-isomer สามารถจับกับ BSA ได้ดีกว่า D-isomer ถึง 100 เท่า โดยคำนวณจากสมการ Scatchard ดังสมการที่ 7 และการคายแสง fluorescence ของ L-isomer จะลดลง ในขณะที่การคายแสง fluorescence ของ D-isomer จะเพิ่มขึ้นเมื่อจับกับ BSA ($\lambda_{\max} = 378 \text{ nm}$)

$$r/C_f = K_b(n-r) \quad \text{หรือ} \quad 1/C_f = K_b(n/r-1) \quad \text{-----7}$$

โดยที่ C_f = ความเข้มข้นของ probe อิสระ (free probe)
 K_b = ค่าคงที่ของการจับ (binding constant)
 n = ขนาดของ binding site
 r = ความหนาแน่นของการจับ (binding density)



ภาพประกอบ 24 โครงสร้างของ Py-L-Phe และ Py-D-Phe

นอกจากนี้ คูมาร์ และบรรณประพุกษ์ (Kumar; et al. 2002: 579-592) ได้มีการศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching) ของ Py-L-Phe พบว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการคายแสงจะลดลงถึง 90% เมื่อ Py-L-Phe จับกับ BSA และลดลง 30% เมื่อ Py-L-Phe จับกับ lysozyme ประสิทธิภาพการคายแสงแสดงได้จากค่า K_{SV} ซึ่งสามารถหาได้จากสมการ Stern-Volmer ดังสมการที่ 8 และจากการใช้ circular dichroism spectroscopy (CD) เพื่อศึกษาการเลือกจับของ enantiomer กับ

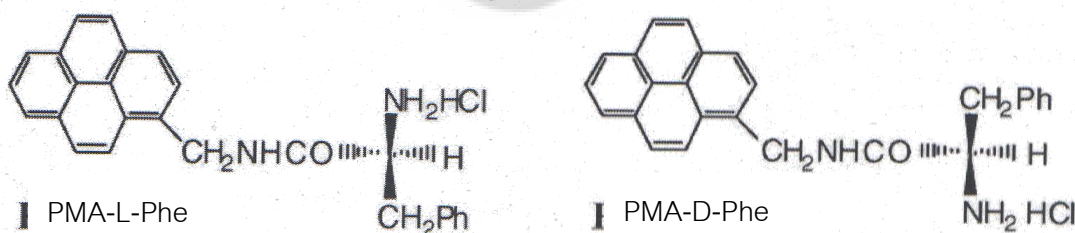
โปรตีน (enantiomeric selective binding) ของ Py-L-Phe และ Py-D-Phe พบว่าโมเลกุลของ D-isomer และ L-isomer มีการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ CD เป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามกัน

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{-----8}$$

โดยที่	I_0	=	fluorescence intensity ของ probe เมื่อไม่มี quencher
	I	=	fluorescence intensity ของ probe เมื่อมี quencher
	K_{SV}	=	Stern-Volmer quenching constant
	$[Q]$	=	ความเข้มข้นของ quencher

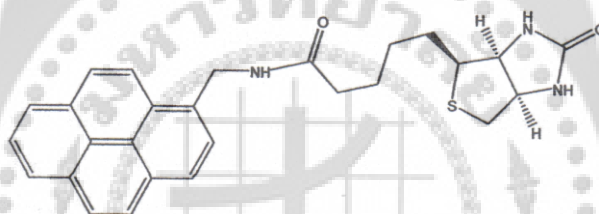
คูมาร์ และบุรณประพุกษ์ (Kumar; & Buranaprapuk. 2002 : 5810-5815) ได้ศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยาโดยเทคนิคทาง flash photolysis พบว่าเกิดอนุมูลประจุบวกของไพรีน (pyrene cation radical; Py^+) เป็น intermediate หลังจาก CoHA รับอิเล็กตรอนจาก Py^* ซึ่ง Py^+ สามารถดึงอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom abstraction) บนคาร์บอนตำแหน่งแอลฟาของกรดอะมิโนในโปรตีนซึ่งก่อให้เกิดการสลาย (hydrolysis) ของพันธะเปปไทด์

บุรณประพุกษ์ และคนอื่นๆ (Buranaprapuk; et al. 2008 : 9258-9265) ได้ศึกษาถึงความสำคัญของขั้วที่ปลายโมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีน โดยการสังเคราะห์อนุพันธ์ไพรีนในรูป PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe การกลับขั้วที่ปลายของโมเลกุล phenylalanine จากหมู่คาร์บอกซิลิก ($COOH$) เป็นหมู่เอมีน (NH_2) (ภาพประกอบ 25) พบว่าไม่มีผลต่อตำแหน่งในการตัดโปรตีน แต่มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนดีขึ้นอย่างมาก และ yield ที่ได้จัดว่ามีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับการตัดโปรตีนที่เคยมีรายงานมา และจากการศึกษาโดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี พบว่าขั้วของปลายอนุพันธ์ไพรีนมีผลต่อค่าคงที่การจับ (binding constant) ซึ่ง D-isomer สามารถจับกับ BSA ได้ดีกว่า L-isomer ประมาณ 10 เท่า และการคายแสง fluorescence ของ D-isomer และ L-isomer จะเพิ่มขึ้นเมื่อจับกับ BSA



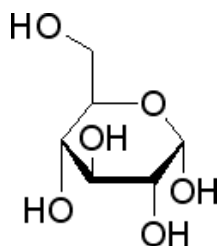
ภาพประกอบ 25 โครงสร้างของ PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe

มะลัยแก้ว และคนอื่นๆ (Malaikaew; et al. 2011 : 251-255) ได้มีการออกแบบและพัฒนาโมเลกุล โดยใช้ D-(+)-biotin ซึ่งเป็นสับสเตรทจำเพาะต่อโปรตีน avidin มาเชื่อมต่อเข้ากับ 1(1-pyrene)methylamine hydrochloride (PMA) ได้เป็นโมเลกุล d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide (Py-biotin) (ภาพประกอบ 26) จากการศึกษาการตัดโปรตีน avidin พบว่าการตัดโปรตีนเกิดขึ้นได้เมื่อนำแสงที่มีความยาวคลื่น 343 nm ไปยังสารละลายผสมของโปรตีน Py-biotin แล้วทำการแยกเปปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีนด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และการหาลำดับกรดอะมิโน พบว่า avidin ถูกตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Thr 77 และ Val 78 เมื่อศึกษาการดูดกลืนแสงของ Py-biotin เมื่อจับกับ avidin พบว่าค่าคงที่การจับ (binding constant, K_b) ของ Py-biotin สามารถจับกับ avidin ได้ดี และเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมไปยังความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น (red shift) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาการยับยั้งการคายแสง (fluorescence quenching) ของ Py-biotin โดยใช้ CoHA พบว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการคายแสงจะลดลงเมื่อ Py-biotin จับกับ avidin โดยเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของการยับยั้งการคายแสงเมื่อ Py-biotin อยู่อย่างอิสระในสารละลาย



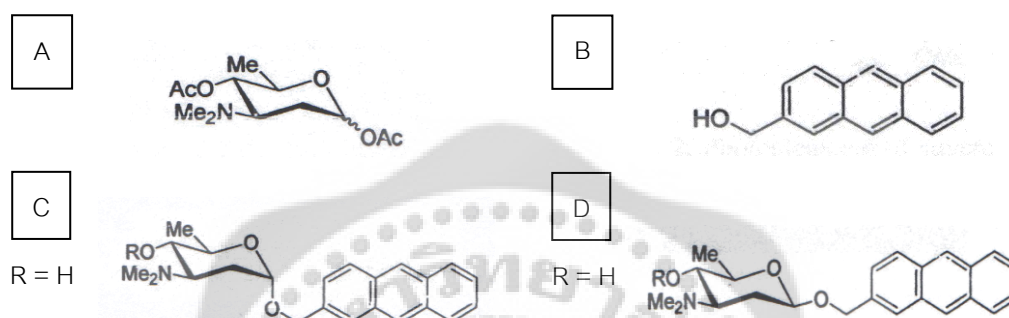
ภาพประกอบ 26 โครงสร้างของ Py-biotin

จากงานวิจัยข้างต้น ผู้วิจัยเห็นว่า D-(+)-biotin ซึ่งเป็นสับสเตรทของ avidin เมื่อนำมาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ไพรีน จะได้เป็นโมเลกุล Py-biotin และพบว่าสามารถใช้ในการตัดโปรตีน avidin ที่ตำแหน่งจำเพาะได้ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าถ้านำโมเลกุลที่เป็นสับสเตรทจำเพาะต่อเอนไซม์มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ไพรีน จะได้อนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ที่มีหมู่จำเพาะต่อเอนไซม์ชนิดนั้น ซึ่งสามารถใช้เทคนิคสเปกโทรสโคปีในการศึกษาโครงสร้างบริเวณ binding site ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะใช้โมเลกุลของน้ำตาล เช่น D-(+)-glucose (หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ)(ภาพประกอบที่ 27) ซึ่งเป็นสับสเตรทของ sugar binding protein หลายชนิด (เช่น lectin และ concanavalin A เป็นต้น) มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ไพรีน เพื่อให้ได้โมเลกุลชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะในการจับกับโปรตีนเหล่านี้



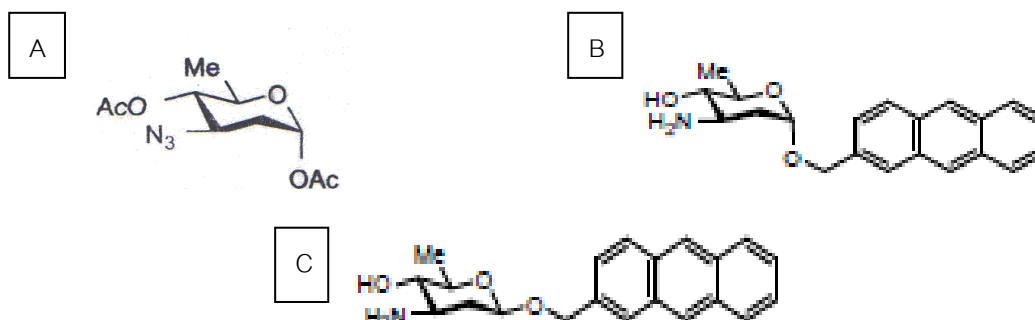
ภาพประกอบ 27 โครงสร้างของ D-(+)-glucose

การที่เลือกใช้โมเลกุลของน้ำตาล เช่น D-(+)-glucose (หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ) มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ไพรีน เนื่องจากว่าก่อนหน้านี้ คัสซุโนบุ และมัสซาชิ (Kazunobu; & Masashi. 2004 : 28-35) ได้ออกแบบโมเลกุลชนิดใหม่ โดยใช้ 1-OAc sugar (ภาพประกอบ 28(A)) มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของแอนทราซีน (ภาพประกอบ 28(B)) ได้เป็น 2-anthrylmethyl 3-*N,N'*-dimethylamino-2,3,6-trideoxy- α -D-arabino-hexopyranoside (ภาพประกอบ 28(C)) และ 2-anthrylmethyl 3-*N,N'*-dimethylamino-2,3,6-trideoxy- β -D-arabino-hexopyranoside (ภาพประกอบ 28(D)) พบว่าสามารถใช้ในการตัด DNA ได้แต่ประสิทธิภาพยังไม่ดีนัก



ภาพประกอบ 28 (A) โครงสร้างของ 1-OAc sugar (B) โครงสร้างของ anthracene derivative (C) โครงสร้างของ 2-anthrylmethyl 3-*N,N'*-dimethylamino-2,3,6-trideoxy- α -D-arabino-hexopyranoside (D) โครงสร้างของ 2-anthrylmethyl 3-*N,N'*-dimethylamino-2,3,6-trideoxy- β -D-arabino-hexopyranoside

ต่อมามัสซาชิ และอาคาเนะ (Masashi; & Akane. 2006 : 169-174) ได้ทำการศึกษาต่อ โดยการออกแบบโมเลกุลชนิดใหม่ ซึ่งใช้ glycosyl acetate (ภาพประกอบ 29(A)) มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ของแอนทราซีนตัวเดิม ได้เป็น 2-anthrylmethyl 3-amino-2,3,6-trideoxy- α -D-arabino-hexopyranoside (ภาพประกอบ 29(B)) และ 2-anthrylmethyl 3-amino-2,3,6-trideoxy- β -D-arabino-hexopyranoside (ภาพประกอบ 29(C)) พบว่าสามารถใช้ในการตัดโปรตีน lysozyme และ BSA แบบสุ่ม (random) ได้โดยที่ไม่เป็นการตัดแบบจำเพาะ



ภาพประกอบ 29 (A) โครงสร้างของ glycosyl acetate (B) โครงสร้างของ 2-anthrylmethyl 3-amino-2,3,6-trideoxy- α -D-arabino-hexopyranoside (C) โครงสร้างของ 2-anthrylmethyl 3-amino-2,3,6-trideoxy- β -D-arabino-hexopyranoside

จากงานวิจัยที่ผ่านมาของมัสดาชิ และอากาเนะ จะเห็นได้ว่าสารที่สังเคราะห์มานั้นสามารถเกิดการตัดโปรตีนได้ โดยเกิดการ smear ของแถบโปรตีนเมื่อแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะใช้โมเลกุลของน้ำตาล เช่น D-(+)-glucose (หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ) ซึ่งเป็นลิบสเตรทของ sugar binding protein หลายชนิด มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ไพรีน แทนอนุพันธ์ของแอนทราซีน เพื่อใช้ในการศึกษาการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะได้

กรณีปฏิกิริยาที่กระตุ้นด้วยความร้อน เป็นการนำโลหะแทรนซิชันมาใช้ในการตัดโปรตีน และดีเอ็นเอ โดยสซิปพาส และคูนอด (Schepartz; & Cuenoud. 1990: 3241-3249) ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนที่มี trifluoperazine (TFE) ต่อกับ iron(II) ethylenediamine (Fe(EDTA)) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน TFE-Fe(EDTA) เพื่อใช้ในการจับ calmodulin เนื่องจาก TFE สามารถจับกับ calmodulin ได้ที่ตำแหน่งจำเพาะ ดังนั้น TFE จะพาสารประกอบเชิงซ้อนนี้ไปที่ binding site ของ TFE ใน calmodulin จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา โดยการเติม reducing agent ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้เป็นแบบออกซิเดชัน (oxidative mechanism) จะเกิด hydroxyl radicals (OH[•]) เป็นตัวที่เข้าไปทำปฏิกิริยากับโปรตีน และทำให้เกิดการแตกของพันธะเพปไทด์ จากการทดลองพบว่า calmodulin ถูกตัดได้ 6 เพปไทด์ย่อย

นอกจากนี้ รานา และเมียร์ส (Rana; & Meares.1990: 2457-2458) ทำการออกแบบโมเลกุลโดยนำสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe²⁺ เชื่อมติดกับกรดอะมิโน cystein-34 ของ BSA แล้วเติม reducing agent พบว่า BSA ถูกตัดในบริเวณที่มีสารประกอบเชิงซ้อนติดอยู่ โดยอาศัยกลไกปฏิกิริยาออกซิเดชันเช่นเดียวกัน

รวมทั้ง เซโรเกท และคนอื่นๆ (Sereikaite; et al. 2006: 369-378) ได้มีการศึกษาการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยการใส่โลหะไอออนในสถานะที่มี ascorbic acid (ASC) และ oxidizing agent เช่น O₂ หรือ H₂O₂ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการตัดโปรตีน พบว่า ในระบบ Fe³⁺/Fe²⁺-ASC สามารถตัดโปรตีนได้ 4 ชนิด คือ bovine serum albumin (BSA), lysozyme, ovalbumin, α-casein และ β-casein ระบบ Cu²⁺/Cu⁺-ASC สามารถตัดโปรตีนได้ 12 ชนิด คือ BSA, ovalbumin, α-casein, β-casein, myoglobin, human growth hormone (hGH), lysozyme, *E. coli* β-galactosidase, *E. coli* alkaline phosphatase, TNF, *E. coli* DNA polymerase I และ protein UK-114 สำหรับ Pd²⁺ ion สามารถตัดโปรตีนได้ 2 ชนิด (α-casein และ β-casein) โปรตีนส่วนใหญ่ถูกตัดเพียงเล็กน้อย ซึ่งเหตุผลที่ทำให้โปรตีนยังคงเสถียร เมื่อถูกตัดโดยเกิดปฏิกิริยาแบบออกซิเดชันมี 2 ประการคือ ประการแรก แม้ว่าจะไม่มีการจับหรือเกิดการจับที่ตำแหน่งจำเพาะของโปรตีน ภายใต้สภาวะที่เกิดการออกซิเดชันที่ช้า จะทำให้ไอออนของโลหะถูกปล่อยออกจากตำแหน่งที่จับ และประการที่สอง hGH จะถูกตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ 2 ตำแหน่ง โดยระบบ Cu²⁺/Cu⁺-ASC จะมีอย่างน้อยที่สุดหนึ่ง amino acid residue ของโปรตีน ถูกตัดแปลง โดยการเกิด reactive carbonyl

การตัดโปรตีนโดยผ่านกลไกแบบออกซิเดชัน จะเกิดจาก hydroxyl radicals (OH[•]) ที่เกิดขึ้นเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีน และทำให้เกิดการแตกของพันธะเพปไทด์ ซึ่งวิธีนี้มักได้ผลผลิตของเพปไทด์ที่ถูกตัดในปริมาณที่ต่ำ และการดัดแปลงโปรตีนที่กรดอะมิโนจำเพาะจะทำได้ยาก นอกจากนี้การเกิดออกซิเดชันอาจทำลายโปรตีนตรงบริเวณที่ถูกตัด ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หา amino acid sequence ได้

ต่อมา कुमार และบูรณประพฤษ (Kumar; & Buranaprapuk. 2000: 597-598) ได้มีรายงานการใช้สารประกอบเชิงซ้อนของ Co³⁺ ได้แก่ pentammineaquocobalt(III) และ tetramminediaquocobalt(III) ions ในการตัดไลโซไซม์ ซึ่งก่อให้เกิดการสลาย (hydrolysis) ของพันธะเพปไทด์ โดยไลโซไซม์ถูกตัดระหว่าง Ala 110 และ Trp 111 และคาดว่ากลไกของการตัดโปรตีนที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolytic reaction) ของพันธะเอไมด์โดยมีโมเลกุลของน้ำเข้ามาจับกับไอออนของโลหะ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะขึ้นกับความเข้มข้นของ Co(III) complex ปฏิกิริยาการตัดโปรตีนโดยใช้ Co³⁺ ในกรณีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ reducing agent ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเมื่อนำสารละลายผสมของไลโซไซม์ และ pentammineaquocobalt(III) (หรือ tetramminediaquocobalt(III) ions) มาบ่ม (incubate) ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการตัดโปรตีนโดยมีกลไกแบบไฮโดรไลซิสจะดีกว่าแบบออกซิเดชัน เนื่องจากการเกิดออกซิเดชันอาจทำลายโปรตีนตรงบริเวณที่ถูกตัดทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนได้ ดังนั้นการพัฒนาสารประกอบเชิงซ้อนหรือไอออนของโลหะทรานซิชันโดยไม่ใช้ reducing agent จึงเป็นเรื่องที่ท้าทาย และน่าสนใจ

ซึ่งงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษา โมลิบดีนัม (molybdenum) เนื่องจากโมลิบดีนัมเป็นโลหะที่สำคัญชนิดหนึ่งของสารประกอบชีวโมเลกุล และเป็นโลหะที่พบใน metalloenzymes ยกตัวอย่างเช่น sulfite oxidase, nitrate reductase และ carbonmonoxide oxidoreductase เป็นต้น ซึ่ง metalloenzymes เหล่านี้พบในพืช โมลิบดีนัมในเอนไซม์ nitrate reductase ทำหน้าที่เป็น essential cofactor และจะทำหน้าที่ช่วยเพิ่มการตรึงไนโตรเจนในพืชบางชนิด หากขาดพืชจะเจริญเติบโตช้า รวมทั้งโมลิบดีนัมสามารถเกิดเป็นสารประกอบได้ง่าย และสามารถเกิดสารเชิงซ้อนได้หลายรูปแบบ ดังนั้น โมลิบดีนัมจึงเป็นโลหะชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ โดยยังไม่มีรายงานการตัดโปรตีนอย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพโดยใช้โลหะชนิดนี้ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้สารประกอบเชิงซ้อนของโมลิบดีนัมในการตัดโปรตีน ด้วยกลไกการตัดโปรตีนเป็นแบบปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการตัดโปรตีน ด้วยอนุพันธ์ของไฟรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง และการตัดโปรตีน ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนหรือไอออนของโลหะแทรนซิชัน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน ซึ่งใช้อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลองดังนี้

1. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง จากบริษัท Mettler toledo รุ่น AB104-S
- magnetic stirrer จากบริษัท GEM รุ่น MS-115
- แผ่นอะลูมิเนียม TLC จากบริษัท Merck
- rotary evaporator จากบริษัท Buchi รุ่น R-210
- melting point apparatus จากบริษัท Griffin
- ไมโครปิเปตต์ขนาด 2, 10, 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Gilson
- pH meter จากบริษัท Mettler Toledo
- cavitator ultrasonic cleaner จากบริษัท Mettler electronics
- thermoblock จากบริษัท FALC
- flexi dry จากบริษัท FTS Systems
- blot filter paper จากบริษัท BIO-RAD
- Sequi-BlotTM PVDF membrane (0.2 μm) จากบริษัท BIO-RAD
- ชุดอุปกรณ์ Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic transfer cell จากบริษัท BIO-RAD
- ชุดอุปกรณ์ SDS - PAGE apparatus จากบริษัท BIO-RAD
- เครื่องยูวีสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2401 PC จากบริษัท Shimadzu
- เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น FP-6200 (PC) จากบริษัท Jasco
- เครื่องสเปกโทรไลน์ รุ่น ENF-240C / FE จากบริษัท Spectronics Corporation

1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

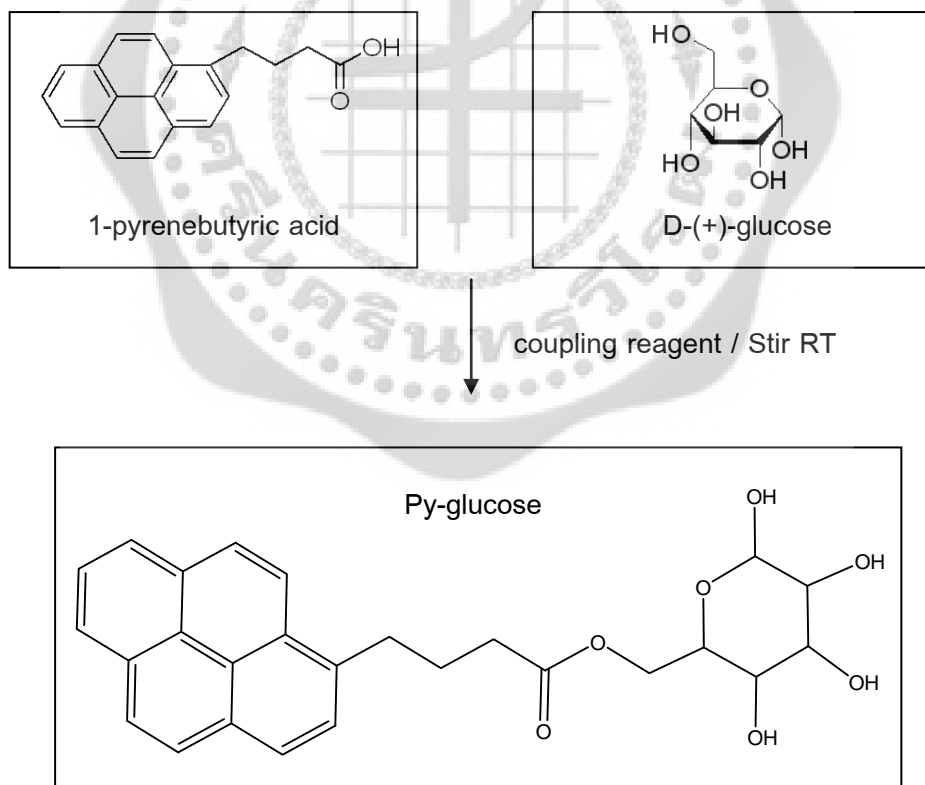
- 1-pyrenebutyric acid (PBA) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- 1(1-pyrene)methylamine hydrochloride (PMA) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- D-(+)-glucose จากบริษัท Carlo Erba
- D-(+)-glucosamine hydrochloride จากบริษัท Sigma-Aldrich

- D-glucuronic acid จากบริษัท Alibaba.com®
- pyridine จากบริษัท Carlo Erba
- β -D-glucopyranosiduronic acid จากบริษัท Toronto Research Chemicals
- *N,N*-dimethylformamide จากบริษัท Carlo Erba
- *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) จากบริษัท Fluka
- *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) จากบริษัท Fluka
- 4-dimethylaminopyridine (DMAP) จากบริษัท Carlo Erbra
- dichloromethane จากบริษัท Carlo Erbra
- methanol จากบริษัท Merck
- n-hexane จากบริษัท Carlo Erbra
- dimethylsulfosido PPE-ACS จากบริษัท Carlo Erbra
- isopropyl alcohol จากบริษัท Carlo Erbra
- acetic acid จากบริษัท Carlo Erbra
- acrylamide จากบริษัท Plusone
- methylenebisacrylamide จากบริษัท Plusone
- glycerol จากบริษัท Fluka
- deionized water
- ammonium persulfate จากบริษัท Sigma-Aldrich
- tetramethylethylenediamine (TMEDA หรือ TEMED) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- โปรตีนชนิดต่างๆ จากบริษัท Sigma-Aldrich
- Cobalt(III)hexamine trichloride (CoHA) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- coomassie blue R-250 จากบริษัท Sigma-Aldrich
- cyclohexylaminopropane sulfonic acid (CAPS) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- trizma® base จากบริษัท SAFC
- trizma[hydroxy]aminomethane hydrochloride (Trizma®hydrochloride) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- tricine จากบริษัท Sigma-Aldrich
- sodium dodecyl sulfate (SDS) จากบริษัท Sigma-Aldrich
- mark12™ MW Standard จากบริษัท Invitrogen
- bromophenol Blue จากบริษัท Plusone
- 2-mercaptoethanol จากบริษัท Merck
- ammoniumheptamolybdate-tetrahydrate จากบริษัท Merck

2. การสังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของผลิตภัณฑ์

วิธีการทดลอง

- นำ 1-pyrenebutyric acid (PBA) (หรือ 1(1-pyrene)methylamine hydrochloride (PMA) หรือ 1-hydroxypyrene) ไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำตาล เช่น D-(+)-glucose (หรืออนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ) ลงในตัวทำละลาย แล้วเติม coupling reagent (เช่น dicyclohexyl carbodiimide (DCC), *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) เป็นต้น) (ภาพประกอบ 30)
- คนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ TLC ทุกๆ 1 ชั่วโมง เมื่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ไม่เกิดขึ้นจึงเติม deionized water เพื่อหยุดปฏิกิริยา
- ทำการสกัดผลิตภัณฑ์ด้วย CH_2Cl_2 จากนั้นเก็บชั้น CH_2Cl_2 ที่ได้ไปสกัดล้างด้วยน้ำ แล้วใช้ MgSO_4 anhydrous เพื่อดูดความชื้น กรองและนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้ง
- นำสารที่ได้ (crude) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และใช้ตัวทำละลายผสมของ hexane/ CH_2Cl_2 /MeOH เป็นตัวชะ
- ตรวจสอบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ โดยใช้ UV, Fluorescence, IR, NMR และ mass spectroscopy



ภาพประกอบ 30 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ D-5-glucopyranosyl-4(1-pyrene)butyramide (py-glucose)

3. การศึกษาการตัดโปรตีนโดยการกระตุ้นด้วยแสง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายผสมปริมาตร 200 μl ของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้ (probe) (15 μM) โปรตีน (15 μM) และ CoHA (1 mM) ใน 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 และสารละลายผสมที่ไม่มี probe หรือ CoHA ในสถานะเดียวกันเป็นสารละลายควบคุม (control)
2. ทำการฉายแสงไปยังสารละลายผสมข้างต้นที่ความยาวคลื่นสูงสุดของ probe ในระยะเวลาต่างๆ เช่น 5, 10, 20 นาที เป็นต้น
3. เตรียมสารละลายผสมที่ไม่มีทำการฉายแสง (dark control) เพื่อเป็นการเปรียบเทียบ

4. การศึกษาการตัดโปรตีนโดยการกระตุ้นด้วยความร้อน

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายผสมปริมาตร 200 μl ของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทรานซิชัน เช่น $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ (0.125 mM) กับโปรตีน (15 μM) ใน 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0
2. ทำการให้ความร้อนที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. เตรียมสารละลายผสมที่ไม่มีทำการให้ความร้อน (heat control) เพื่อเป็นการเปรียบเทียบ

5. การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

1. การเตรียมสารละลายแคโทด 5x (500 มิลลิลิตร)

trizma [®] base	6.05	กรัม
tricine	8.96	กรัม
SDS	0.50	กรัม

ละลาย trizma[®] base, tricine และ SDS ใน deionize water ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ deionize (pH ของสารละลายประมาณ 8.25)

2. การเตรียมสารละลาย แอนโนด 5x (500 มิลลิลิตร)

trizma [®] base	12.20	กรัม
--------------------------	-------	------

ละลาย trizma[®] base ใน deionized water ปรับ pH ให้เป็น 8.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรด้วย deionized water ให้เป็น 500 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลายเจลบัพเฟอร์ (50 มิลลิลิตร)

trizma [®] base	36.32	กรัม
SDS	0.30	กรัม

ละลาย trizma[®] base และ SDS ด้วยน้ำ deionize 40 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับ pH ให้เป็น 8.45 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย deionized water

4. การเตรียมสารละลาย อะคริลาไมด์/บิสอะคริลาไมด์ (50 มิลลิลิตร)

acrylamide	23.25	กรัม
bisacrylamide	0.05	กรัม

ละลาย acrylamide และ bisacrylamide ด้วย deionized water 40 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย deionized water

5. การเตรียม loading buffer (100 มิลลิลิตร)

SDS	7	กรัม
glycerol	4	มิลลิลิตร
bromophenol blue R-250	0.01	กรัม
50 mM tris-HCl pH 6.8	96	มิลลิลิตร
mercaptoethanol	2	มิลลิลิตร

ผสม SDS, glycerol, bromophenol blue R-250 และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วย 50 mM Tris-HCl pH 6.8 แล้วเติม mercaptoethanol ที่หลังเมื่อต้องการใช้

6. การเตรียม staining solution (250 มิลลิลิตร)

isopropanol	25	มิลลิลิตร
acetic acid	25	มิลลิลิตร
coomassie blue R-250	0.05	กรัม

ละลาย coomassie blue R-250 ใน deionized water แล้วเติม isopropanol และ acetic acid ปริมาตรอย่างละ 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

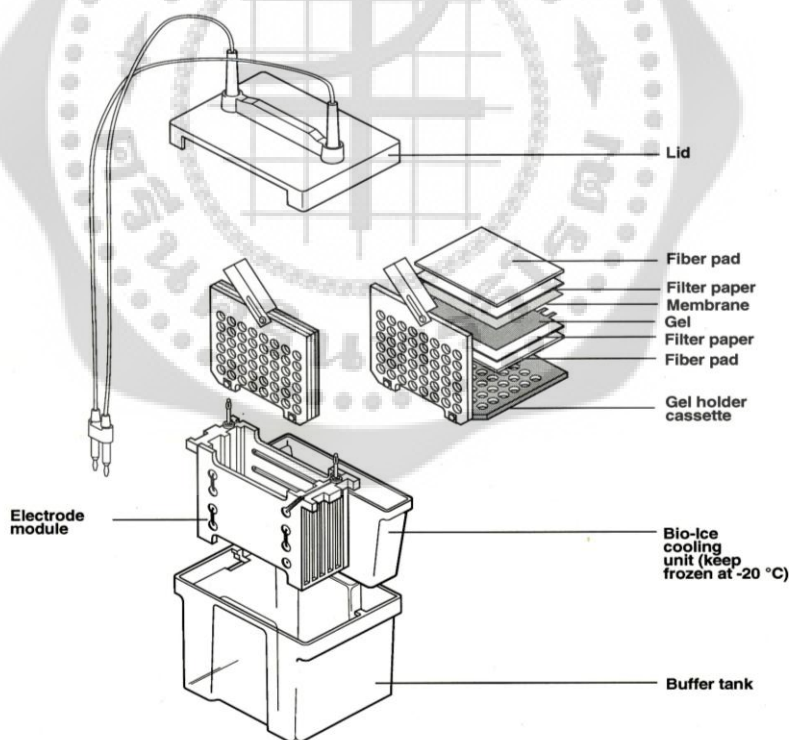
1. นำสารละลายผสมของปฏิกิริยาทั้งหมดที่ผ่านการฉายแสงหรือผ่านการให้ความร้อน รวมทั้งสารละลายควบคุมที่ใช้ในการเปรียบเทียบมาทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry
2. นำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปละลายใน loading buffer (24 μ l) จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 3 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
3. นำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้เปอร์เซ็นต์เจลที่เหมาะสมต่อโปรตีน เลือกกระแสไฟฟ้าที่ 60 โวลต์ สำหรับ stacking gel และ 110 โวลต์ สำหรับ separating gel
4. ภายหลังกการแยก นำโปรตีนไปย้อม (stain) ด้วย staining solution และทำการล้าง (destain) โดยใช้ 10% acetic acid

6. การย้าย โปรตีนโดย Western blot (protein transfer)

1. การเตรียมสารละลาย CAPS buffer 100 mM , pH 10.5
 - ละลาย CAPS 22.13 กรัม ใน deionized water
 - ปรับ pH ให้เป็น 11.0 โดยใช้ 2 N NaOH
 - ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร
2. การเตรียม staining solution สำหรับย้อม polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (200 มิลลิลิตร)
 - ชั่ง coomassie blue 200 มิลลิกรัม ละลายใน MeOH 90 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเขย่าเป็นเวลา 30 นาที
 - เติม deionized water 90 มิลลิลิตร และ acetic acid 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าอีกครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มากรอง
3. การเตรียม destaining solution สำหรับล้าง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (100 มิลลิลิตร)
 - ผสม MeOH ปริมาตร 45 มิลลิลิตร กับ deionized water 45 มิลลิลิตร
 - แล้วเติม acetic acid 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

วิธีการทดลอง

1. ตัด PVDF membrane 1 แผ่น และ blot filter paper 2 แผ่น ให้มีขนาดเท่ากับเจลที่ได้
2. นำ PVDF membrane ไปแช่ใน 100% methanol เป็นเวลา 2-3 วินาที
3. เมื่อนำเจลที่ได้ผ่านกระแสไฟฟ้า เพื่อทำการแยกเพปไทด์เรียบร้อยแล้ว (ไม่ต้องย้อมเจล) ต่อจากนั้นให้นำ blot filter paper, PVDF membrane, fiber pad และเจลที่เตรียมไว้ มาแช่ใน CAPS buffer, pH 10.5 เป็นเวลา 10-15 นาที
4. นำเจล blot filter paper, PVDF membrane, fiber pad และเจลประกบเข้าด้วยกันใน buffer tank และต่อเข้ากับแหล่งจ่ายไฟ (power supply) (ภาพประกอบ 31) โดยทำการปรับกระแสไฟฟ้า และเวลาที่ใช้ในการ transfer เพื่อให้เกิดการ transfer อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งการทดลองใช้เวลาประมาณ 0.5-1.5 ชั่วโมง
5. เมื่อครบกำหนดเวลาให้นำ PVDF membrane ที่ได้ทำการ transfer โปรตีนมาย้อมใน staining solution เป็นเวลาประมาณ 2 นาที (หรือจนมองเห็น band) แล้วจึงนำ PVDF membrane ไปล้าง ด้วย destaining solution ประมาณ 5 นาที แล้วจึงล้าง PVDF membrane ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วทำการตัด band ของเพปไทด์เพื่อนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนต่อไป



ภาพประกอบ 31 การเตรียมอุปกรณ์สำหรับการย้ายโปรตีน

ที่มา : Bio-Rad Laboratories. (2010). (online)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาการตัดโปรตีน ด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง และการตัดโปรตีน ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน โดยมีผลการทดลองดังนี้

1. การตัดโปรตีน ด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง
 - 1.1 การสังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่
 - 1.2 การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการกระตุ้นด้วยแสง
 - 1.3 การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE
2. การตัดโปรตีน ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน
 - 2.1 การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน
 - 2.2 การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE
 - 2.3 การย้ายโปรตีนโดย Western Blot (protein transfer) เพื่อหาลำดับกรดอะมิโน

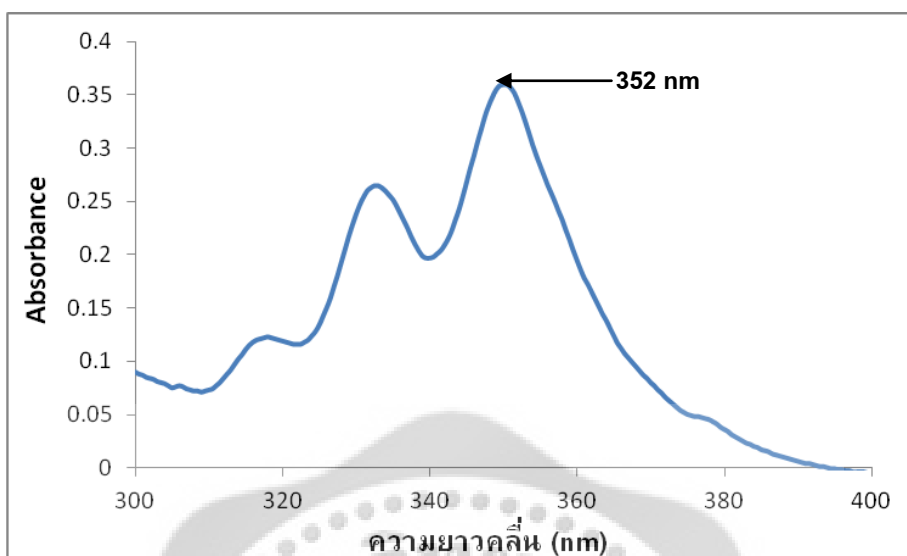
1. การตัดโปรตีน ด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง

1.1 การสังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่

จากการสังเคราะห์โมเลกุลของ D-5-glucopyranosyl-4(1-pyrene)butyramide (Py-glucose) ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดย column chromatography ซึ่งผลิตภัณฑ์ถูกชะออกมาที่ 5% CH₃OH/CH₂Cl₂ เป็นของแข็งสีขาวอมเหลือง มีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 45.77% แล้วนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบโครงสร้างดังนี้

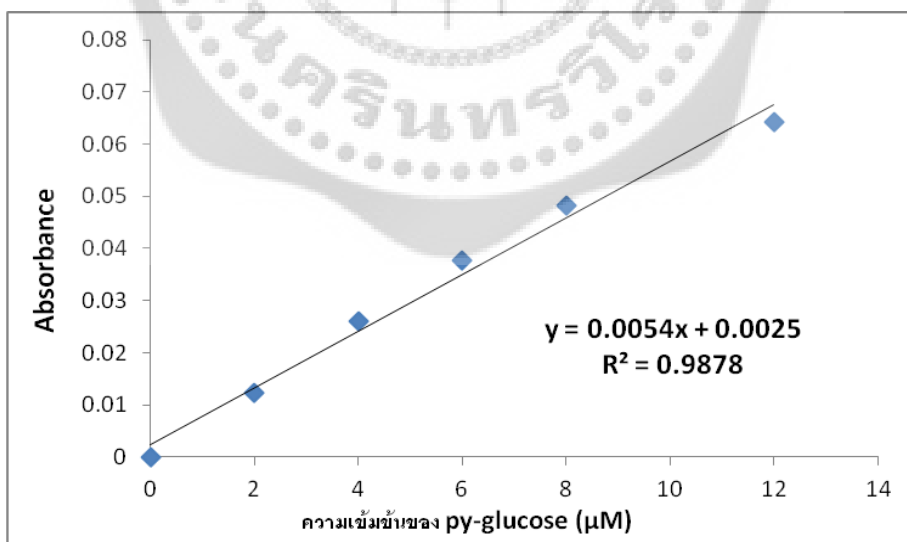
- 1.1.1 การดูดกลืนแสง
- 1.1.2 การคายแสง
- 1.1.3 Infrared spectroscopy (IR)
- 1.1.4 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)
- 1.1.5 Mass spectroscopy
- 1.1.6 จุดหลอมเหลว

1.1.1 การดูดกลืนแสง



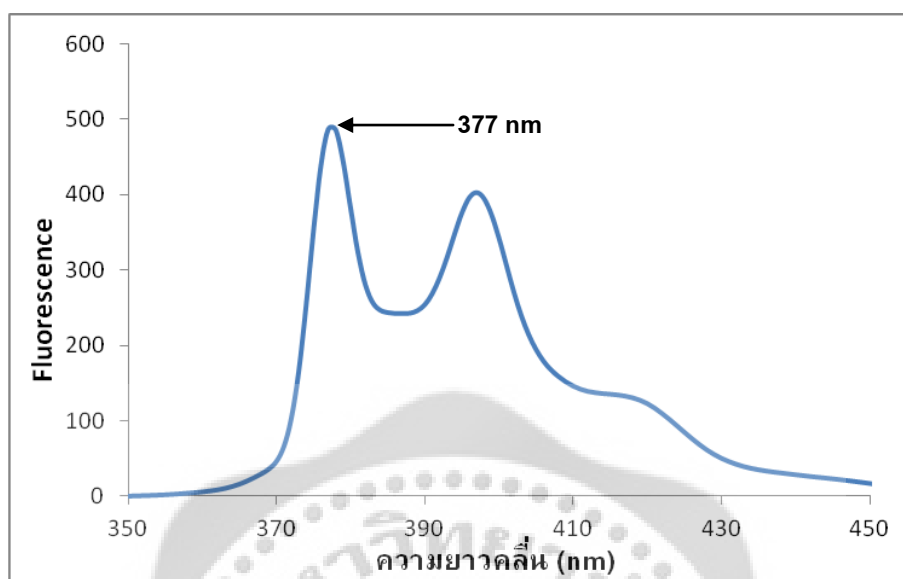
ภาพประกอบ 32 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-glucose

จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-glucose พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 352 nm (ภาพประกอบ 32) และจากการหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ Py-glucose โดยกราฟมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ $5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ภาพประกอบ 33)



ภาพประกอบ 33 กราฟมาตรฐาน Py-glucose

1.1.2 การคายแสง



ภาพประกอบ 34 สเปกตรัมการคายแสงของ Py-glucose

จากสเปกตรัมการคายแสงของ Py-glucose พบว่าให้ค่าการคายแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 377 nm ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 352 nm (ภาพประกอบ 34)

1.1.3 Infrared spectroscopy

O-H stretch 3328.71 cm^{-1} , C-H aliphatic stretch $2929.39\text{--}2852.03\text{ cm}^{-1}$, C=O (ester) 1702.11 cm^{-1} , C=C (alkene) 1627.19 cm^{-1} , C-H bending 1449.73 cm^{-1} , C-O stretch $1311.58\text{--}1087.62\text{ cm}^{-1}$

1.1.4 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 7.8–8.3 (9H), 5.5 (1H), 3.9 (1H), 3.3 (5H), 2.3 (2H), 2.0 (2H), 1.4–1.7 (2H)

1.1.5 Mass spectroscopy

MS data (FAB): m/z 450.1 (M^+)

1.1.6 จุดหลอมเหลว

170 -175 องศาเซลเซียส

1.2 การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการกระตุ้นด้วยแสง

การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการฉายแสงไปยังสารละลายผสมเป็นวิธีการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ทางหนึ่ง เหมือนแสงเป็นสารเคมีตัวหนึ่งในปฏิกิริยาซึ่งมีประโยชน์ดังนี้

- สะดวกในการใช้และราคาไม่แพง
- สามารถควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย (sharp control) โดยการเปิดและปิดแสง
- การเลือกความยาวคลื่นที่จำเพาะในการกระตุ้นโมเลกุลให้เกิดปฏิกิริยาจะช่วยลดการ

เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้

การเตรียมสารละลายผสมปริมาตร 200 μ L ประกอบด้วย Py-glucose (15 μ M) โปรตีน (15 μ M) และ CoHA (1 mM) ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.0 เตรียมดังตาราง 3

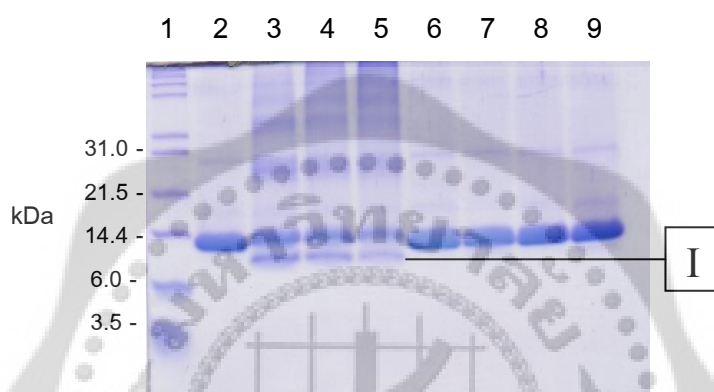
ตาราง 3 การเตรียมสารละลายผสม เพื่อศึกษาการตัดโปรตีนด้วยแสง

หลอดที่	รีเอเจนต์	เวลาที่ใช้ในการฉายแสง (นาที) ที่ความยาวคลื่น 352 nm
1	Py-glucose โปรตีน CoHA	Control
2	Py-glucose โปรตีน CoHA	5
3	Py-glucose โปรตีน CoHA	10
4	Py-glucose โปรตีน CoHA	20
5	Py-glucose โปรตีน -	Control
6	Py-glucose โปรตีน -	20
7	- โปรตีน CoHA	Control
8	- โปรตีน CoHA	20

ซึ่งโปรตีนชนิดต่างๆที่ได้นำมาทดสอบคือ 1) lysozyme 2) avidin 3) β -glucosidase 4) bovine serum albumin (BSA) 5) lectin 6) L-amino acid 7) myoglobin 8) α -casein 9) α -chymotrypsin 10) pepsin 11) β -lactoglobulin B 12) concanalinalin A

1.3 การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

จากนั้นนำสารละลายผสมที่ผ่านการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 352 nm ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Flexi Dry จากบริษัท FTS Systems แล้วนำมาตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยเทคนิคทางอิมมูโนโบลอตติง (SDS-PAGE) พบว่าสามารถตัด lysozyme (ภาพประกอบ 35-36) และ avidin (ภาพประกอบ 38) ได้ และพบว่าการศึกษาการตัดโปรตีนจะเกิดขึ้นได้นั้น ต้องมีตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) อยู่ด้วย ซึ่งตัวรับอิเล็กตรอนที่ใช้คือ Cobalt(III)hexamine trichloride ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ หรือ CoHA) โดย CoHA ดูดกลืนแสงได้น้อยมากในช่วงความยาวคลื่นนี้



ภาพประกอบ 35 แสดง SDS-PAGE ของการตัด lysozyme ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μM Py-glucose + 15 μM lysozyme + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μM Py-glucose + 15 μM lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μM Py-glucose + 15 μM lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

Lane 5 : 15 μM Py-glucose + 15 μM lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μM Py-glucose + 15 μM lysozyme, dark control

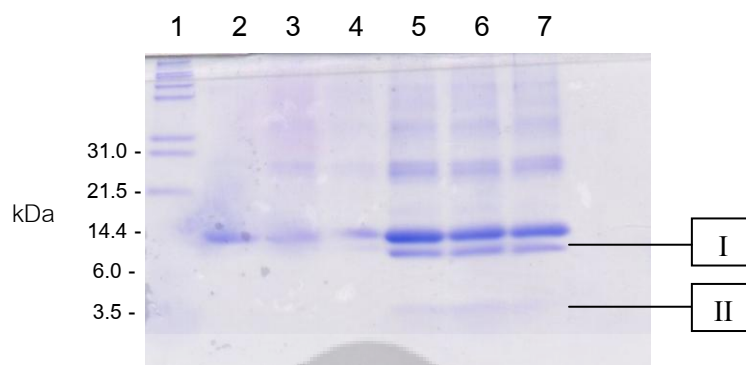
Lane 7 : 15 μM Py-glucose + 15 μM lysozyme, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μM lysozyme + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μM lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

จากการตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่า lysozyme ถูกตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ 1 ตำแหน่ง โดยเกิด fragment อย่างน้อย 2 fragment แต่ที่พบเพียง 1 band บนเจลอาจเป็นเพราะว่าเพปไทด์อีกสายมี molecular weight น้อย ทำให้ staining solution ย้อมสีได้ไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะ (specificity) ของ probe ในการตัดโปรตีน โดยการตัดโปรตีนจะเกิดขึ้นได้ต้องมี probe ตัวรับอิเล็กตรอน และแสง (ภาพประกอบ 35 ; Lane 3-5) หากขาดตัวใดตัวหนึ่งจะไม่สามารถเกิดการตัดโปรตีนได้

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาต่อถึงเวลาที่น้อยที่สุดในการเกิดปฏิกิริยาการตัดโปรตีน (lysozyme) เมื่อทำการฉายที่ 352 nm



ภาพประกอบ 36 แสดง SDS-PAGE ของการตัด lysozyme ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lysozyme + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 1 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 2 min

Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 3 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 4 min

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lysozyme + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

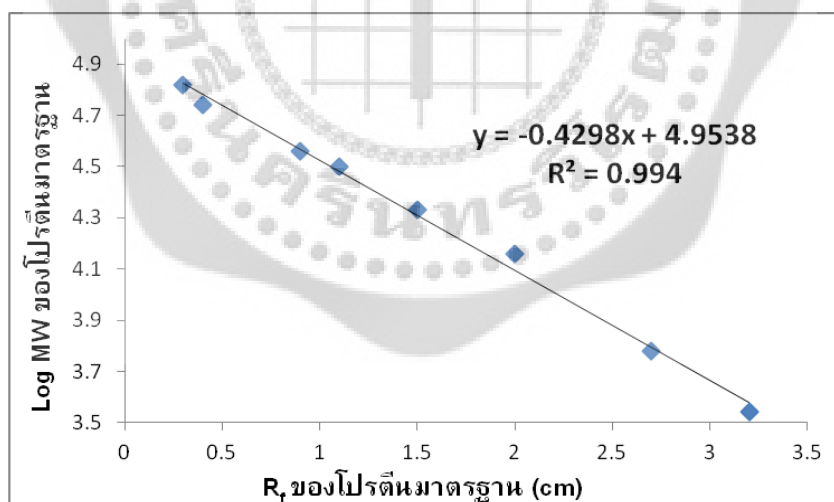
จากผลการทดลองพบว่าการฉายแสงเพียง 3 นาที ก็สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการตัดโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ภาพประกอบ 36 ; Lane 5)

การคำนวณหาโมเลกุลโดยประมาณของเพปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีน (lysozyme) ทำโดยการวัดระยะทางของโปรตีนมาตรฐาน (R_f ของ marker) และ fragment ที่ได้จากการตัดโปรตีน มีหน่วยเป็นเซนติเมตร (cm) ได้ผลดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 การคำนวณหามวลโมเลกุลของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด lysozyme

MW (marker) (kDa)	R _f (marker) (cm)	log MW (marker)
66300	0.3	4.82
55400	0.4	4.74
36500	0.9	4.56
31000	1.1	4.5
21500	1.5	4.33
14400	2	4.16
6000	2.7	3.78
3500	3.2	3.54

จากนั้นพลอตกราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (log MW marker) กับอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเปปไทด์บนเจล (ภาพประกอบ 37)



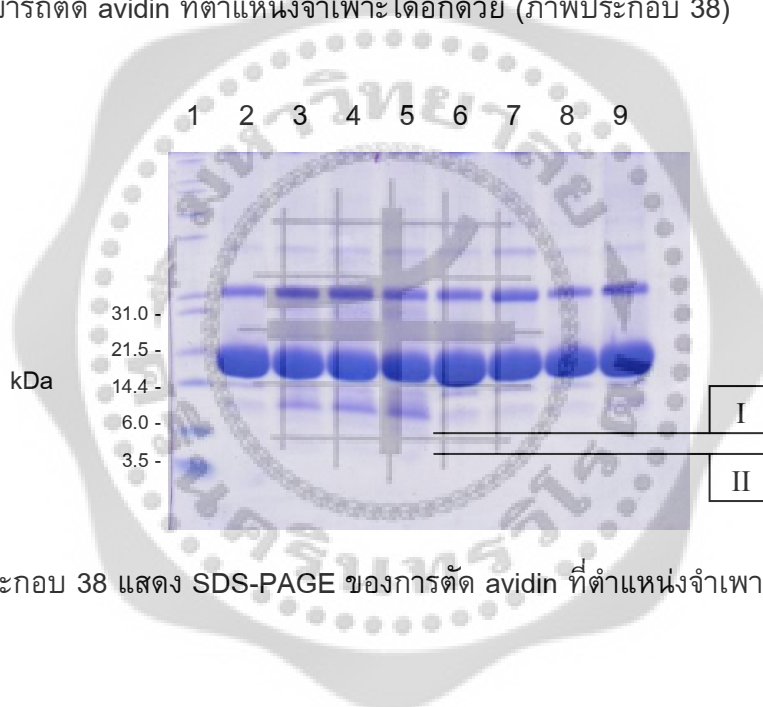
ภาพประกอบ 37 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล (log MW) ของโปรตีนมาตรฐานกับอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเปปไทด์บนเจล

อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ (mobility) ของสายเพปไทด์ จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับ logarithm ของมวลโมเลกุลของโปรตีน (log MW) ดังสมการ

$$\text{Log MW} = a - bx$$

โดยที่ a และ b เป็นค่าคงที่ และ x คืออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเพปไทด์ จากการคำนวณหามวลโมเลกุลของ fragments ที่ระยะทางของเพปไทด์ที่วัดได้เป็น 2.5 และ 3.1 (cm) พบว่ามีมวลโมเลกุลประมาณ 7.57 และ 4.18 (kDa)

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการตัด avidin พบว่านอกจาก probe จะสามารถตัด lysozyme ได้แล้ว probe ยังสามารถตัด avidin ที่ตำแหน่งจำเพาะได้อีกด้วย (ภาพประกอบ 38)



ภาพประกอบ 38 แสดง SDS-PAGE ของการตัด avidin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M avidin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M avidin + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M avidin + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M avidin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M avidin, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M avidin, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M avidin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M avidin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

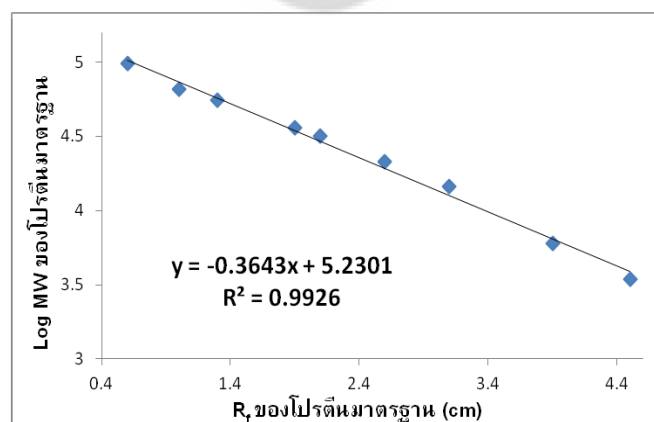
จากการตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า avidin ถูกตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ 1 ตำแหน่ง โดยเกิด fragment ที่สามารถเห็นได้บนเจลอย่างน้อย 2 band (ภาพประกอบ 38 ; Lane 3-5)

การคำนวณหามวลโมเลกุลโดยประมาณของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีน (avidin) ทำได้โดยวัดระยะทางของโปรตีนมาตรฐาน (R_f ของ marker) และ fragment ที่ได้จากการตัดโปรตีน (avidin) มีหน่วยเป็นเซนติเมตร (cm) ดังตาราง 5

ตาราง 5 การคำนวณหามวลโมเลกุลของเปปไทด์ที่ได้จากการตัด avidin

MW (marker) (kDa)	R_f (marker) (cm)	log MW (marker)
97400	0.6	4.99
66300	1	4.82
55400	1.3	4.74
36500	1.9	4.56
31000	2.1	4.5
21500	2.6	4.33
14400	3.1	4.16
6000	3.9	3.78
3500	4.5	3.54

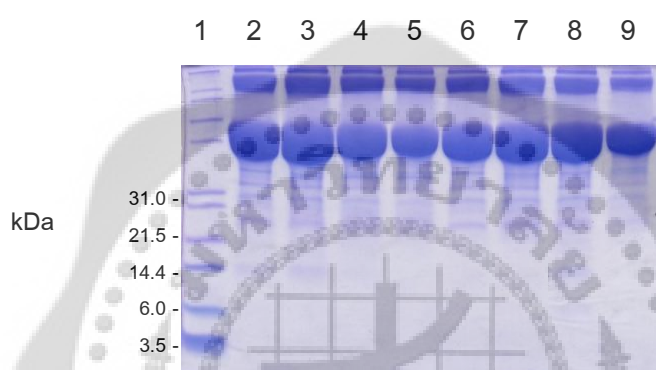
แล้วพลอตกราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (log MW marker) กับอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเปปไทด์บนเจล (ภาพประกอบ 39)



ภาพประกอบ 39 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล (log MW) ของโปรตีนมาตรฐานกับอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเปปไทด์บนเจล

จากการคำนวณหามวลโมเลกุลของ fragments ในตำแหน่งที่ 1 ระยะทางของเพปไทด์ที่วัดได้ เป็น 3.8 cm พบว่ามีมวลโมเลกุลประมาณ 7.01 kDa และมวลโมเลกุลของ fragments ในตำแหน่งที่ 2 ระยะทางของเพปไทด์ที่วัดได้เป็น 4.2 cm พบว่ามีมวลโมเลกุลประมาณ 5.01 kDa

ส่วนโปรตีนอื่นๆ ได้แก่ bovine serum albumin (BSA), lectin, L-amino acid, myoglobin, β -glucosidase, α -casein, α -chymotrypsin และ pepsin ที่ได้นำมาทดสอบพบว่าไม่เกิดการตัดโปรตีน (ภาพประกอบ 40-47) และมีโปรตีนบางชนิดเกิดเป็น dimer ขึ้น เช่น β -lactoglobulin B และ concanacalin A (ภาพประกอบ 48-49)



ภาพประกอบ 40 แสดง SDS-PAGE ของ BSA

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M BSA + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M BSA + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M BSA + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

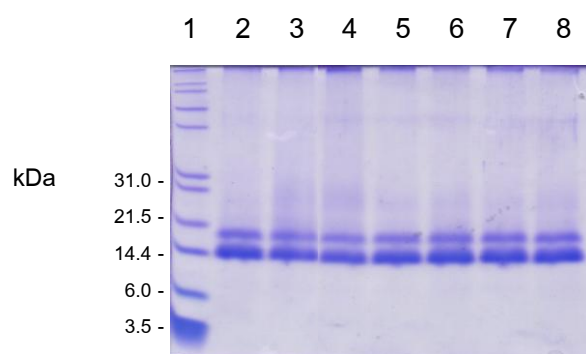
Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M BSA + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M BSA, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M BSA, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M BSA + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M BSA + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 41 แสดง SDS-PAGE ของ lectin

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lectin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lectin + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

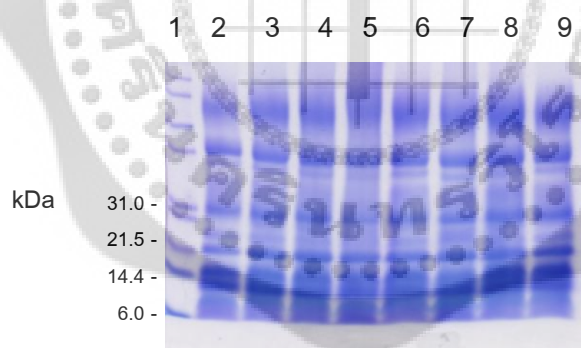
Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lectin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lectin, dark control

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M lectin, 352 nm, 20 min

Lane 7 : 15 μ M lectin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 8 : 15 μ M lectin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 42 แสดง SDS-PAGE ของ L-amino acid

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M L-amino acid + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M L-amino acid + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M L-amino acid + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

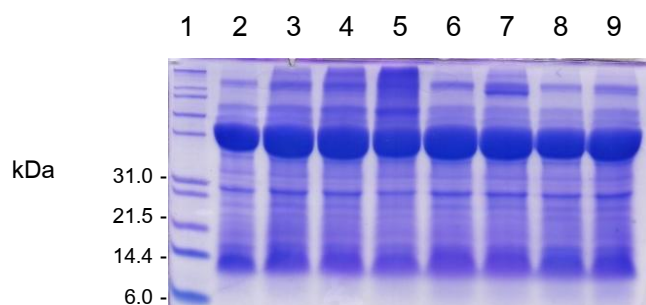
Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M L-amino acid + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M L-amino acid, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M L-amino acid, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M L-amino acid + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M L-amino acid + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 43 แสดง SDS-PAGE ของ myoglobin

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M myoglobin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M myoglobin + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M myoglobin + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

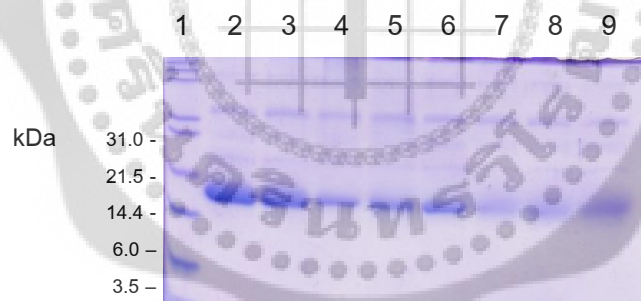
Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M myoglobin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M myoglobin, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M myoglobin, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M myoglobin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M myoglobin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 44 แสดง SDS-PAGE ของ β -glucosidase

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -glucosidase + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -glucosidase + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -glucosidase + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

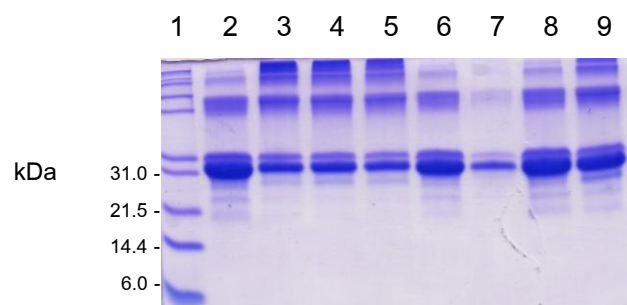
Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -glucosidase + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -glucosidase, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -glucosidase, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M β -glucosidase + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M β -glucosidase + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 45 แสดง SDS-PAGE ของ α -casein

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -casein + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -casein + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -casein + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

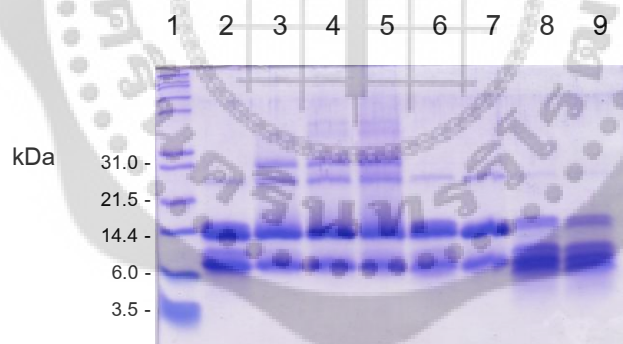
Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -casein + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -casein, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -casein, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M α -casein + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M α -casein + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 46 แสดง SDS-PAGE ของ α -chymotrypsin

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -chymotrypsin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -chymotrypsin + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -chymotrypsin + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

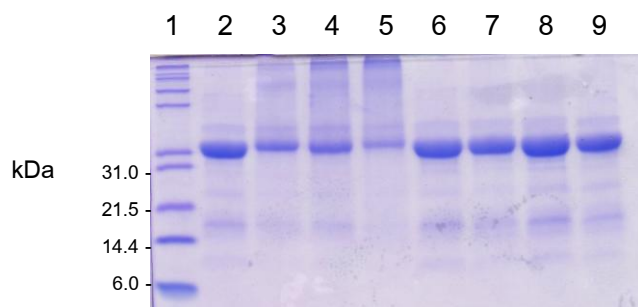
Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -chymotrypsin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -chymotrypsin, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M α -chymotrypsin, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M α -chymotrypsin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M α -chymotrypsin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 47 แสดง SDS-PAGE ของ pepsin

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M pepsin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M pepsin + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M pepsin + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

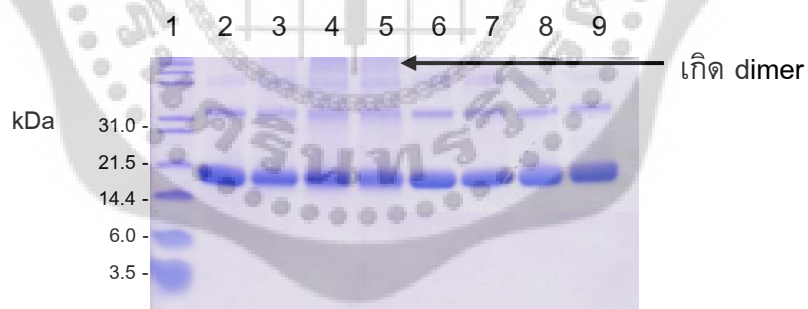
Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M pepsin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M pepsin, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M pepsin, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M pepsin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M pepsin + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 48 แสดง SDS-PAGE ของ β -lactoglobulin B

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -lactoglobulin B + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -lactoglobulin B + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -lactoglobulin B + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

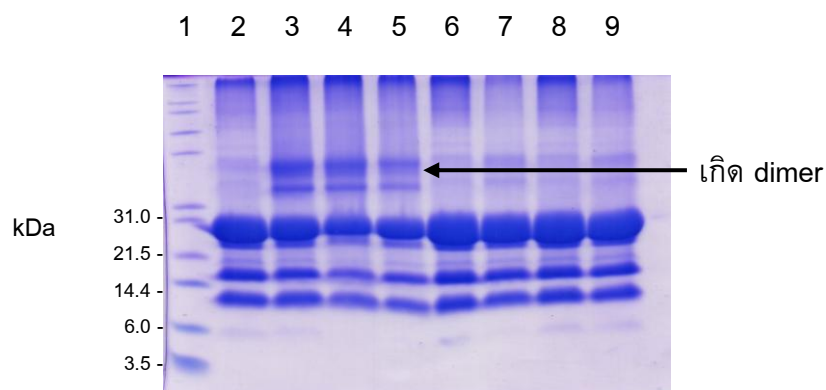
Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -lactoglobulin B + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -lactoglobulin B, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M β -lactoglobulin B, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M β -lactoglobulin B + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M β -lactoglobulin B + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min



ภาพประกอบ 49 แสดง SDS-PAGE ของ concanavalin A

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M concanavalin A + 1 mM CoHA, dark control

Lane 3 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M concanavalin A + 1 mM CoHA, 352 nm, 5 min

Lane 4 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M concanavalin A + 1 mM CoHA, 352 nm, 10 min

Lane 5 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M concanavalin A + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

Lane 6 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M concanavalin A, dark control

Lane 7 : 15 μ M Py-glucose + 15 μ M concanavalin A, 352 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M concanavalin A + 1 mM CoHA, dark control

Lane 9 : 15 μ M concanavalin A + 1 mM CoHA, 352 nm, 20 min

เนื่องจาก Py-glucose ที่สังเคราะห์ได้ไม่มีความเสถียรเท่าที่ควร ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Py-glucose ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-Cl, pH 7.0 จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อทำการวัดการดูดกลืนแสงซ้ำที่ความยาวคลื่นเดิม ผู้วิจัยจึงไม่ได้ทำการศึกษาการ binding ระหว่าง Py-glucose และโปรตีน และไม่ได้ทำการย้ายโปรตีนที่ได้จากการตัด เพื่อหาลำดับของกรดอะมิโน

2. การตัดโปรตีน ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะแทรนซิชัน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน

2.1 การศึกษาการตัดโปรตีน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน

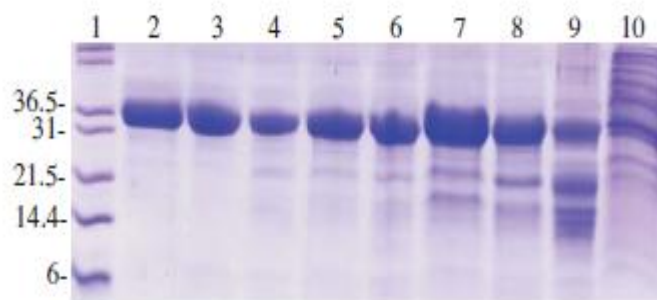
จากการทดลองก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยพบว่าการใช้ $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ ความเข้มข้นเพียง 0.125 mM สามารถใช้ตัดโปรตีนได้ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการเตรียมสารละลายผสมปริมาตร 200 μL ของ $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ (0.125 mM) และ pepsin (15 μM) ใน 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 แล้วให้ความร้อนที่ 37°C เป็นเวลา 1-24 ชั่วโมง และเตรียมสารละลายผสมที่ไม่มีการให้ความร้อน (heat control) โดยนำไปแช่แข็งที่ -20°C ทันทีหลังผสมสารละลายเสร็จ เพื่อใช้เป็นสารเปรียบเทียบ เตรียมตาราง 6

ตาราง 6 การเตรียมสารละลายผสม เพื่อศึกษาการตัดโปรตีนด้วยความร้อน

หลอดที่	รีเอเจนต์	เวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน (ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 37°C
1	- pepsin	Control
2	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ pepsin	Control
3	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ pepsin	2
4	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ pepsin	4
5	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ pepsin	6
6	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ pepsin	18
7	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ pepsin	24
8	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ pepsin	48
9	$\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ pepsin	72

2.2 การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

จากนั้นนำสารละลายผสมที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 37°C ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง Flexi Dry จากบริษัท FTS Systems แล้วนำมาตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า pepsin ถูกตัดโดยใช้ความเข้มข้นของ $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ เพียง 0.125 mM เท่านั้น และปฏิกิริยาสามารถเกิดภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง (pH 7.0 และอุณหภูมิ 37°C) (ภาพประกอบ 50)



ภาพประกอบ 50 แสดง SDS-PAGE ของการตัด pepsin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยความร้อน

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 15 μ M pepsin

Lane 3 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μ M pepsin, heat control

Lane 4 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μ M pepsin, 37 $^{\circ}$ C, 2 hr.

Lane 5 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μ M pepsin, 37 $^{\circ}$ C, 4 hr.

Lane 6 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μ M pepsin, 37 $^{\circ}$ C, 6 hr.

Lane 7 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μ M pepsin, 37 $^{\circ}$ C, 18 hr.

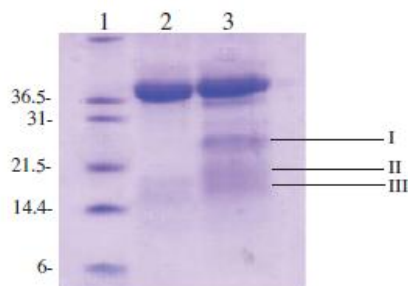
Lane 8 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μ M pepsin, 37 $^{\circ}$ C, 24 hr.

Lane 9 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μ M pepsin, 37 $^{\circ}$ C, 48 hr.

Lane 10 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μ M pepsin, 37 $^{\circ}$ C, 72 hr.

จากการตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นในระยะเวลาเพียง 2 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 50 ; Lane 4) โดยพบ band ของ fragment ที่ได้จากการตัดโปรตีนอย่างน้อย 3 band แต่ที่เห็นสีย้อมบนเจลไม่ชัดเจนอาจเป็นเพราะสายเพปไทด์ที่ตัดได้มีปริมาณน้อย และเมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความร้อน (2-18 hr) ปฏิกิริยาจะเกิดได้มากขึ้น (ภาพประกอบ 50 ; Lane 4-6) แต่หลังจากให้ความร้อนเกิน 18 ชั่วโมง การเกิดปฏิกิริยาจะคงที่ (ภาพประกอบ 50 ; Lane 7-8) นอกจากนี้ยังพบว่าความจำเพาะในการตัดโปรตีนจะลดลง หากเพิ่มระยะเวลาในการให้ความร้อนนานกว่า 48 ชั่วโมง โดยเกิดการ smear บนเจล (ภาพประกอบ 50 ; Lane 9-10)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มาทดสอบอีกครั้งเพื่อยืนยันผล (ภาพประกอบ 51) จะเห็นได้ว่าการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะถึง 3 ตำแหน่ง จากนั้นจึงนำเจลมาทำการย้ายโปรตีนโดย Western Blot (protein transfer) เพื่อหาลำดับกรดอะมิโนต่อไป



ภาพประกอบ 51 แสดง SDS-PAGE ของการตัดโปรตีน pepsin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยความร้อน

Lane 1 : Marker

Lane 2 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μM pepsin, heat control

Lane 3 : 0.125 mM $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ + 15 μM pepsin, 37°C, 24 hr.

2.3 การย้ายโปรตีนโดย Western Blot (protein transfer) เพื่อหาลำดับกรดอะมิโน

เมื่อตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้ว จึงทำการย้ายโปรตีนที่ได้จากการตัดเพื่อหาลำดับของกรดอะมิโน การทดลองในขั้นตอนนี้ จะใช้สภาวะในการ transfer ดังนี้ คือ กระแสไฟฟ้า 140 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เวลา 60 นาที และ CAPs buffer, pH 10.95 เป็นอิเล็กโทรไลต์ จากการหาลำดับกรดอะมิโนที่ถูกตัดจะทำโดยส่งไปวิเคราะห์ที่ Midwest Analytical, Inc., USA. พบว่าทั้ง 3 ตำแหน่ง (I, II และ III) ที่ได้จากการตัดโปรตีน (pepsin) มีมวลโมเลกุลประมาณ 23, 19 และ 16 kDa ตามลำดับ โดยหาลำดับของกรดอะมิโน 5 ลำดับจากปลายด้าน NH_2 (N-terminal) พบว่าในตำแหน่ง I มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น YYAPF (Tyr-Tyr-Ala-Pro-Phe) ส่วนตำแหน่ง II พบลำดับของกรดอะมิโน 2 สาย คือ LGGID (Leu-Gly-Gly-Ile-Asp) และ IGDEP (Ile-Gly-Asp-Glu-Pro) ซึ่งเป็น N-terminal ของ pepsin และ ตำแหน่ง III มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น NWVPV (Asn-Trp-Val-Pro-Val) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ pepsin จะพบว่าการตัดโปรตีนเกิดขึ้นที่ 3 ตำแหน่ง คือ ระหว่าง Leu 112-Tyr 113, Leu 166-Leu 167 และ Leu 178-Asn 179

$\text{H}_2\text{N-Ile-Gly-Asp-Glu-Pro}\dots\dots\dots\text{Ser-Phe} - \text{Leu (112)} - \text{Tyr(113)-Tyr-Ala-Pro-Phe}\dots\dots\dots\text{-COOH}$

$\text{H}_2\text{N-Ile-Gly-Asp-Glu-Pro}\dots\dots\dots\text{Val-Val-Leu (166)} - \text{Leu(167)-Gly-Gly-Ile-Asp}\dots\dots\dots\text{-COOH}$

$\text{H}_2\text{N-Ile-Gly-Asp-Glu-Pro}\dots\dots\dots\text{Gly-Ser-Leu (178)} - \text{Asn(179)-Trp-Val-Pro-Val}\dots\dots\dots\text{-COOH}$

บทที่ 5

การสรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยได้ศึกษาการตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง และการตัดโปรตีน ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของโมลิบดีนัม โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน ซึ่งการสรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และให้ข้อเสนอแนะดังนี้

1. การตัดโปรตีนด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง

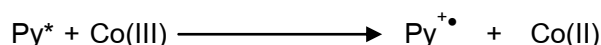
จากการศึกษาการตัดโปรตีนโดยใช้ Py-glucose เป็น probe ซึ่งโมเลกุลของ Py-glucose จะประกอบไปด้วยส่วนที่ไม่มีขั้ว (วงไพรีน) ส่วนที่มีขั้ว (OH) และ linker สายสั้นๆ จากองค์ประกอบนี้จะทำให้ probe จับกับโปรตีนได้จำเพาะมากขึ้น เนื่องจากโปรตีนมีส่วนที่ไม่มีขั้ว และส่วนที่มีขั้วเช่นกัน โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำของ probe คือหมู่ไพรีนจะทำหน้าที่รับแสง ซึ่งการตัดโปรตีนจะเกิดขึ้นได้เมื่อทำการฉายแสงไปยังสารละลายผสมของโปรตีนและ probe โดยมี Cobalt(III)hexamine trichloride (CoHA) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน จากการทดลองพบว่าสามารถตัดโปรตีน lysozyme ได้ 2 fragment ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 7.57 และ 4.18 kDa และตัดโปรตีน avidin ได้ 2 fragment โดยมีมวลโมเลกุลประมาณ 7.01 และ 5.01 kDa ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาทำโดยการฉายแสงที่มีความยาวคลื่น 352 nm (λ_{max} ของ Py-glucose) ไปยังสารละลายผสมของ Py-glucose (15 μ M) + lysozyme (หรือ avidin) (15 μ M) + CoHA (1 mM) และการตัดโปรตีนนั้นจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าไม่มี Py-glucose หรือ CoHA หรือ แสง อย่างใดอย่างหนึ่งในปฏิกิริยา โดยงานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้โปรตีนหลายชนิดมาทดสอบการเกิดปฏิกิริยาการตัดโปรตีน พบว่าโปรตีนบางส่วนเกิดการตัด และ ไม่เกิดการตัด โดยสรุปการตัดโปรตีน ได้ดังตาราง 7

เนื่องจากไพรีนเป็นโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 300-400 nm จากการหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (absorption extinction coefficient, ϵ) ของ Py-glucose โดยดูจากกราฟมาตรฐาน พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงที่สูงประมาณ $5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ที่ ความยาวคลื่น 352 nm โดยโปรตีนจะไม่เกิดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้ ดังนั้น จึงสามารถใช้เทคนิคสเปกโตรสโกปีในการศึกษาการจับของ probe กับโปรตีนได้ แต่เมื่อทำการศึกษาพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ Py-glucose ลดลงอย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น อาจเนื่องมาจากความไม่เสถียรของสาร งานวิจัยนี้จึงไม่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการจับระหว่าง probe กับโปรตีน

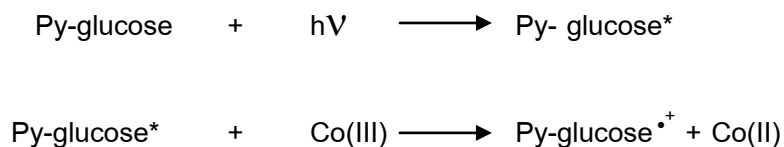
ตาราง 7 ผลการทดสอบการตัดโปรตีนด้วยแสง

โปรตีน	การตัดโปรตีนด้วยแสง
LYSOZYME	✓
AVIDIN	✓
BSA	×
LECTIN	×
L-AMINO ACID	×
MYOGLOBIN	×
β-GLUCOSIDASE	×
α-CASEIN	×
α-CHYMOTRYPSIN	×
PEPSIN	×
β-LACTOGLOBULIN B	×
CONCAVALIN A	×

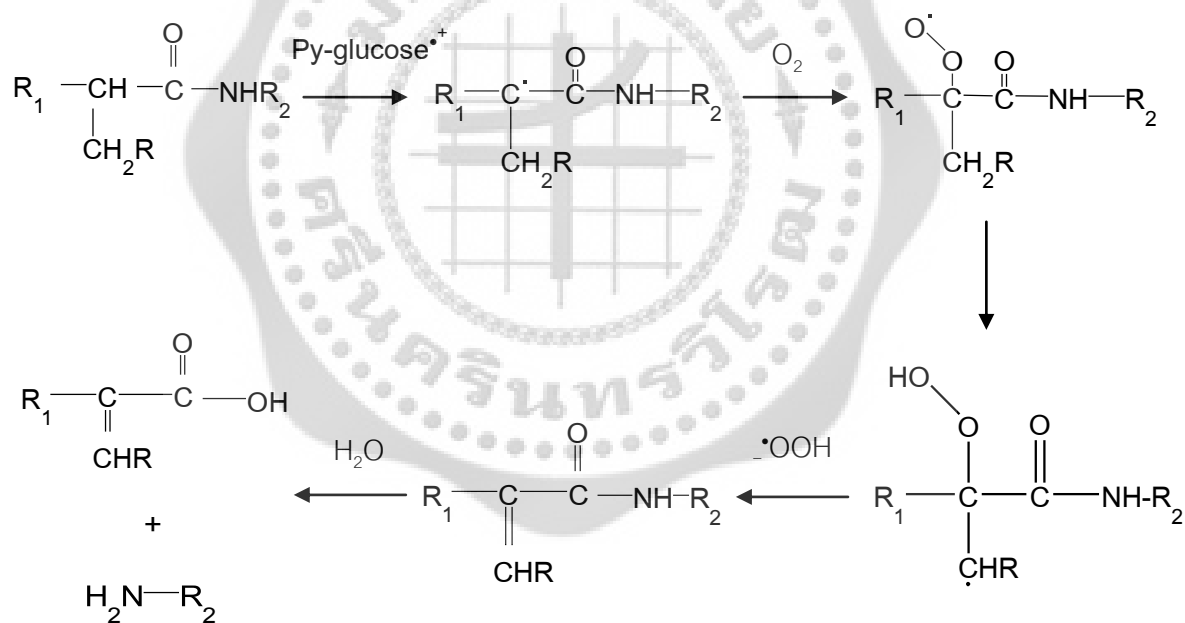
จากการศึกษาการตัดโปรตีนที่ผ่านมาโดยใช้โมเลกุลที่เป็นอนุพันธ์ของไพรีน (Py-Phe) कुमार และคนอื่นๆ (Kumar; et al. 1998: 10361-10366) สามารถอธิบายการตัดโปรตีนได้จากความสามารถของ CoHA ที่ไปยับยั้ง (quench) การคายแสงของหมูไพรีนในสภาวะกระตุ้น (excited state pyrene, Py*) จึงทำให้เกิดอนุมูลประจุบวกของไพรีน (pyrene cation radical; Py⁺) เป็น intermediate หลังจาก CoHA รับอิเล็กตรอนจาก Py* ซึ่ง Py⁺ เป็นตัวกลางสำคัญในปฏิกิริยาการตัดโปรตีน เนื่องจาก Py⁺ สามารถดึงอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom abstraction) ออกจากแอลฟาคาร์บอน (α-carbon) ของกรดอะมิโนตัวหนึ่งในโปรตีน ตรงตำแหน่งที่ probe จับ เกิดเป็นอนุมูลอิสระของแอลฟาคาร์บอน ซึ่งก่อให้เกิดการสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) ของพันธะเพปไทด์ โดยปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการตัดโปรตีนเป็นดังต่อไปนี้



ดังนั้นกลไกที่เป็นไปได้ในการตัดโปรตีนด้วยแสงด้วย Py-glucose จึงคาดว่าเหมือนกับกลไกการตัดโปรตีนในกรณีของ Py-Phe



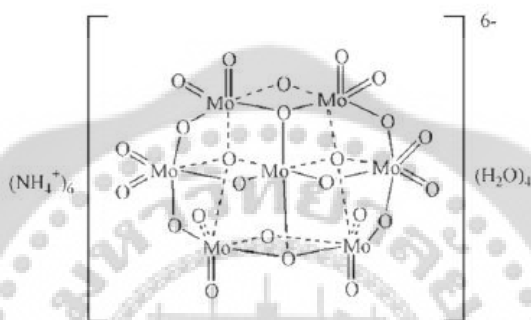
โดยจะเริ่มจาก $\text{Py-glucose}^{\bullet+}$ ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากฉายแสง เข้าไปจับกับอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน (α -carbon) ของกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งตรงบริเวณ binding site จากนั้นเกิดการเติมออกซิเจน (O_2) ที่ตำแหน่ง carbon-centered radical ได้เป็น peroxy radical ($-\text{C}-\text{COO}^\bullet$) แล้วเกิดการตัดพันธะเพปไทด์โดยการสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) ทำให้โปรตีนถูกตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยสามารถนำไปหาลำดับของกรดอะมิโนต่อไปได้ (ภาพประกอบ 52)



ภาพประกอบ 52 กลไกที่เป็นไปได้ในการตัดโปรตีน

2. การตัดโปรตีน ด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทรานซิชัน โดยการกระตุ้นด้วยความร้อน

ในการทดลองนี้ได้นำสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทรานซิชัน คือ โมลิบดินัม (Mo) ซึ่งเป็นโลหะที่สำคัญชนิดหนึ่ง ที่พบใน metalloenzymes ยกตัวอย่างเช่น nitrate reductase ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยโมลิบดินัมมาก่อน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ใช้ molybdenum cluster ในการศึกษาการตัดโปรตีน โดยใช้ Ammoniumheptamolybdate-Tetrahydrate $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}]$ (ภาพประกอบ 53) ซึ่งปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรงคือ ที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ และ pH 7.0 โดยไม่จำเป็นต้องใช้ reducing agent



ภาพประกอบ 53 โครงสร้างของ Ammoniumheptamolybdate-Tetrahydrate $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}]$

จากการทดลองถึงแม้ว่ากลไกการเกิดปฏิกิริยาจะไม่ชัดเจน แต่คาดว่ามีการเกิดปฏิกิริยาแบบไฮโดรไลซิสเช่นเดียวกับการทดลองของ कुमार และคนอื่นๆ (Kumar; et al. 2000: 597-598) ซึ่งการตัดโปรตีนโดยผ่านกลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบไฮโดรไลซิส ดีกว่าการตัดโปรตีนโดยผ่านกลไกแบบออกซิเดชัน นอกจากนี้การเกิดออกซิเดชันอาจทำลายโปรตีนตรงบริเวณที่ถูกตัดโดย hydroxyl radicals (OH^\bullet) ที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนทำให้เกิดการแตกของพันธะเพปไทด์และอาจเกิดการทำลายกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ถูกตัด ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการพัฒนาสารประกอบเชิงซ้อนหรือไอออนของโลหะทรานซิชันเพื่อตัดโปรตีนโดยไม่ใช้ reducing agent และสามารถนำโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทรานซิชันเหล่านี้ มาทำหน้าที่แทนเอนไซม์ในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะได้

จากผลการทดลองสารละลายผสมปริมาตร 200 μl ของ $Mo_7O_{24}^{6-}$ (0.125 mM) และ pepsin (15 μM) ใน 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 มาให้ความร้อนที่ $37^\circ C$ เป็นเวลา 1-24 ชั่วโมง พบว่าสามารถตัดโปรตีน pepsin อย่างจำเพาะได้ 3 ตำแหน่ง โดยไม่จำเป็นต้องเติม reducing agent และมีมวลโมเลกุลของ fragment ที่ได้จากการตัด pepsin ประมาณ 23, 19 และ 16 kDa การหาลำดับของกรดอะมิโน 5 ลำดับจากปลายด้าน NH_2 (N-terminal) พบว่าการตัดโปรตีนเกิดขึ้นที่ 3 ตำแหน่ง คือ ระหว่าง Leu 112-Tyr 113, Leu 166-Leu 167 และ Leu 178-Asn 179 และเมื่อรวมมวลโมเลกุลของแต่ละ

fragment ที่เกิดจากการตัด pepsin ที่แต่ละตำแหน่งพบว่ามียวโมเลกุลประมาณ 34.6 kDa ซึ่งตรงกับมวลโมเลกุลของ pepsin (ภาพประกอบ 54)



ภาพประกอบ 54 มวลโมเลกุลของ pepsin และมวลโมเลกุลของทั้ง 6 fragment

ข้อดีจากการศึกษาการตัด pepsin โดย molybdenum cluster นี้คือสามารถทำได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง (37°C , pH 7.0) และใช้ความเข้มข้น molybdenum cluster น้อยมากเพียง 0.125 mM ก็สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้แล้ว นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาได้ในระยะเวลาที่รวดเร็ว ซึ่งการทดลองนี้ใช้เวลา 2 ชั่วโมงก็เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยา จากการที่ใช้ความเข้มข้นน้อยและสามารถเกิดปฏิกิริยาในระยะอันสั้นภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง จึงทำให้นักวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการออกแบบยาที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผู้ป่วยต่อไปได้



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ธีรนุช วิชาญนันต์. (2547). *คู่มือชีวเคมีเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง
อภิัญญา ชัยวิสุทธิทางกูร. (2552). *เคมีเชิงฟิสิกส์และการประยุกต์ใช้ในงานวิจัย*. กรุงเทพฯ: แดเน็กซ์
อินเตอร์คอร์ปอเรชั่น.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York.
Garland Science.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; & Stryer, L. (2002). *W.H. Biochemistry*. 5th ed. New York.
Freeman and Company.
- Bio-Rad Laboratories. (2010). *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer: Instruction ManualCell*.
Retrieved May 5, 2010, from <http://mcdonald.ucdavis.edu/Manual/MiniTransblotCell.pdf>.
- Buranaprapuk, A.; et al. (1998). Protein cleavage by transition metal complexes bearing amino
acid substituents. *Bioche. Biophys. Acta*. 1387: 309-316.
- Buranaprapuk, A.; & Kumar, C. V. (2000). Protein Scissors: Role of Aromatic Residues on the
Binding Affinity and Photocleavage of Efficiency of Pyrenyl Peptides. *Tetrahedron*. 56:
7019-7025.
- Buranaprapuk, A.; et al. (2008). Chiral Protein Scissors Activated by Light: Recognition and
Protein Photocleavage by a New Pyrenyl Probe. *J. Phys. Chem. B*. 112: 9258-9265.
- Burnette, W. N. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium
dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic
detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 195-203.
- David, L. N.; & et al. (2008). *Principle of Biochemistry*. 5th ed. New York. Freeman and
Company.
- Ettner, N.; et al. (1995). Proximity mapping of the Tet repressor-tetracycline-Fe²⁺ complex by
hydrogen peroxide mediated protein cleavage. *Biochemistry*. 34(1): 22-31.
- Gallagher, S. R. (2008). *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*. Retrieved April
2, 2010, from <http://www.currentprotocols.com/protocol/et0703>.
- Good, N.E.; et al. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*. 5: 467-477
- Hegg, E. L.; et al. (1999). Structure-Reactivity Studies in Copper(II)-Catalyzed Phosphodiester
Hydrolysis. *Inorg. Chem*. 38(12): 2961-2968.
- Kahne, D.; & Skill, W. C. (1988). Hydrolysis of peptide bond in neutral water. *J. Am. Chem. Soc.*
110: 7529-7534.

- Kazunobu, T.; & Masashi, H. (2004). Molecular design, chemical synthesis, and biological evaluation of anthracene-carbohydrate hybrids as novel DNA photocleaving and photoselective cytotoxic agents. *Sci. Tech.* 28-35
- Kumar, C. V.; & Tolosa, L. M. (1993). Interaction of hydrophobic probes with Serum Albumin- Influence of the side chain and exciplex formation at the binding site. *J. Physical Chem.* 97: 13914-13919.
- Kumar, C. V.; & Buranaprapuk, A. (1997). Site-Specific Photocleavage of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36: 2085-2087.
- Kumar, C. V.; et al. (1998). Photochemical protease: Site-specific photocleavage of hen egg lysozyme and bovine serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 10361-10366.
- Kumar, C. V.; & Buranaprapuk, A. (1999). Tuning the Selectivity of Protein Photocleavage: Spectroscopic and Photochemical Studies. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 4262-4270.
- Kumar, C. V.; et al. (2000). Artificial Metallopeptidases: Regioselective Cleavage of Lysozyme. *Chem. Comm.* 597-598.
- Kumar, C. V.; et al. (2001). Large Chiral Discrimination of a Molecular Probe by Bovine Serum Albumin. *Chem. Comm.* 297-298.
- Kumar, C. V.; et al. (2002a). Chiral Protein Scissors: High Enantiomeric Selectivity for Binding and its Effect on Protein Photocleavage Efficiency and Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(9): 5810-5815.
- (2002b). Protein scissors: Photocleavage of proteins at specific locations. *Proc. Indian Acad. Sci (Chem. Sci.)* 114: 579-592.
- Kumar, C. V.; & Thota, J. (2005). Photocleavage of lysozyme by Cobalt(III) complexes. *Inorganic Chemistry.* 44: 825-827.
- Lodish, H.; Berk, A.; et al. (2000). *Molecular Cell Biology.* 4th ed. New York. Freeman and Company.
- Malaikaew, P.; & Buranaprapuk, A. (2011). Photocleavage of avidin by a new pyrenyl probe. *J. photochem. Photobiol. B: Biology.* 103: 251-255
- Masashi, H.; & Akane, S. (2006). Molecular design, chemical synthesis, and evaluation of novel anthracene derivatives as a new family of protein photocleavers. *Sci. Tech. Advanced Materials.* 7: 169-174
- Neil, C. (1999). *Structures and Properties of Biological Molecules.* 5th ed. New York. Benjamin Cummings Publishers.

- Nelson, D. L.; & Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. USA. Worth Publishers.
- Nelson, D. L.; & Cox, M. M. (2008). *Principle of Biochemistry*. 5th ed. New York. Freeman and Company.
- Rana, T. M.; & Meares, C. F. (1990). Specific cleavage of a protein by an attached iron chelate. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 2457-2458.
- Rana, T. M.; & Meares, C. F. (1991). Iron chelate mediated proteolysis: Protein Structure Dependence. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 1859-1861.
- Schepartz, A.; & Cuenoud, B. (1990). Site-specific cleavage of the protein calmodulin using a Trifluoperazine-based affinity reagent. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 3241-3249.
- Sereikaite, J.; et al. (2006). Protein Scission by Metal Ion-Ascorbate System. *J. Protein.* 25(6): 369-378.
- Shangger, H.; & V Jagow, V. G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166(2): 368-379.
- Sheehan, D. (2000). *Physical Biochemistry Principles and Applications*. 1st ed. West Sussex.

อภินามศัพท์

α	=	alpha
Ala	=	alanine
AMAC	=	9-anthryl-methylamine hydrochloride
APAC	=	3-(9-anthryl)propylamine hydrochloride
Arg	=	arginine
ASC	=	ascorbic acid
Asp	=	asparagine
β	=	beta
BSA	=	bovine serum albumin
CAPS	=	cyclohexylaminopropane sulfonic acid
CoHA	=	cobalt(III)hexammine trichloride
DCC	=	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DIC	=	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DMAP	=	4-dimethylaminopyridine
DTT	=	dithiothreitol
Fe(EDTA)	=	iron(II)ethylenediamine
Glu	=	glutamine
Gly	=	glycine
hGH	=	human growth hormone
His	=	histidine
HCl	=	hydrochloric acid

Ile	=	isoleucine
Leu	=	leucine
OH [·]	=	hydroxyl radical
PBAC	=	4(1-pyrenyl)butyramine chloride
Phe	=	phenylalanine
PTH	=	phenylthiohydantoin
pl	=	isoelectric point
PITC	=	phenylisothiocyanate
Pro	=	proline
PVDF	=	polyvinylidene fluoride
Py ^{+·}	=	pyrene cation radical
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
TFE	=	trifluoperazine
TEMED	=	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TFA	=	trifluoroacetic acid
Trp	=	tryptophan
Tyr	=	tyrosine
Val	=	valine



ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นางสาวสุตารัตน์ เย็นใจ
วันเดือนปีเกิด	24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลชลบุรี จังหวัดชลบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 33/49 หมู่ 4 ตำบลห้วยกะปิ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20130
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	มัธยมศึกษา สาขาคณิต-วิทย์ จากโรงเรียนวิสุทธิกษัตริ์ สมุทรปราการ
พ.ศ. 2551	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2555	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร