547.81
ว 647ก
ส.ธ

2

การแยก อาร์-ไฟโคอิริทริน และอาร์-ไฟโคไซยานิน จากสาหร่ายสกุล กราซิลาเรีย ในแหลมหิน จังหวัดตราด

ห้องสมุดบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปริญญานิพนธ์

ของ

นิยม ชลิตะนาวิน

21 พ.ค. 2535

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต
กุมภาพันธ์ 2531

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178012

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของมหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา		คณะกรรมการสอบ	
.....	ประธาน	.....	ประธาน
.....	กรรมการ	.....	กรรมการ
		.....	กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก ดร. ธารารัตน์ ศุภศิริ และผู้ช่วยศาสตราจารย์พรพิมล ม่วงไทย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ บุคคล ญาติ มิตร ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

นิยม ชลิตะนาวิน

สารบาญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	คำนำ	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	2
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	2
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	2
2	เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	4
3	วิธีดำเนินการ	9
	วิธีการเก็บตัวอย่าง	9
	การสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน	9
	การหาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน	12
	การแยกไฟโคอิริทรินออกจากสารเจือปน	12
	การแยกไฟโคไซยานินออกจากสารเจือปน	14
	การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน	14
	การศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟโคอิริทริน และไฟโคไซยานิน	14
	การศึกษาหน่วยย่อยของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน	14
4	ผลการศึกษาค้นคว้า	18
	การสกัดสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน	18
	การหาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค เจลฟิลเตรชัน	22

บทที่ หน้า

การแยกไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินออกจากสารเจือปนด้วยเทคนิค
ดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี 27
การแยกไฟโคอิริทรินออกจากสารเจือปน 27
การแยกไฟโคไซยานินออกจากสารเจือปน 31
การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน 35
การศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟโคอิริทริน
และไฟโคไซยานิน 38
การศึกษาความเป็นสารเอกพันธุ์และหน่วยย่อยของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน 41
การศึกษาความเป็นสารเอกพันธุ์ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน ด้วยวิธี
อิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล โพลีอะคริลาไมด์ pH 8.9 41
การศึกษาความเป็นสารเอกพันธุ์ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน ด้วยวิธี
อิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล โพลีอะคริลาไมด์ pH 7.0 43
การศึกษาหน่วยย่อยของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยวิธี
อิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ pH 8.9 45
การศึกษาหน่วยย่อยของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยวิธี
อิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ pH 7.0 48

5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 51
ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า 51
ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า 51
วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล 51
สรุปผลการศึกษาค้นคว้า 52
อภิปรายผล 53
ข้อเสนอแนะ 55

บทที่ หน้า

บรรณานุกรม 56

ภาคผนวก 58

การเตรียมสารเคมี 59

รูปร่างลักษณะของสาหร่ายสกุลกราซิลาเรีย 65

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงและการปล่อยแสง
ฟลูออเรสเซนซ์ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน 5

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 แสดงพันธะไทโออีเทอร์ที่เปปไทด์จับกับไฟโคบิลินของไฟโคอิริโทรบิลิน 4

2 แสดงโครงสร้างไฟโคยูโรบิลินและไฟโคไซยาโนบิลิน 6

3 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ อาร์--ไฟโคอิริทริน จากสาหร่ายสกุล แคลลิแทนนัม 7

4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของการสกัดสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน 19

5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคไซยานินที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต ความเข้มข้น 35 % ของสารละลายอิ่มตัว 20

6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคอิริทรินที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต ความเข้มข้น 50 % ของสารละลายอิ่มตัว 21

7 แสดงผลการแยกโปรตีนมาตรฐานด้วยคอลัมน์เซฟฟาคริล S-300 23

8 แสดงผลการแยกไฟโคอิริทรินด้วยคอลัมน์เซฟฟาคริล S-300 24

9 แสดงผลการแยกไฟโคไซยานินด้วยคอลัมน์เซฟฟาคริล S-300 25

10 แสดงผลการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน ด้วยคอลัมน์เซฟฟาคริล S-300 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโปรตีน มาตรฐาน 26

11 แสดงผลการแยกสารไฟโคอิริทรินออกจากสิ่งเจือปนด้วยดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี 28

12 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคอิริทรินที่แยกได้จากคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส 29

13 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจากผลรวมลำดับส่วนของสารไฟโคอิริทริน 30

14 แสดงผลการแยกสารไฟโคไซยานินออกจากสิ่งเจือปนด้วยดีอีเออี--เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี 32

ภาพประกอบ หน้า

15 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคไซยานินที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส 33
16 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจากผลรวมลำดับส่วนของสารไฟโคไซยานิน 34
17 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคอิริทรินในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 36
18 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคไซยานินในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 37
19 สเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารไฟโคอิริทริน 39
20 สเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารไฟโคไซยานิน 40
21 แสดงผลของอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 7 % pH 8.9 ของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน 42
22 แสดงผลของอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 7 % pH 7.0 ของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน 44
23 แสดงผลของอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 8.9 ของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน 46
24 แสดงผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของสารไฟโคอิริทรินเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 8.9 47
25 แสดงผลของอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 7.0 ของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน 49
26 แสดงผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 7.0 50

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

ประเทศไทยมีสาหร่ายสีแดง (red algae) สกุลกราซิลาเรีย (Gracilaria spp.) เป็นจำนวนมาก ซึ่งขึ้นอยู่ตามชายฝั่งทะเลไปจนถึงน้ำลึก ๆ ที่แสงแดดส่องถึง ชาวประมงตามจังหวัดชายฝั่งทะเลได้นำสาหร่ายสกุลนี้มาต้มจิ้มน้ำพริกรับประทานเป็นอาหาร และยังสามารถนำมาสกัดให้วุ้นคุณภาพที่ดีด้วย

สาหร่ายสีแดงสกุลกราซิลาเรียจัดอยู่ใน ดิวิชัน โรโดไฟตา (Division Rhodophyta) มีส่วนประกอบของสารสี (pigment) ที่สำคัญคือ ไฟโคบิลิน (phycobilin) ได้แก่ ไฟโคอิริโทรบิลิน (phycoerythrobilin) ไฟโคยูโรบิลิน (phycourobilin) และไฟโคไซยาโนบิลิน (phycocyanobilin) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับสารสีของน้ำดี (bile pigment) ของสัตว์ สารเหล่านี้พบเฉพาะในสาหร่ายสีแดงและสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (blue-green algae) (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์ 2527 : 25 - 26) ไฟโคบิลินเมื่อรวมกับโปรตีนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เรียกว่า ไฟโคบิลิโปรตีน (Phycobiliprotein)

ไฟโคบิลิโปรตีน ที่พบในสาหร่ายมี 3 ชนิดคือ ไฟโคอิริทริน (phycoerythrin) มีสีส้มแดง ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) มีสีน้ำเงิน และแอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) มีสีเหลือง ไฟโคอิริทรินนั้นประกอบด้วยไฟโคอิริโทรบิลินกับไฟโคยูโรบิลิน ไฟโคไซยานินประกอบด้วยไฟโคอิริโทรบิลินกับไฟโคไซยาโนบิลิน และแอลโลไฟโคไซยานิน ประกอบด้วย ไฟโคไซยาโนบิลิน (Goodwin. 1976 : 328 - 376) สารสีทั้งไฟโคไซยานินและไฟโคอิริทรินเป็นสารสีที่มีประโยชน์ คือ ไฟโคไซยานินสามารถนำมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไฟโคไซยานินและไฟโคอิริทรินยังมีสมบัติให้ค่าฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) สูง สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารต่าง ๆ เช่น วิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกัน (immunoassay) (Oi, Alexander and Stryler. 1982 : 981 - 986)

ดังนั้นการศึกษาสมบัติและวิธีการสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินจะเป็นความรู้พื้นฐานในการนำไปสู่กระบวนการผลิตสีจากธรรมชาติในเชิงอุตสาหกรรมในประเทศไทยในอนาคต

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อศึกษาสมบัติและวิธีการสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. ผลจากการศึกษาทำให้ทราบเทคนิควิธีการสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

2. ผลจากการศึกษาและวิเคราะห์จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาวิจัยทางด้านชีวเคมี รวมทั้งเป็นประโยชน์เพื่อการนำมาเป็นสีผสมอาหาร

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาครั้งนี้ใช้สาหร่ายสกุลกราซิลาเรียจากชายฝั่งทะเล ตำบลแหลมหิน จังหวัดตราด

2. ศึกษาวิธีการสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

3. ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค เจล ฟิลเตรชัน (gel filtration)

4. ศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน ที่ความยาวคลื่น 250 - 700 นาโนเมตร

5. ศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectrum) ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน ที่ความยาวช่วงคลื่น 500 - 700 นาโนเมตร

6. ศึกษาหน่วยย่อย (subunit) ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซีส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

อิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) คือวิธีการแยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้า ซึ่งอาศัยความแตกต่างของขนาด ประจุ ของสารตัวอย่าง โดยบรรจุสารที่ต้องการแยกลงบนแผ่นค้ำจุน (supporting medium) ซึ่งอาจจะเป็นกระดาษกรอง เซลลูโลส อะซีเตด (cellulose acetate)

หรือโพลีอะคริลาไมด์ แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าไปชั่วระยะเวลาหนึ่ง สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลหรือประจุสุทธิต่างกันจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าตรงข้ามกับประจุของสารตัวอย่างด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน ทำให้สามารถแยกสารออกจากกันได้

เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซีส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) คือวิธีการแยกสารโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันออกจากกันด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เป็นตัวค้ำจุน และใส่โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) ลงไป เพื่อให้จับกับโปรตีนและมีประจุสุทธิเป็นลบ เนื่องจากหมู่ของเอสดีเอส (โดยกรดอะมิโนบนสายโปรตีนประมาณ 3 เรซิดิว (residue) จะจับกับเอสดีเอส 1 โมเลกุล) เนื่องจากอัตราส่วนของจำนวนประจุลบสุทธิต่อน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมีค่าคงที่ จึงทำให้การแยกโดยวิธีนี้ไม่ขึ้นกับจำนวนประจุลบของโปรตีน เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์ โปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าบวกได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีขนาดใหญ่

โครมาโทกราฟี (chromatography) คือวิธีการแยกสารผสมออกจากกันโดยอาศัยหลักการที่สารถูกดูดซับบนวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) และถูกพาให้เคลื่อนที่ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ได้แตกต่างกัน จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสารต่าง ๆ ในสารผสมมีอัตราเร็วไม่เท่ากันจึงสามารถแยกสารออกจากกันได้

คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) คือวิธีโครมาโทกราฟีที่ใช้วัฏภาคนิ่งบรรจุในคอลัมน์ โดยสารผสมที่นำมาแยกจะถูกดูดซับด้วยวัฏภาคนิ่งและเคลื่อนที่ไปตามวัฏภาคเคลื่อนที่ในอัตราเร็วที่ไม่เท่ากันด้วยตัวชะ (eluant) จึงทำให้สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้

โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer) คือสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 10 mM pH 6.0

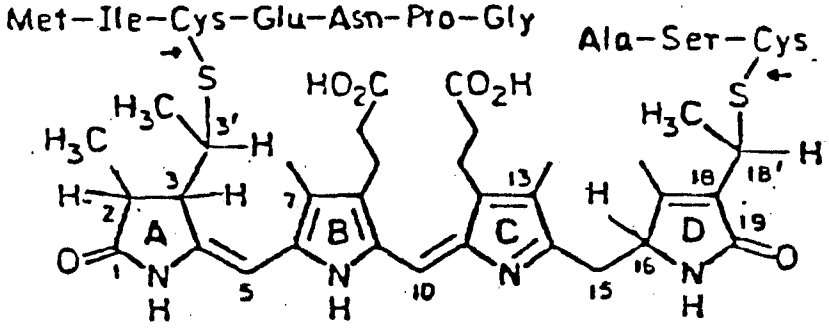
ไดอะไลซ์ (dialyze) คือวิธีการแยกสารมลทินหรือเกลือต่าง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ๆ ออกจากสารละลายไฟโคอิริทรินหรือไฟโคไซยานินโดยให้ซึมผ่านเยื่อบาง ๆ

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ไฟโคบิลิโปรตีน ในสาหร่ายต่างชนิดกันจะมีสมบัติแตกต่างกัน ดังนั้นจึงได้มีการใส่อักษรนำหน้าไฟโคบิลิโปรตีน เพื่อแสดงถึงชนิดของสาหร่าย ที่เป็นที่มาของสารสีนั้น ๆ เช่น ซี (C) อาร์ (R) และ บี (B) - ไฟโคอิริทริน หมายถึง ไฟโคอิริทรินที่พบในสาหร่าย ดิวิชั่น ไซยาโนไฟตา (Division Cyanophyta) ดิวิชั่นโรโดไฟตา และกลุ่มย่อยแบงกิโอไฟซีอี (Subclass Bangiophyceae) ตามลำดับ (Goodwin. 1976 : 328 - 376)

โครงสร้างของไฟโคบิลิโปรตีน ประกอบด้วย เปปไทด์ (peptide) ที่รวมกับไฟโคบิลิน (phycobilin) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเททระพีโรล (tetrapyrroles) ด้วยพันธะไทโออีเทอร์ (thio - ether) ดังรูป



ภาพประกอบ 1 แสดงพันธะไทโออีเทอร์ (ลูกศรชี้) ที่เปปไทด์จับกับไฟโคบิลินของไฟโคอิริโทรบิลิน (Nagy and Others. 1985 : 4864 - 4868)

ไฟโคอิริทริน และไฟโคไซยานินมีสมบัติในการดูดกลืนและปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ (absorption and fluorescence emission) แตกต่างกันดังตาราง 1

ตาราง 1 แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงและการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

ชนิดของไฟโคบิลิโปรตีน	ชนิดของสาหร่าย	*ความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสง (นาโนเมตร)			**ค่าความยาวคลื่นสูงสุดของการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ (นาโนเมตร)
		PUB	PEB	PCB	
ไฟโคอิริทริน					
C -	สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว		565		577
R -	สาหร่ายสีแดง	498	567,538		578
B -	สาหร่ายสีแดง	498	545,563		575
ไฟโคไซยานิน					
C -	สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว			620	648
R -	สาหร่ายสีแดง		555	617	636

PUB - ไฟโคยูโรบิลิน

PEB - ไฟโคอิริโทรบิลิน

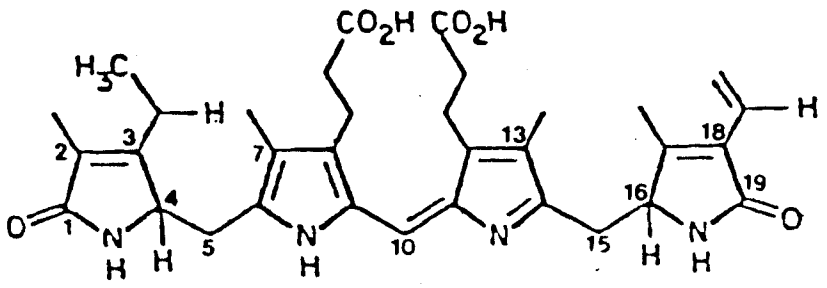
PCB - ไฟโคไซยาโนบิลิน

*(Glazer and Hixson. 1977 : 32 - 42)

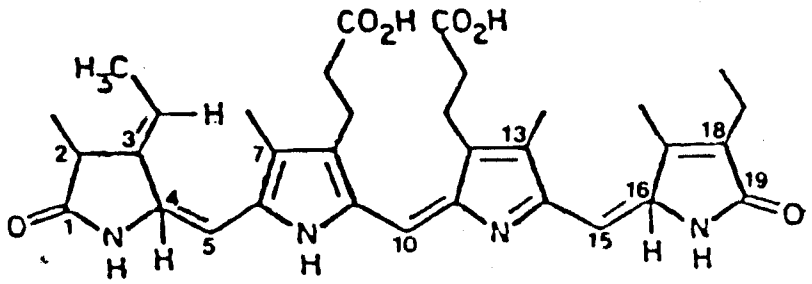
**(Glazer and Hixson. 1975 : 5487 - 5495)

จากตาราง 1 ค่าความยาวคลื่นสูงสุดของการดูดกลืนแสงและปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน จะมีค่าแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่ายและมีส่วนประกอบของไฟโคบิลินในสาหร่ายแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย

โครงสร้างของไฟโคยูโรบิลิน และไฟโคไซยาโนบิลิน แสดงไว้ดังภาพประกอบ 2



ไฟโคยูโรบิลิน (Nagy and Others. 1985 : 4864 - 4868)



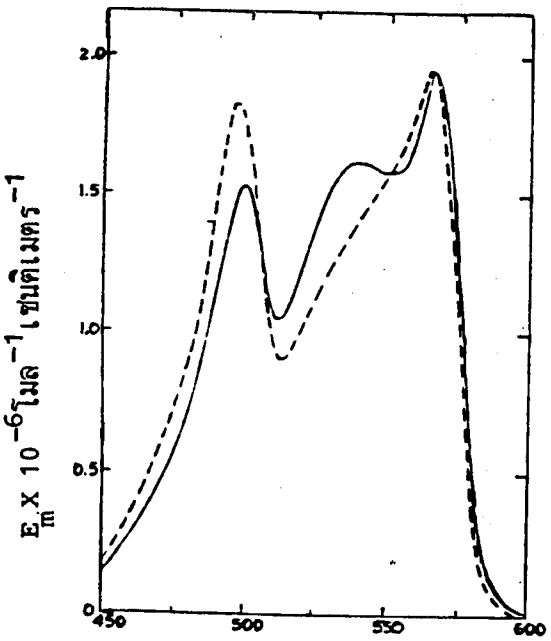
ไฟโคไซยาโนบิลิน (Teale and Dale. 1970 : 161 - 169)

ภาพประกอบ 2 แสดงโครงสร้างไฟโคยูโรบิลินและไฟโคไซยาโนบิลิน

จากภาพประกอบ 2 โครงสร้างของไฟโคยูโรบิลินและไฟโคไซยาโนบิลิน จะมีตำแหน่งของพันธะคู่ในโครงสร้างแตกต่างกัน คือตำแหน่งที่ 2 - 3, 4 - 5 และ 15 - 16 ตามลำดับ จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกันดังกล่าว

ในปี ค.ศ. 1981 ยู (Yu) และคนอื่น ๆ (Yu and Others. 1981 : 482 - 488) ได้ศึกษาการแยก อาร์-ไฟโคอิริทรินจากสาหร่ายสีแดงสกุลแคลลิแทมนัม (Callithamnion spp.) พบว่า สามารถแยก อาร์-ไฟโคอิริทรินได้ 2 ชนิด มีลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงคล้ายคลึงกันคือ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 565,539 และ 497 นาโนเมตร และยังพบว่าสาหร่ายในสกุล

(genus) เดียวกัน แต่ต่างชนิดกัน (species) จะมีลักษณะสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงแตกต่างกันดังภาพประกอบ 3



C. byssoides ———

C. roseum ------

ภาพประกอบ 3 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอาร์-ไฟโคอิริทริน จากสาหร่ายแคลลิแทมนัม (Yu and Others. 1981 : 482 - 488)

จากภาพประกอบ 3 C. byssoides มีความเข้มข้น 0.091 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ C. roseum มีความเข้มข้น 0.061 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกันที่ความยาวช่วงคลื่น 497 และ 539 นาโนเมตร ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 1973 แมคคอลล์ (MacColl) และคนอื่น ๆ (MacColl and Others. 1973 : 7080 - 7086) ได้ศึกษาหน่วยย่อยของซี-ไฟโคไซยานินจากสาหร่าย Chroomonas spp. สามารถแยกได้โดยอาศัยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่า ได้แถบ (band)

2 แถบ คือ สีเขียว (green band) ซึ่งเป็น โซ่-อัลฟา (α-chain) มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (light chain) และสีน้ำเงินที่เป็น โซ่-บีตา (β-chain) มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า (heavy chain)

ในปี ค.ศ. 1986 มิซูโน (Mizuno) และคนอื่น ๆ (Mizuno and Others. 1986 : 1161 - 1165) ได้ศึกษาหน่วยย่อยของ อาร์-ไฟโคอิริทริน จากสาหร่าย Porphyra spp. พบว่า มี 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2.3×10^4 และ 3.8×10^4 ดาลตัน (dalton) ซึ่งมีลักษณะเป็น โซ่-อัลฟา และ โซ่-บีตา เช่นเดียวกับ ซี-ไฟโคไซยานิน

ปริมาณของไฟโคไซยานินกับไฟโคอิริทรินในสาหร่ายจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มของแสง ในระดับน้ำลึกความเข้มของแสงต่ำจะให้ปริมาณของไฟโคอิริทรินมากกว่าไฟโคไซยานิน ซึ่งสามารถจะแยกไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินออกจากเซลล์ของสาหร่ายโดยวิธีทำให้เซลล์แตก แล้วนำไปสกัดด้วยน้ำหรือสารละลายของโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และนำไปแยกออกจากสารอื่น ๆ ที่ปนอยู่ ด้วยการทำให้ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Fritsch. 1965 : 397 - 422) ไฟโคบิลิโปรตีนที่แยกได้จะมีจุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point) ในช่วง 4.3 - 4.9 มีน้ำหนักโมเลกุล 250,000 - 300,000 ดาลตัน (Goodwin. 1976 : 329 - 376)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

1. วิธีการเก็บตัวอย่าง

แหล่งที่เก็บตัวอย่างสาหร่ายสกุลกราซิลาเรีย คือ ตำบลแหลมหิน จังหวัดตราด เก็บในเดือนมีนาคม สุ่มเก็บบริเวณชายฝั่งทะเลที่ระดับน้ำลึก 1 เมตร จำนวน 10 กิโลกรัม แล้วนำมาล้างแยกสิ่งเจือปนออกและเก็บแช่แข็งไว้ในตู้เย็น

2. การสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

วิธีการสกัดได้ประยุกต์จากวิธีของคลอทซ์ และเกลเซอร์ (Klotz and Glazer. 1985 : 4856 - 4863) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.1 สุ่มตัวอย่างสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียที่เก็บไว้ในข้อ 1 นำไปชั่งให้ได้น้ำหนัก 500 กรัม

2.2 ปั่นสาหร่ายให้ละเอียดและเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 350 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่แข็งในตู้เย็น จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.3 กรองเอากากสาหร่ายออกไปด้วยผ้ากรอง นำสารละลายที่ได้ไปปั่นที่ความเร็ว 7,800 g (high speed refrigerated centrifuge, beckman model JA - 20) เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทิ้งไป และสารละลายที่ได้นำไปกรองผ่าน ซีไลท์ บุชเนอร์ (celite buchner)

2.4 เติมแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) ลงในสารละลายให้มีความเข้มข้น 20 % ของสารละลายอิ่มตัว คนให้ละลายเข้ากันหมด และเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.5 นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แยกเอาส่วนที่ตกตะกอนทิ้งไป

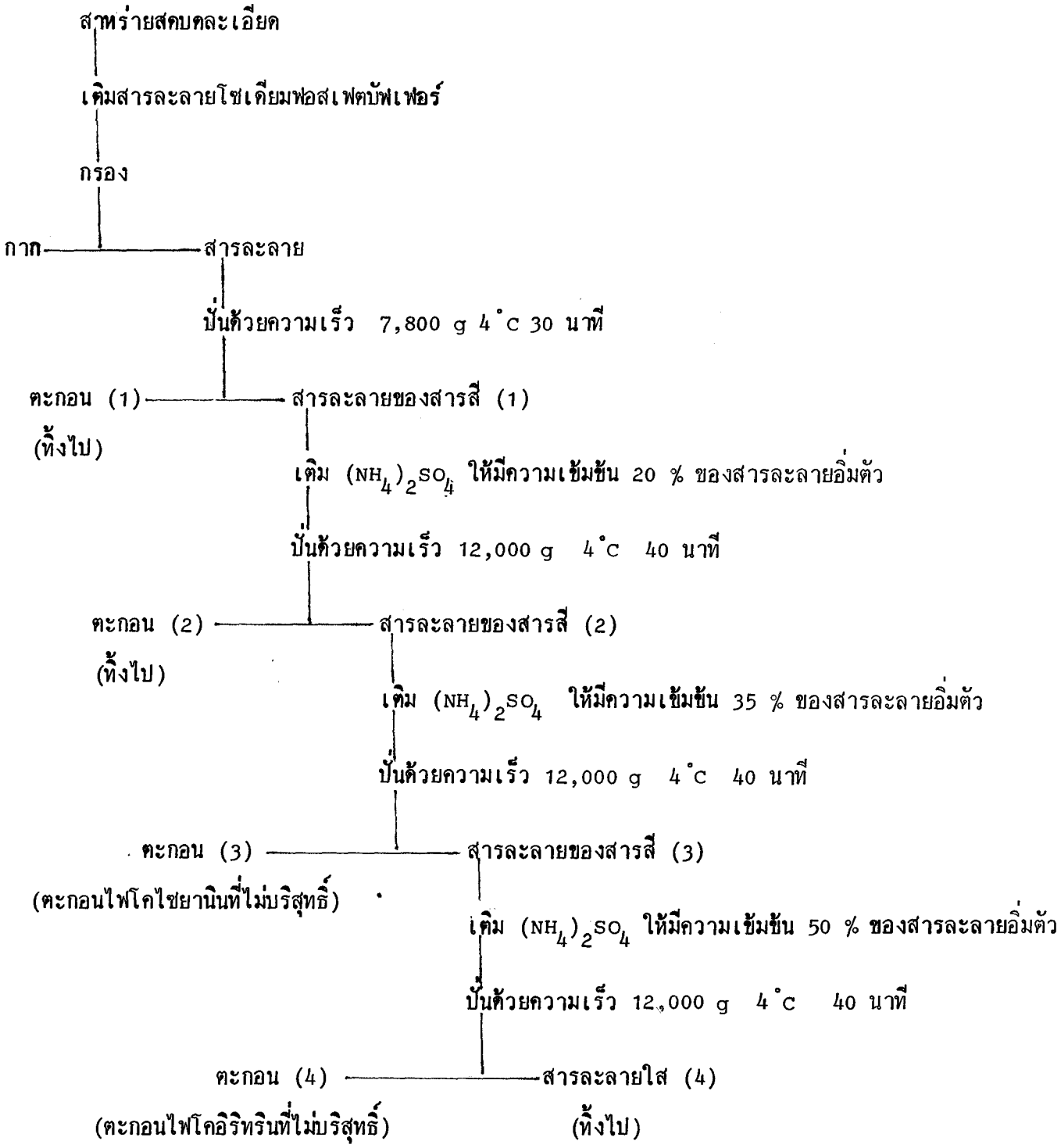
2.6 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในสารละลายที่ปั่นได้ ให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 35 % ของสารละลายอิ่มตัว คนให้เข้ากันหมด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.7 นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แยกเอาส่วนที่ตกตะกอนเก็บไว้ในสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 35 % ของสารละลายอิ่มตัวในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2.8 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลายที่ปั่นได้ให้มีความเข้มข้นเพิ่มเป็น 50 % ของสารละลายอิ่มตัว ของปริมาตรของสารละลาย คนให้ละลายเข้ากันหมดและเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.9 นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แยกเอาส่วนที่ตกตะกอนเก็บไว้ในสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 50 % ของสารละลายอิ่มตัวในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

การสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน



3. การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค เจล ฟิลเตรชัน (gel filtration)

3.1 นำเซฟฟาคริล S-300 (sephacryl, S-300) บรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1 × 70 เซนติเมตร และชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.2 เติมสารละลายผสมของบลูเด็กแตรน (blue dextran) และโปแตสเซียมเฟอรีไซยาไนด์ (potassium ferricyanide) เข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรบนผิวเจลในคอลัมน์ และชะคอลัมน์ด้วยสาระลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.3 เก็บสารละลายที่ชะจากคอลัมน์เป็นส่วน ๆ ส่วนละ 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องเก็บอัตโนมัติ นำสารละลายที่ได้แยกได้จากคอลัมน์ไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 และ 340 นาโนเมตร ตามลำดับ เพื่อหาปริมาตรวอยด์ (void volume, V_o) และปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ (total volume, V_t)

3.4 หาตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน โอวัลอัลบูมิน (ovalbumin) อัลบูมิน (albumin) และไซโตโครม ซี (cytochrome c) โดยใช้ความเข้มข้นอย่างละ 20 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงบนผิวเจลในคอลัมน์และทำการทดลองซ้ำโดยวิธีเดียวกับข้อ 3.2 และ 3.3 แต่นำสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์ไปตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

3.5 นำตะกอนของไฟโคอิริทรินจากข้อ 2.9 และไฟโคไซยานินจากข้อ 2.7 จำนวน 13 มิลลิกรัม ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และนำสารละลายที่ได้จำนวน 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมลงบนผิวเจลในคอลัมน์และทำการทดลองซ้ำ โดยวิธีเดียวกับข้อ 3.2 และ 3.3 นำสารละลายไฟโคอิริทรินจากคอลัมน์ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 และ 280 นาโนเมตร ส่วนสารละลายของไฟโคไซยานินจากคอลัมน์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 615 และ 280 นาโนเมตร

4. การแยกไฟโคอิริทรินออกจากสารเจือปน

วิธีการแยกไฟโคอิริทรินออกจากสารเจือปนประยุกต์จากวิธีของคลอทซ์ และเกลเซอร์ (Klotz and Glazer. 1985 : 4856 - 4863) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1 แยกไฟโคอิริทรินออกจากสารเจือปนโดยการนำตะกอนที่เก็บไว้ในข้อ 2.9 (ตะกอน 4) จำนวน 70 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์ (homogenizer) และนำไปแยกออกจากสารเจือปนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้สาร ดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) เป็นตัวค้ำจุนดังนี้

4.1.1 นำดีอีเออี-เซลลูโลส ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 50 % ของสารละลายอิ่มตัวในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1 × 50 เซนติเมตร จำนวน 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.1.2 ผสมสารดีอีเออี-เซลลูโลส จำนวน 10 กรัม กับสารตัวอย่างในข้อ 4.1 จำนวน 50 มิลลิกรัม คนให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปบรรจุในส่วนบนของคอลัมน์ที่เตรียมไว้

4.1.3 ชะ (elute) คอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 50 % ของสารละลายอิ่มตัวในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาณรวม 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อแยกเอาสารที่ไม่เกาะกับดีอีเออี-เซลลูโลส ออกไป

4.1.4 ชะคอลัมน์ด้วยสาระลายแอมโมเนียมซัลเฟตในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นลดลงเชิงเส้น (linear gradient) จาก 50 % - 0 % ของสารละลายอิ่มตัว ปริมาตรรวม 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร

4.1.5 เก็บสารละลายที่ชะจากคอลัมน์ในข้อ 4.1.4 เป็นส่วน ๆ ส่วนละ 5.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยเครื่องเก็บอัตโนมัติ (LKB fraction collector, model 2112)

4.2 นำสารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี ไปตรวจวิเคราะห์สารไฟโคอิริทรินที่แยกได้ โดยบันทึกค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 250 - 700 นาโนเมตร

4.3 ตกตะกอนสารไฟโคอิริทรินที่แยกได้จากคอลัมน์โดยเติมสารแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความเข้มข้น 40 % ของสารละลายอิ่มตัว เพื่อแยกสารไฟโคอิริทรินออกจากสารละลายของโปรตีนที่เจือปนอยู่ และเก็บตะกอนของไฟโคอิริทรินไว้ในสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50 % ของสารละลายอิ่มตัวในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การแยกไฟโคไซยานินออกจากสารเจือปน

นำตะกอนในข้อ 2.7 (ตะกอน 3) มาแยกไฟโคไซยานินออกจากสารผสมโดยวิธีเดียวกับสารไฟโคอิริทริน แต่ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นลดลงเชิงเส้น 35 % - 0 % ของสารละลายอิ่มตัวที่มีปริมาตรทั้งหมด 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตกตะกอนสารไฟโคไซยานินโดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30 % ของสารละลายอิ่มตัวเพื่อแยกสารไฟโคไซยานินออกจากสารละลายของโปรตีนที่เจือปนอยู่ และเก็บตะกอนของไฟโคไซยานินไว้ในสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 35 % ของสารละลายอิ่มตัวในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

6.1 นำตะกอนของไฟโคอิริทรินหรือไฟโคไซยานินซึ่งได้จากข้อ 4.3 และ 5 ตามลำดับ ประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 2.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปไดอะไลซ์ (dialyze) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.2 นำสารละลายไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินไปบันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 250 - 700 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Shimadzu, model U.V. 240

7. การศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์

7.1 นำตะกอนของไฟโคอิริทรินหรือไฟโคไซยานินซึ่งได้จากข้อ 4.3 และ 5 ตามลำดับ ประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 5.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปไดอะไลซ์ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.2 นำสารละลายไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินไปบันทึกการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น 500 - 700 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Shimadzu, model R.F. 250

8. การศึกษาความเป็นสารเอกพันธุ์ (homogeneity test) และการศึกษาหน่วยย่อย (subunit) ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

8.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารไฟโคอิริทรินหรือไฟโคไซยานินจากข้อ 4.3 และ 5 ตามลำดับ ละลายในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 0.02 มิลลิลิตร ผสมกับแซมเปิลบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก) 0.005 มิลลิลิตร

8.2 การตรวจสอบความเป็นสารเอกพันธุ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 % pH 8.9

8.2.1 เตรียมบลอคก์ (block) กระจกขนาด 11 × 10 × 0.1 เซนติเมตร

8.2.2 เตรียมแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 % pH 8.9 (ภาคผนวก) จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เรียกว่า รันนิ่งเจล (running gel) ใส่ในบลอคก์ให้มีความสูงประมาณ 7 เซนติเมตร และเติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ อย่าให้กระเทือนผิวหน้า ให้มีความสูงประมาณ 2 - 3 มิลลิลิตร เพื่อปรับผิวหน้าให้เรียบเมื่อเจลแข็งตัวและกันไม่ให้ผิวหน้าเจลแห้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง หรือเก็บค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2.3 แทนที่น้ำกลั่นที่อยู่เหนือรันนิ่งเจลด้วยโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 4 % pH 6.8 ซึ่งเรียกว่า สแตกกิงเจล (stacking gel) หรือสเปเซอเจล (spacer gel) พร้อมกับใส่หวี (comb) ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกเป็นซี่ฟัน 8 ซี่ แต่ละซี่กว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 2.0 เซนติเมตร เพื่อทำให้สแตกกิงเจลเป็นร่องลึกลงไปสำหรับหยอดสารตัวอย่าง เจลนี้จะแข็งตัวภายใน 20 นาที ควรทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงก่อนใช้

8.2.4 ดึงหวีออกจากแผ่นเจล แล้วนำแผ่นเจลนี้ไปประกอบติดกับกล่องอิเล็กโตรโฟรีติก (electrophoretic chamber) ซึ่งใช้สำหรับใส่บัฟเฟอร์ และเติมทริส-ไกลซีน (tris-glycine) บัฟเฟอร์ pH 8.3 ลงในกล่องให้ท่วมเนื้อเจล

8.2.5 หยอดสารตัวอย่างจากข้อ 8.1 ลงในหลุมของสเปเซอเจล แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้ากระแสตรง 20 มิลลิแอมป์ ให้ขั้วลบอยู่ด้านบนและขั้วบวกอยู่ด้านล่าง และหยุดเดินกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโปรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ถึงขอบเจลด้านล่าง

8.2.6 แยกเอาแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ออกจากแผ่นกระจกและนำแผ่นเจลนี้ไปย้อมแถบโปรตีนด้วยสารละลาย โคมาสซี บริลเลียนท์ บลู (coomassie brilliant blue) แล้วนำไปล้างสีส่วนที่ไม่ติดแถบโปรตีนออกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 5 % เมทานอล 7 % กรดอะซิติก

8.3 การตรวจสอบความเป็นสารเอกพันธุ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 % pH 7.0

8.3.1 เตรียมบลอคก์ (block) กระจกขนาด 11 × 10 × 0.1 เซนติเมตร

8.3.2 เตรียมแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 % pH 7.0 (ภาคผนวก) จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในบลอคก์ให้มีความสูง 9 เซนติเมตร และพร้อมกับใส่หวีซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกเป็นซี่ฟัน 8 ซี่ แต่ละซี่กว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 0.2 เซนติเมตร เพื่อทำให้เนื้อเจลเป็นร่องลึกลงไปสำหรับหยอดสารตัวอย่าง เจลนี้จะแข็งตัวภายใน 30 นาที ควรทิ้งไว้ประมาณ 3 ชั่วโมง หรือเก็บค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.3.3 ดึงหวีออกจากแผ่นเจล แล้วนำแผ่นเจลนี้ไปประกอบติดกับกล่องอิเล็กโตรโฟรีติก (electrophoretic chamber) ซึ่งใช้สำหรับใส่บัฟเฟอร์และเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ลงในกล่องให้ท่วมเนื้อเจล

8.3.4 หยอดสารตัวอย่างจากข้อ 8.1 ลงในหลุมของสเปเซอเจล แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้ากระแสตรง 30 มิลลิแอมป์ ให้ขั้วลบอยู่ด้านบนและขั้วบวกอยู่ด้านล่าง และหยุดเดินกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโปรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่ถึงขอบเจลด้านล่าง

8.3.5 แยกเอาแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ออกจากแผ่นกระจก และนำแผ่นเจลนี้ไปย้อมแถบโปรตีนด้วยสารละลายโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู แล้วนำไปล้างสีส่วนที่ไม่ติดแถบโปรตีนออกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย 5 % เมทานอล 7 % กรดอะซิติก

8.4 การศึกษาหน่วยย่อยด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 % pH 8.9

8.4.1 เตรียมบลอคก์กระจกขนาด 11 × 10 × 0.1 เซนติเมตร

8.4.2 เตรียมแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 % pH 8.9 (ภาคผนวก) จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งเรียกว่า รันนิ่งเจล และเตรียมแผ่นเจลเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 4 % pH 6.8 ซึ่งเป็นสแตกกิงเจล โดยทำการทดลองด้วยวิธีเดียวกับข้อ 8.2.2 - 8.2.6

8.5 การศึกษาหน่วยย่อยด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 7.0 โดยใช้วิธีของ วีเบอร์ และออสบอร์น (Weber and Osborn. 1969 : 4406 - 4412)

8.5.1 เตรียมบลอคก์กระจกขนาด 11 × 10 × 0.1 เซนติเมตร

8.5.2 เตรียมแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 % pH 7.0 (ภาคผนวก) จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยทำการทดลองด้วยวิธีเดียวกับข้อ 8.3.2 - 8.3.5

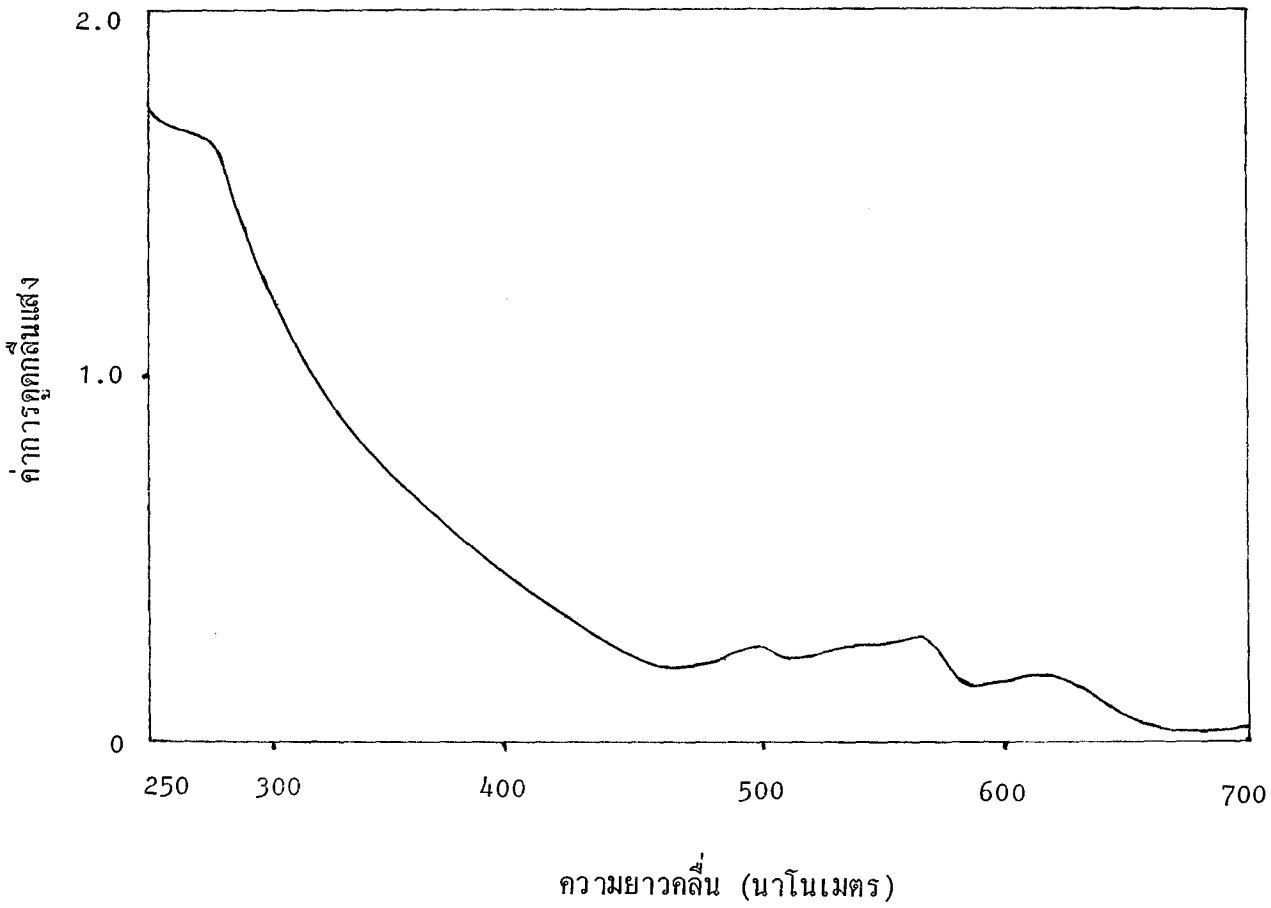
บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

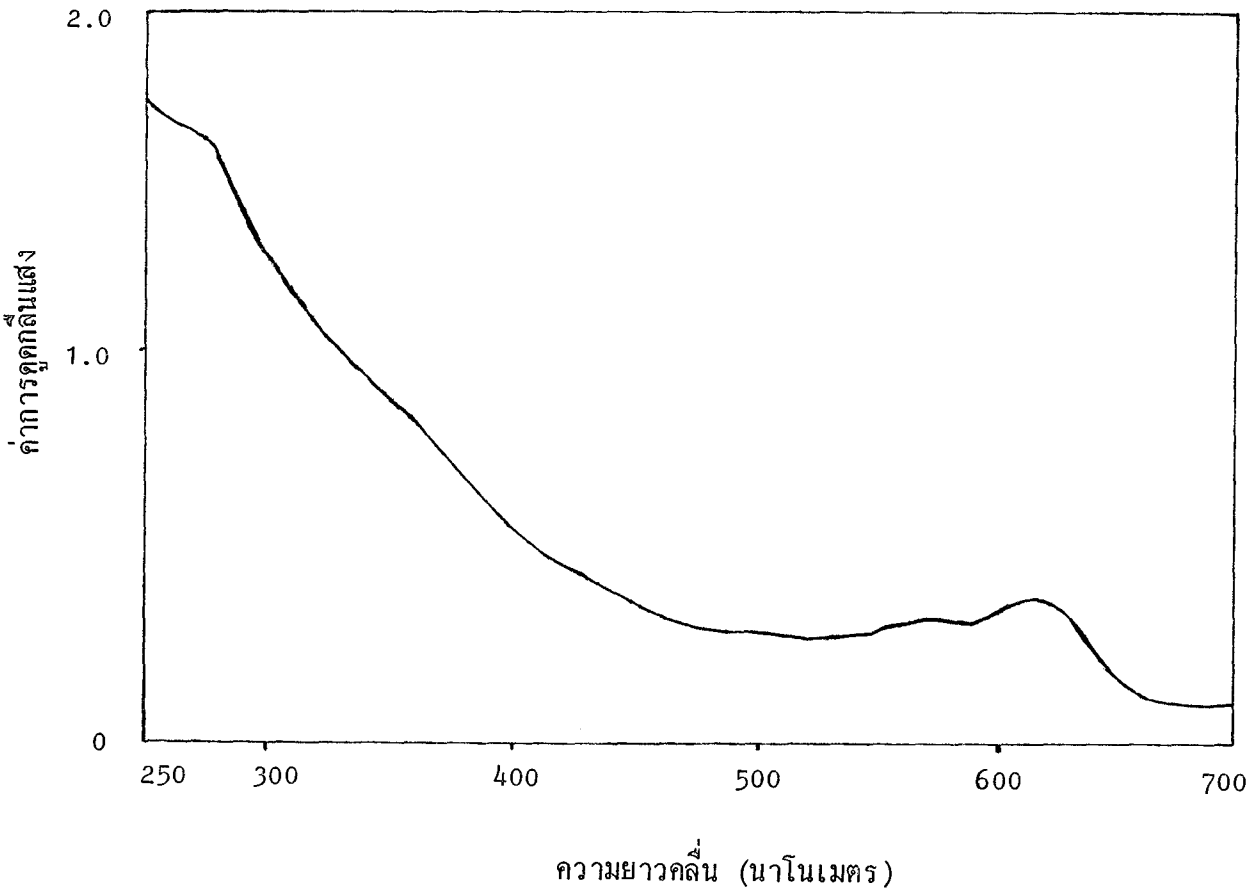
1. การสกัดสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

เมื่อนำสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียมาสกัดสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 สามารถแยกสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินออกมาพร้อมกัน (ภาพประกอบ 4) มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 495, 535, 565 และ 615 นาโนเมตร ตามลำดับ

สารไฟโคไซยานินและไฟโคอิริทรินสามารถแยกออกจากสารละลายโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 35 % และ 50 % ของสารละลายอิ่มตัว ตามลำดับ (ภาพประกอบ 5 และ 6) ซึ่งสารไฟโคไซยานินและไฟโคอิริทรินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 615 และ 565 นาโนเมตร ตามลำดับ

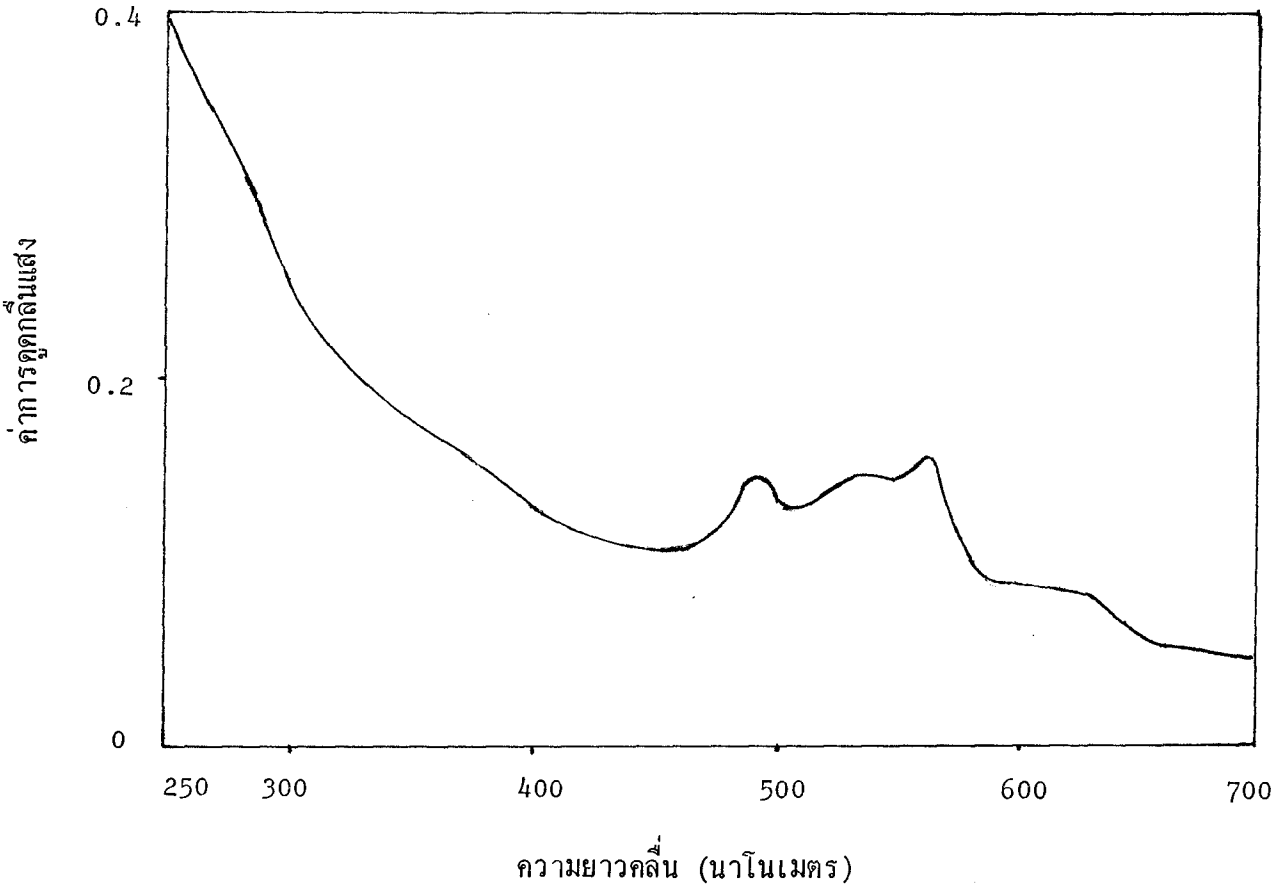


ภาพประกอบ 4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของการสกัดสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0



ภาพประกอบ 5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคไซยานินที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 35 % ของสารละลายอิ่มตัว

ห้องสมุดบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



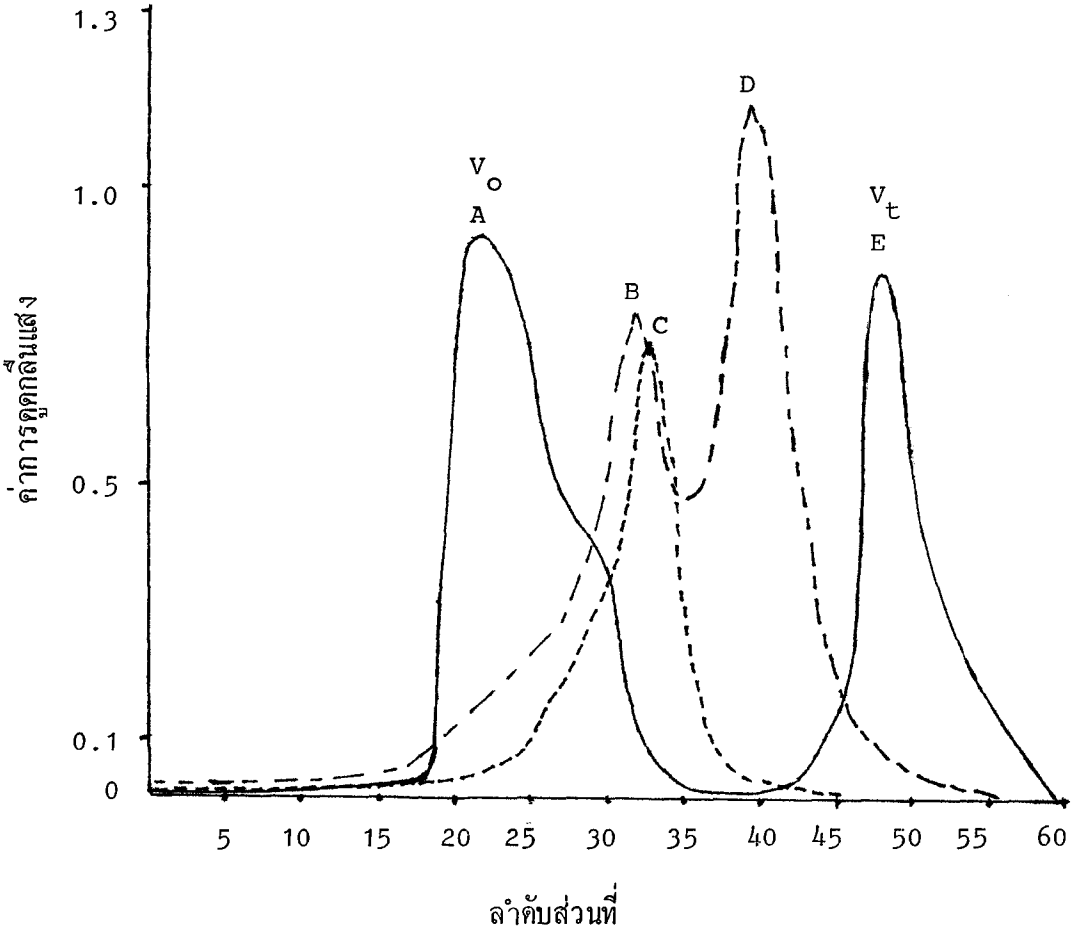
ภาพประกอบ 6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคอิริทริน ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 50 % ของสารละลายอิ่มตัว

178012

2. ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน ด้วยเซฟฟาครีล S-300

2.1 จากผลการทดลองแยกสาร บลูเด็กแตรน อัลบูมิน โอวัลอัลบูมิน ไซโตโครม ซี ไปตัสเซียมเฟอรีไซยาไนด์ สามารถแยกได้ในส่วนที่ 22, 32, 33, 40 และ 48 ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 7

2.2 ผลการทดลองแยกสาร ไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน สามารถแยกได้ในส่วนที่ 27 และ 29 ดังภาพประกอบ 8 และ 9 ตามลำดับ

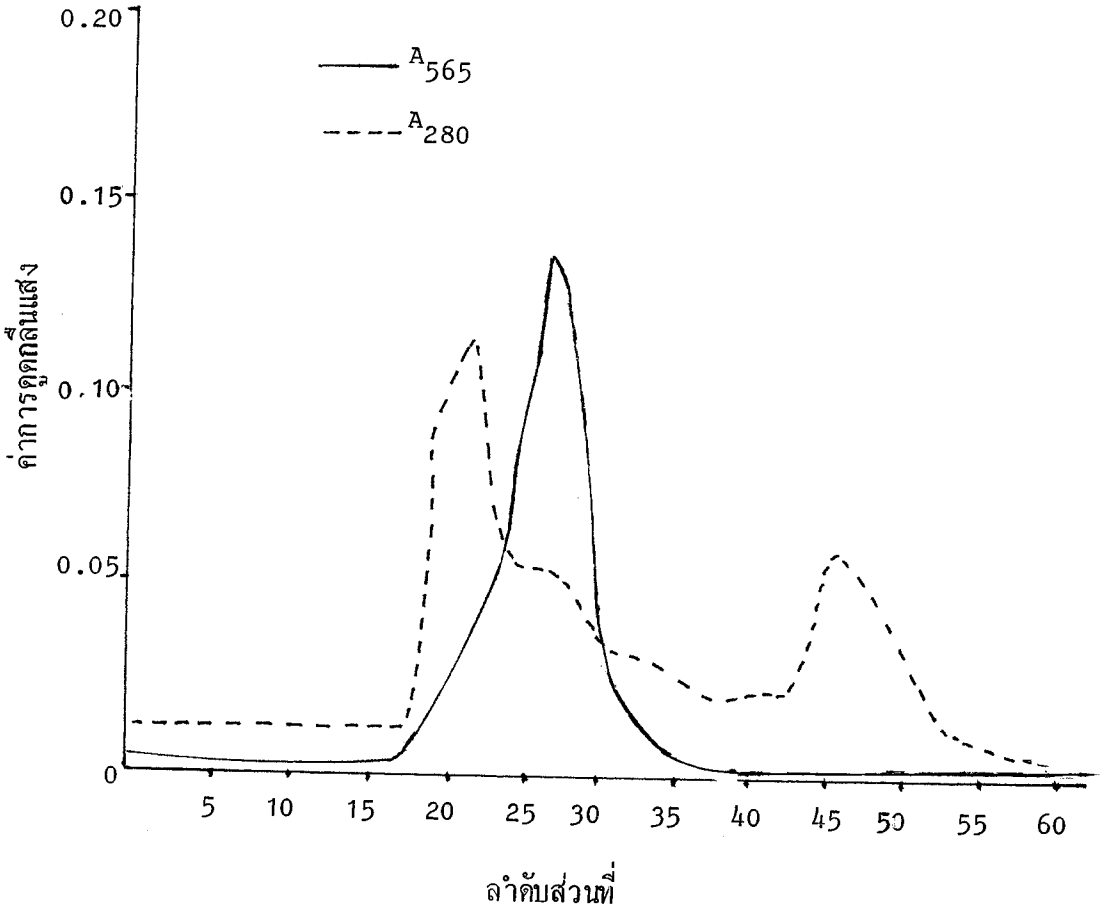


ภาพประกอบ 7 แสดงผลการแยกโปรตีนมาตรฐานด้วยคอลัมน์เซฟฟาคริล S-300

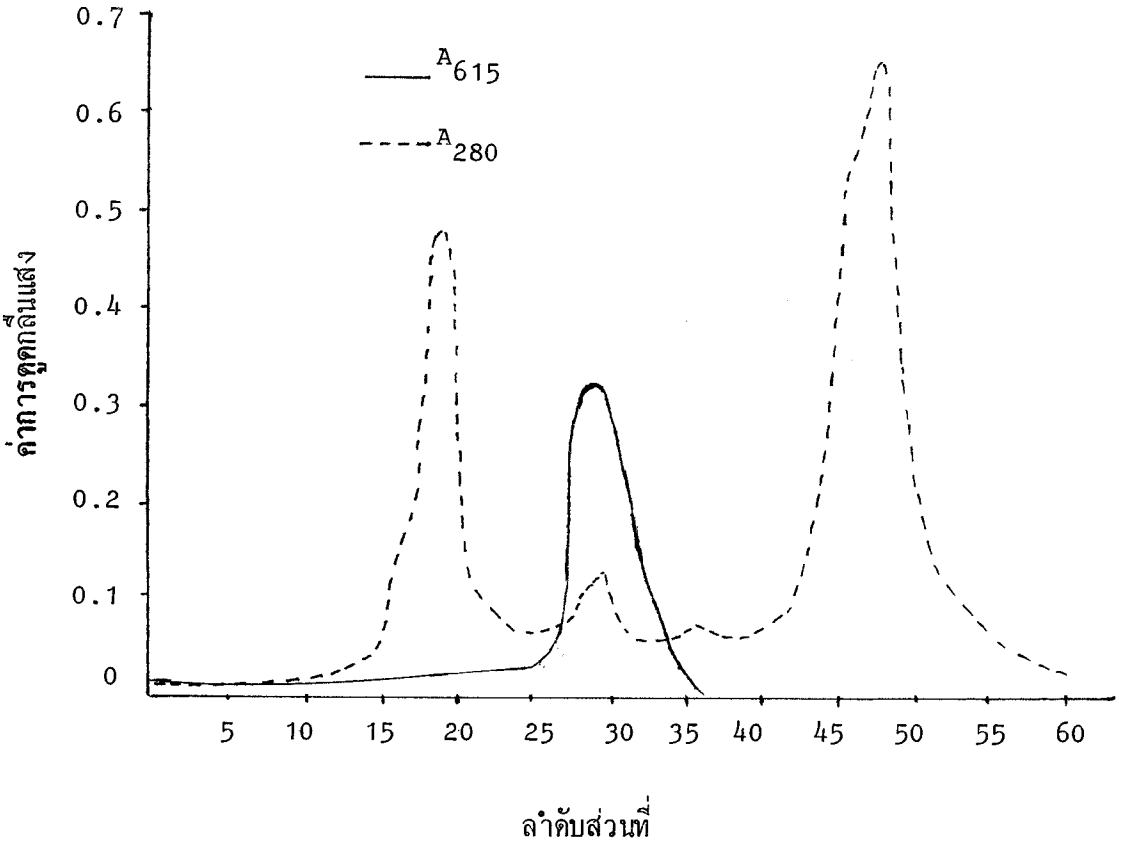
—— การทดลองครั้งที่ 1 บลูเด็กแตรน (A), โปตัสเซียมเฟอรีไซยาไนด์ (E)

----- การทดลองครั้งที่ 2 โอวัลอัลบลูมิน (C)

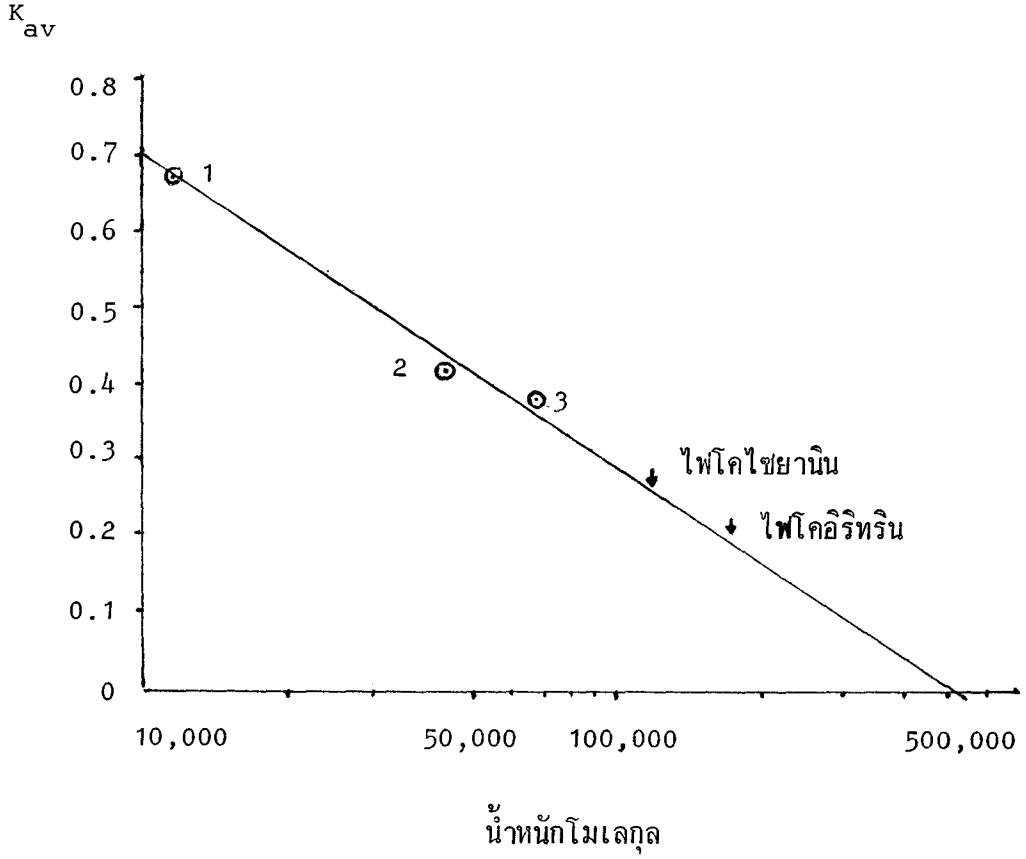
—-— การทดลองครั้งที่ 3 อัลบลูมิน (B), ไซโตโครม ซี (D)



ภาพประกอบ 8 แสดงผลการแยกไฟโคอิริทรินด้วยคอลัมน์เซฟฟาครีล S-300



ภาพประกอบ 9 แสดงผลการแยกไฟโคไซยานินด้วยคอลัมน์เซฟฟาคริล S-300



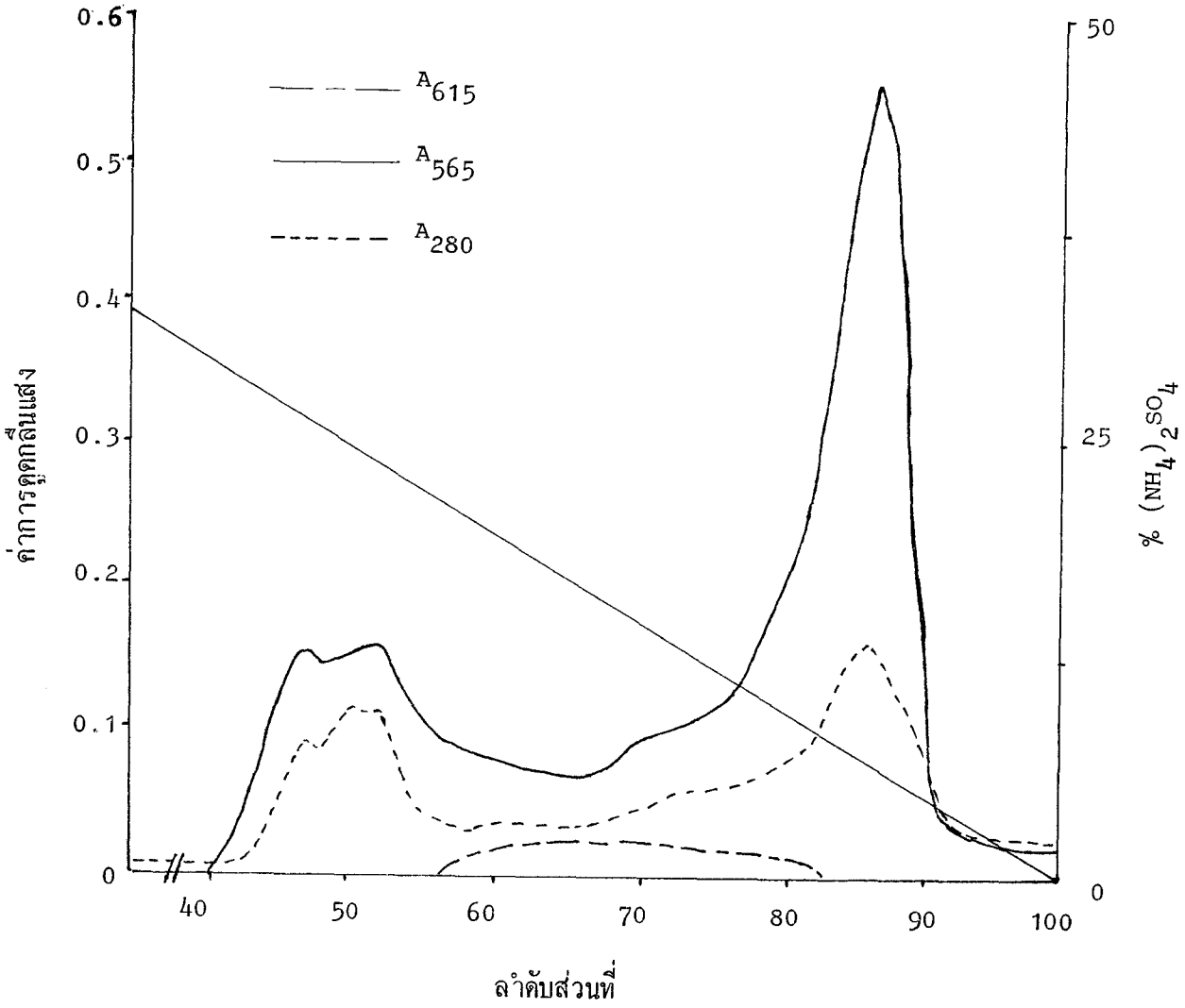
ภาพประกอบ 10 แสดงผลการประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเซฟฟาคริล S-300 โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

1. ไซโตโครม ซี (17,000) 2. โอวัลอัลบูลมิน (43,000)
3. อัลบลูมิน (67,000)

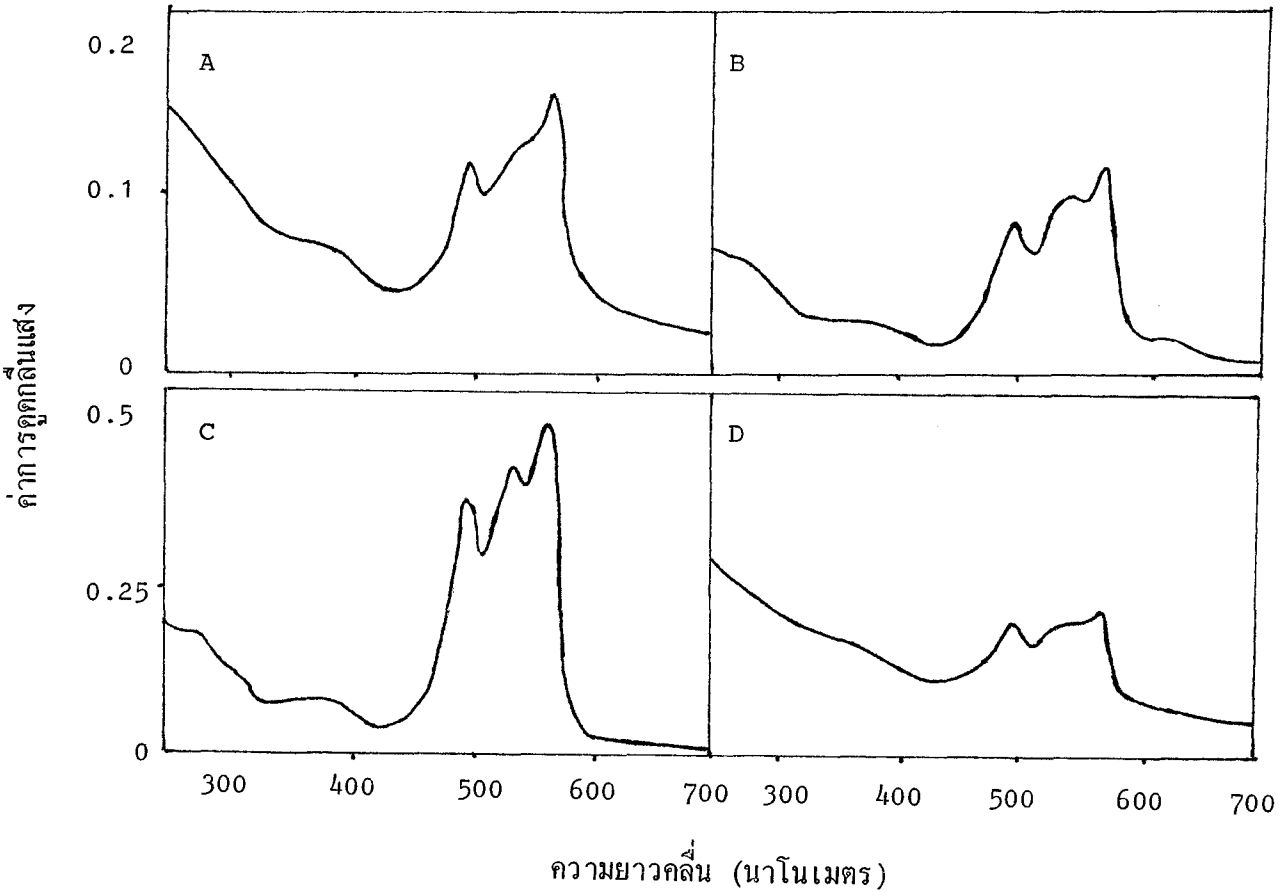
3. การแยกไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินออกจากสารเจือปน

จากการนำตะกอนของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินที่แยกได้จากสารละลายด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต มาแยกออกจากสารเจือปนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ดีอีเออี-เซลลูโลส เป็นตัวค้ำจุนได้ผลดังนี้

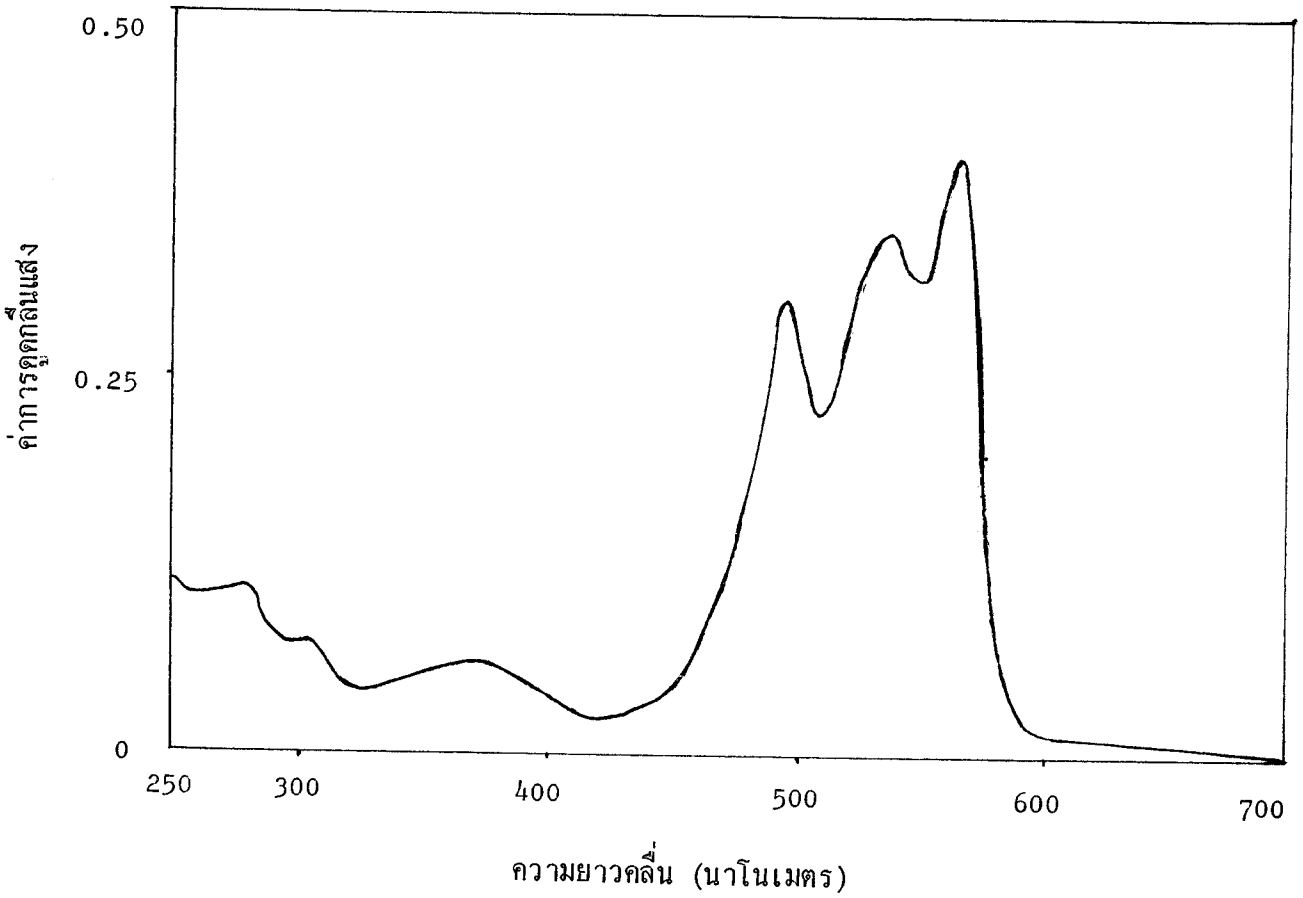
3.1 สามารถแยกสารไฟโคอิริทรินออกจากสารเจือปนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นลดลงเชิงเส้นจาก 50 % - 0 % ของสารละลายอิ่มตัวในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาพประกอบ 11) โดยลำดับ ส่วน (fraction number) ที่ 50 - 89 จะมีอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตร เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ แต่ในลำดับส่วนที่ 75 จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 615 นาโนเมตรด้วย ซึ่งเป็นเครื่องชี้ว่ามีสารไฟโคไซยานินปนออกมาด้วย สำหรับลำดับส่วนที่ 95 จะพบว่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตร มีค่าลดลง และจากการรวมลำดับส่วนที่ 83 - 89 เข้าด้วยกัน จะได้สารละลายที่มีสีชมพูและมีสเปกตรัมการดูดกลืนแสงดังภาพประกอบที่ 13 โดยมีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 565 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 3.85



ภาพประกอบ 11 แสดงผลการแยกสารไฟโคอิริทรินออกจากสารเจือปนด้วย ดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี

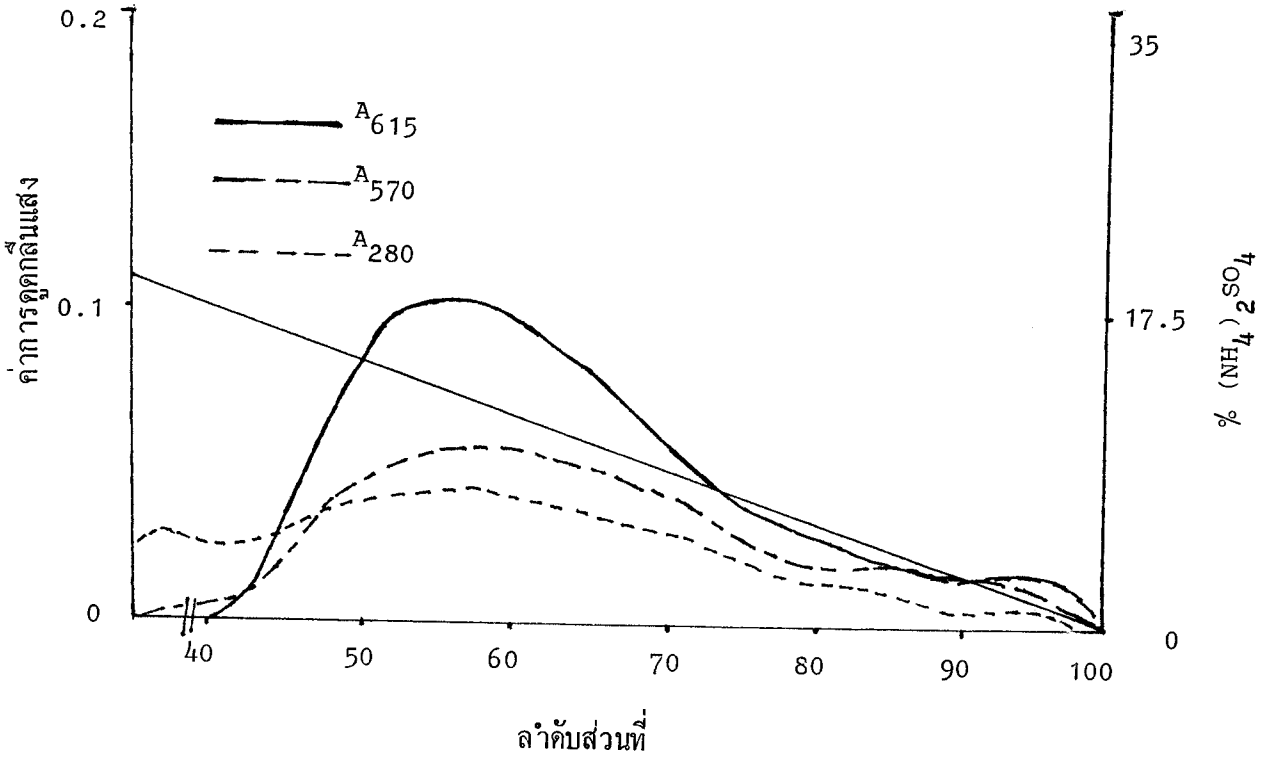


ภาพประกอบ 12 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคอิริทรินที่แยกได้จากคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส รูป A, B, C, D เป็นลำดับส่วนที่ 50, 75, 85, 95 ตามลำดับ

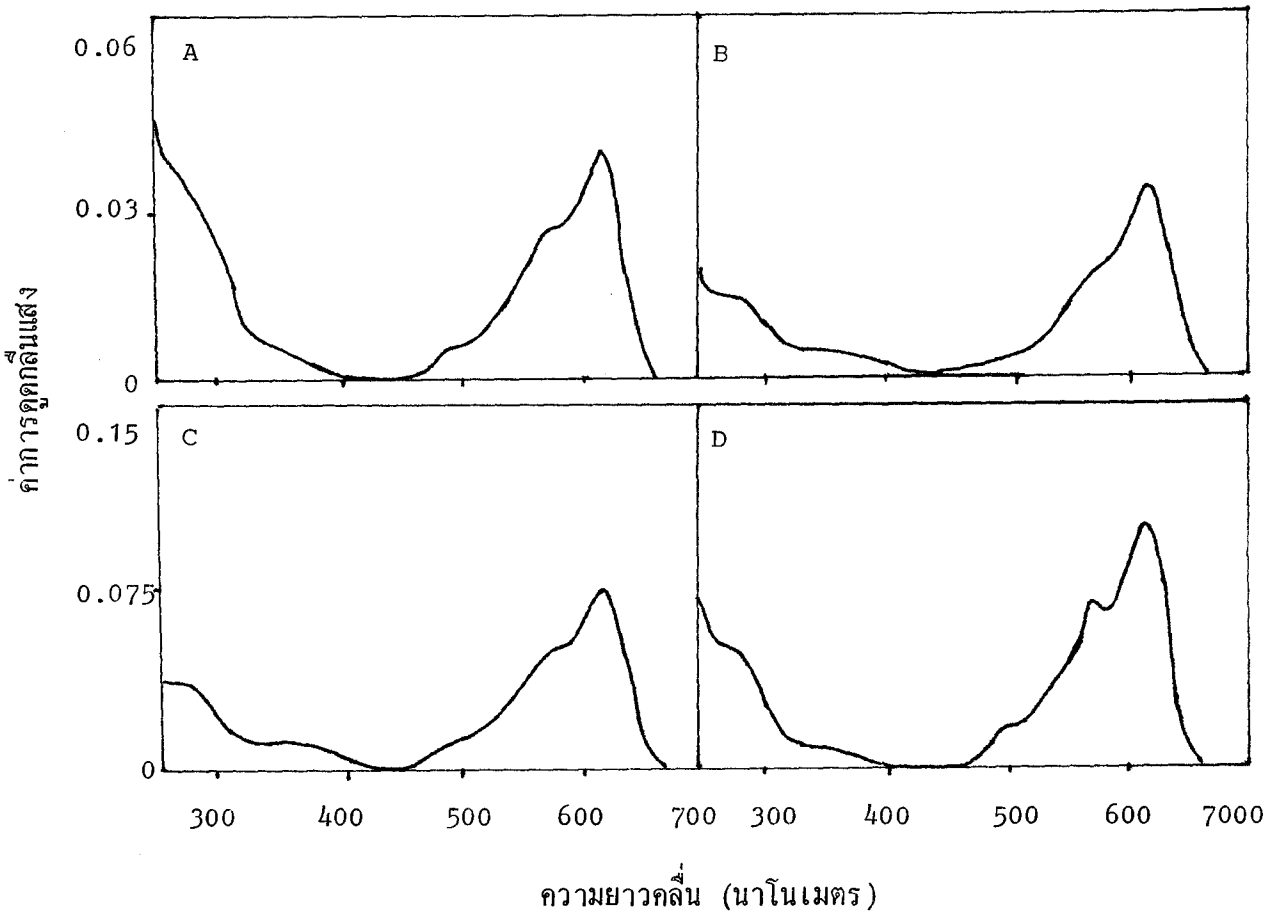


ภาพประกอบ 13 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจากผลรวมลำดับส่วนที่ 83 - 89 ของสารไฟโคอิริทริน ที่แยกออกจากสารเจือปนด้วยดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี

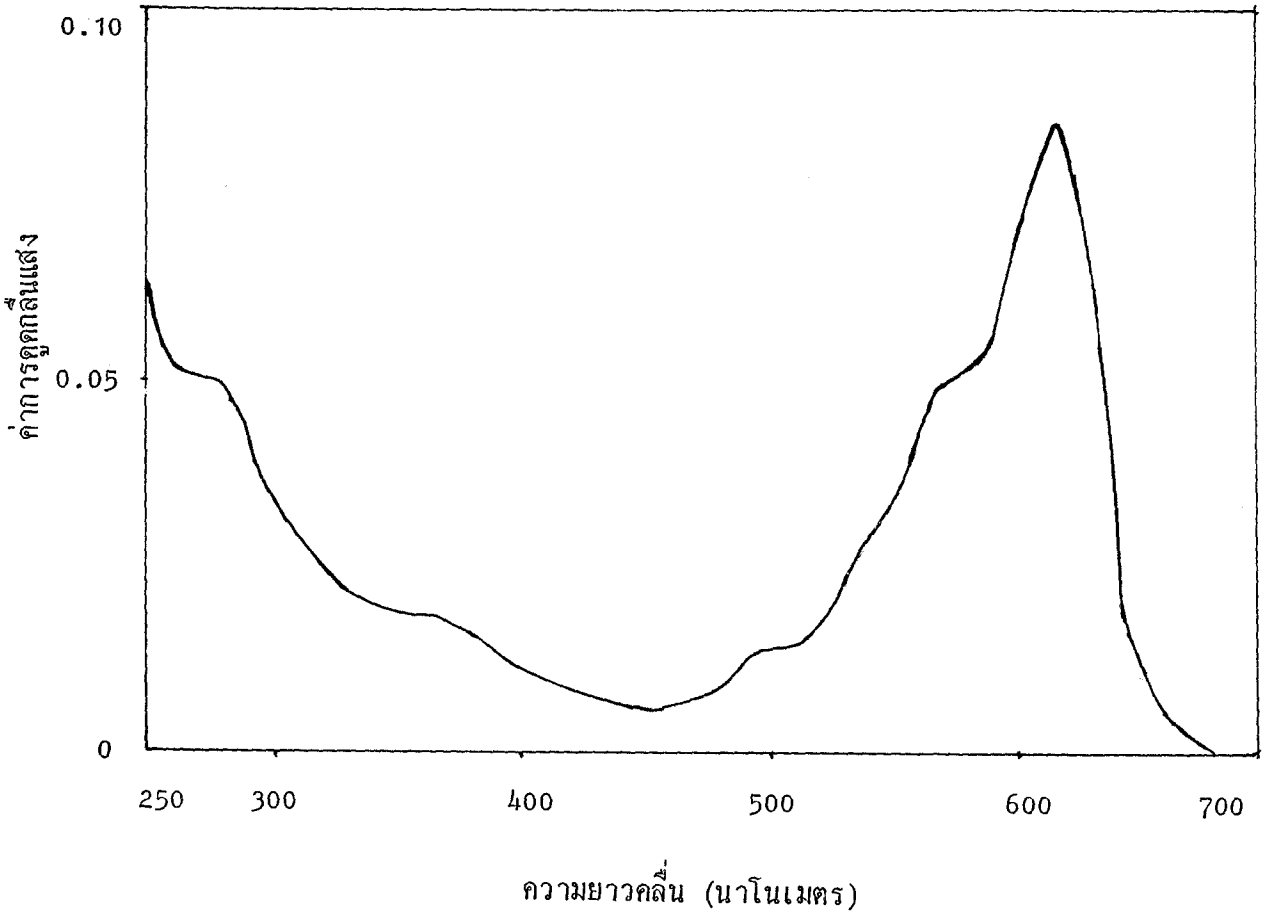
3.2 สามารถแยกสารไฟโคไซยานินออกจากสารเจือปนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีความเข้มข้นลดลงเชิงเส้นจาก 35 % - 0 % ของสารละลายอิ่มตัวในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาพประกอบ 14) ลำดับส่วนของการแยกไฟโคไซยานินที่ได้จากคอลัมน์จะมีปริมาณสารเจือปนอยู่แตกต่างกันดังภาพประกอบ 15 อัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 ต่อ 280 นาโนเมตร จะเพิ่มขึ้นในช่วงลำดับส่วนที่ 45 - 65 และลดลงจนถึงลำดับส่วนที่ 99 ดังนั้นลำดับส่วนที่ควรนำมารวมเพื่อแยกเอาปริมาณของสารไฟโคไซยานิน คือ 47 - 65 สารละลายที่รวมกันมีสีน้ำเงินและมีลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงดังภาพประกอบ 16 โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 615 ต่อ 280 นาโนเมตร เท่ากับ 1.6



ภาพประกอบ 14 แสดงผลการแยกสารไฟโคไซยานินออกจากสารเจือปนด้วย ดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี



ภาพประกอบ 15 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคไซยานินที่แยกได้จากคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส รูป A, B, C, D เป็นลำดับส่วนที่ 45, 55, 65, 75 ตามลำดับ



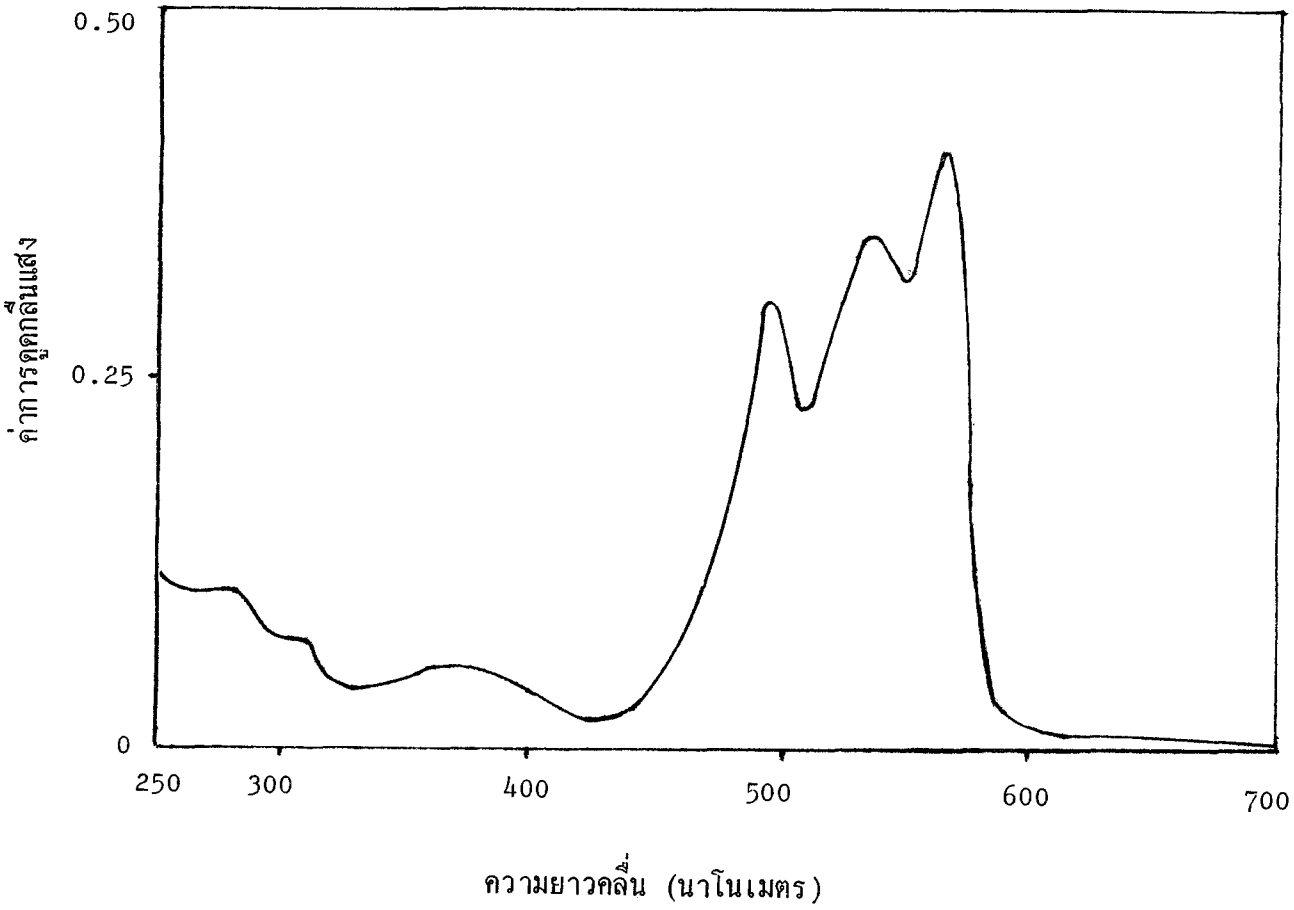
ภาพประกอบ 16 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงจากผลรวมลำดับที่ 47 - 65 ของสารไฟโคไซยานิน ที่แยกออกจากสิ่งเจือปนด้วยดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี

4. การศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

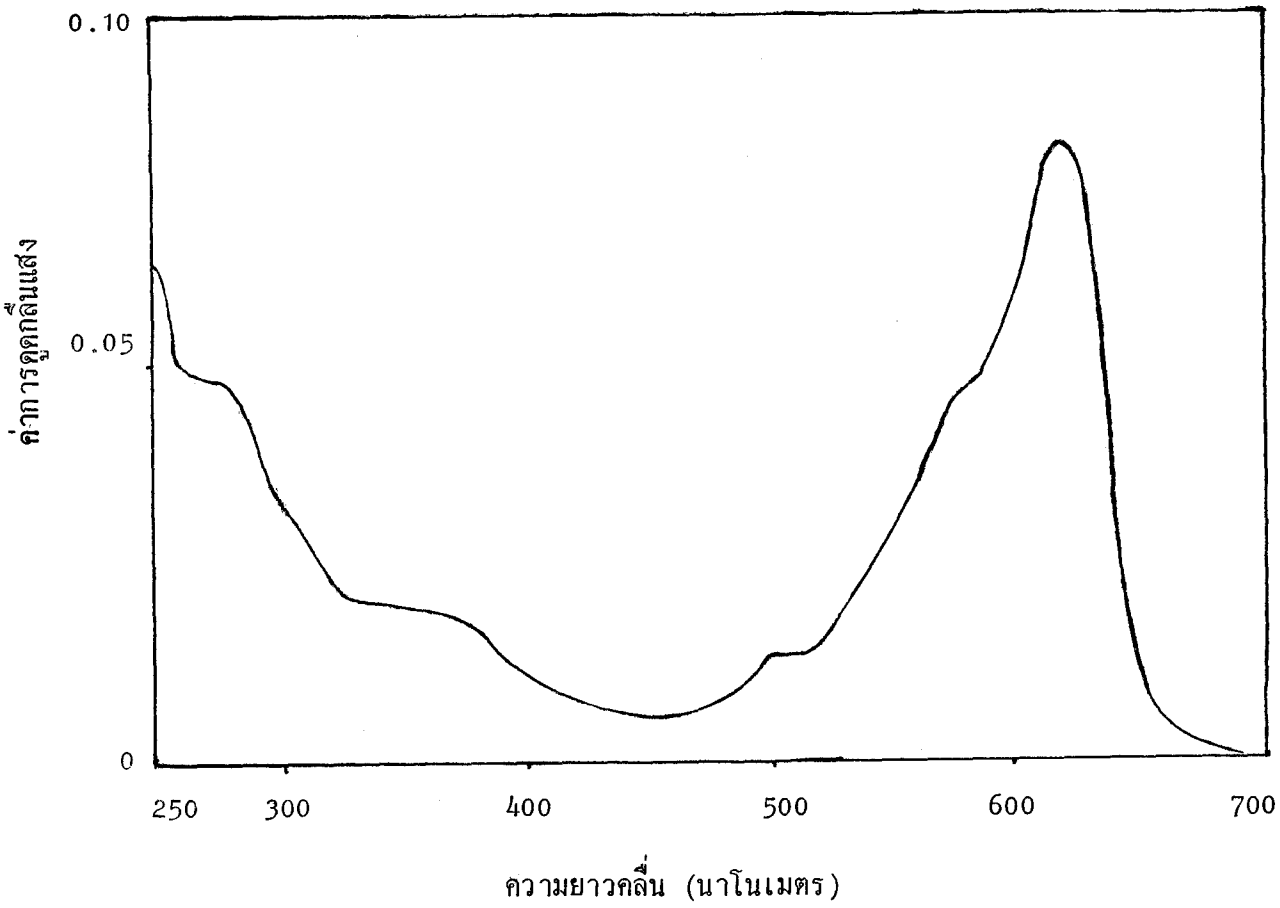
จากการนำผลึกของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินซึ่งตกตะกอนจากลำดับส่วนที่ 83 - 89 และ 47 - 65 ตามลำดับ ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ได้ผลดังนี้

สารไฟโคอิริทรินมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 495, 535 และ 565 นาโนเมตร มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 565 : 535 : 495 เท่ากับ 0.4 : 3.5 : 0.30 และ 565 : 280 เท่ากับ 3.85 (ภาพประกอบ 17)

สารไฟโคไซยานินมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 498, 570 และ 615 นาโนเมตร มีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 615 : 570 : 498 เท่ากับ 0.08 : 0.04 : 0.01 และ 615 : 280 เท่ากับ 1.6 (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 17 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคอิริทรินในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0



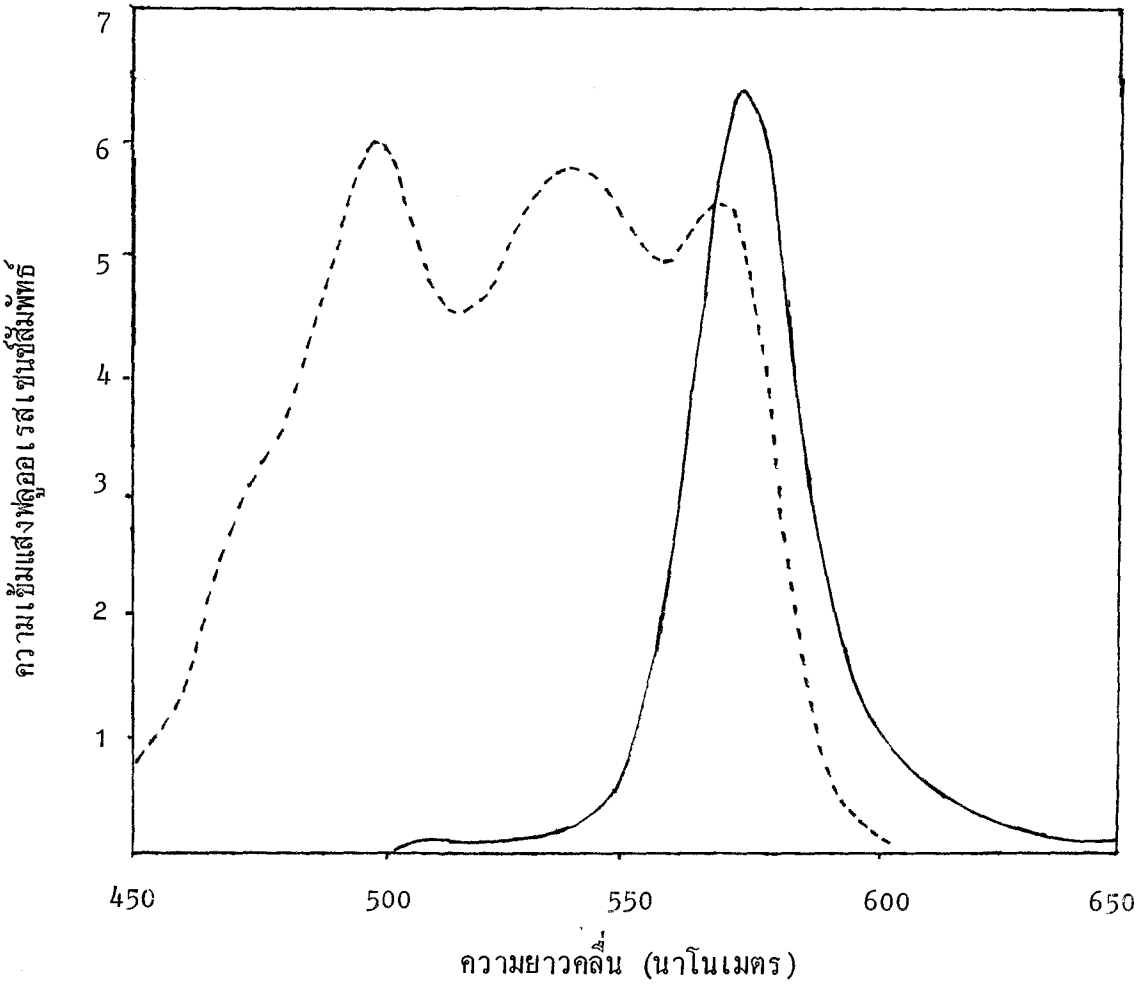
ภาพประกอบ 18 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคไซยานินในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0

5. การศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์

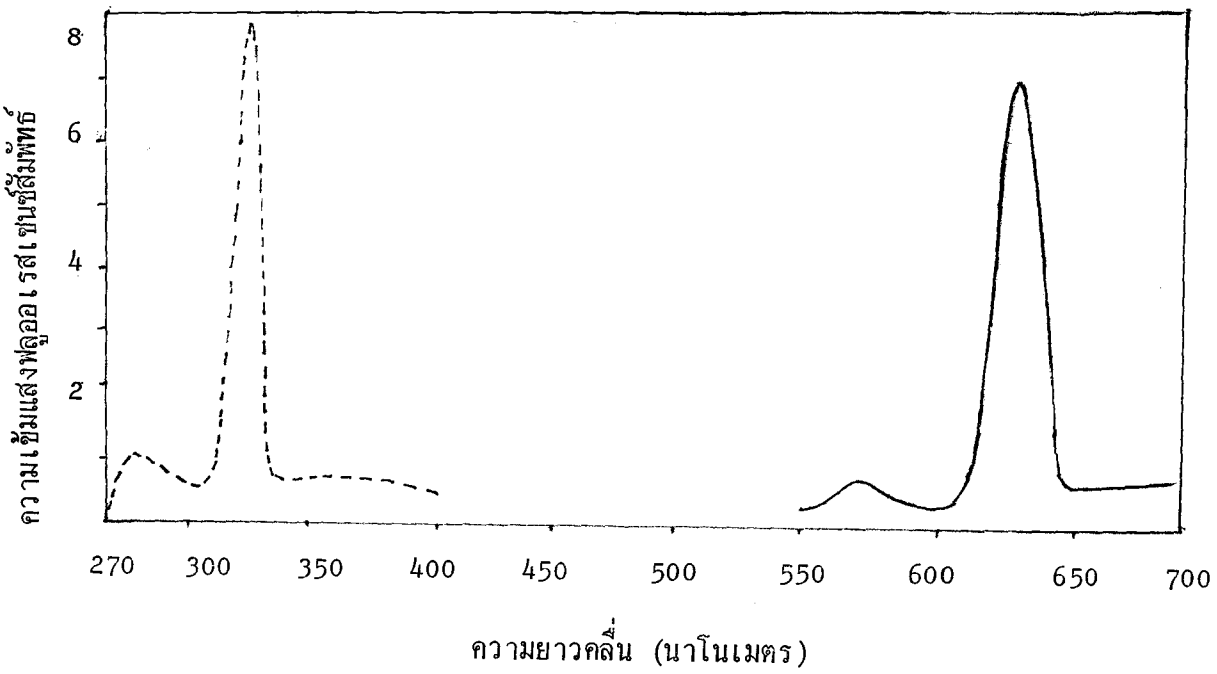
จากการนำผลึกของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินซึ่งตกผลึกจากลำดับส่วนที่ 83 - 89 และ 47 - 65 ตามลำดับ ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไปวัดค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ผลดังนี้

สารไฟโคอิริทรินมีลักษณะสเปกตรัมการปล่อยแสง (emission) ฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 574 นาโนเมตร โดยตั้งภาวะการกระตุ้น (excitation) ที่ความยาวคลื่น 499 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 19) มีแสงสีส้มเหลือง

สารไฟโคไซยานินมีลักษณะสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 635 นาโนเมตร โดยตั้งภาวะการกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 323 นาโนเมตร (ภาพประกอบ 20) มีแสงสีแดง



ภาพประกอบ 20 สเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารไฟโคอิริทริน ——— อิมิชชัน สเปกตรัม (emission spectrum) ----- เอกไซเทชัน สเปกตรัม (excitation spectrum) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0



ภาพประกอบ 19 สเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารไฟโคไซยานิน—— อิมิชชัน สเปกตรัม (emission spectrum) ------ เอกไซเทชัน สเปกตรัม (excitation spectrum) ใน โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0

6. การศึกษาความเป็นสารเอกพันธุ์ (homogeneity test) และการศึกษาหน่วยย่อยของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

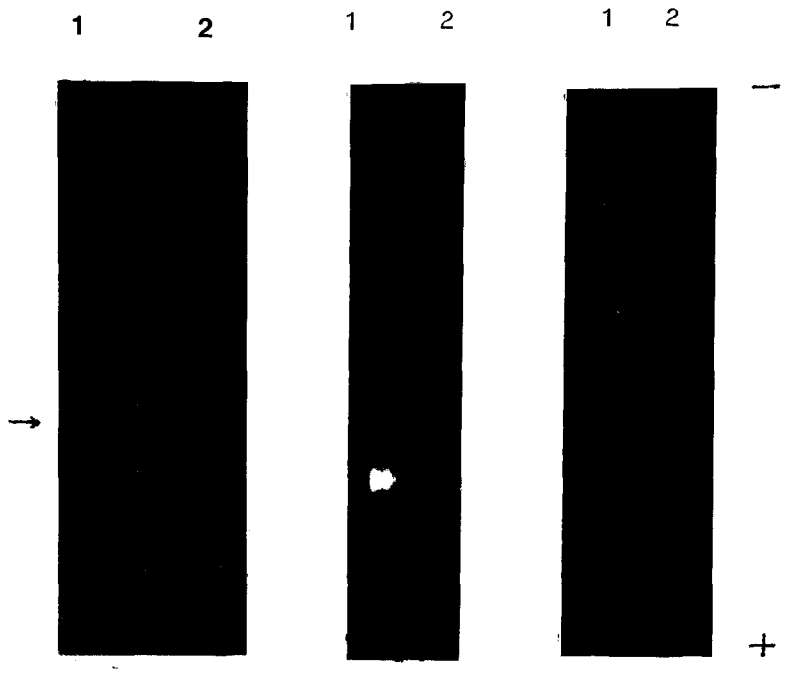
6.1 การตรวจสอบความเป็นสารเอกพันธุ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 % pH 8.9

จากการนำสารละลายของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินไปทำอิเล็กโตรโฟรีซีสที่ pH 8.9 ได้ผลดังนี้

ก. เมื่อหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้าแล้วสามารถเห็นแถบสีชมพูของไฟโคอิริทรินชัดเจน 1 แถบ แต่ไม่เห็นแถบสีน้ำเงินของไฟโคไซยานิน นอกจากแถบสีน้ำเงินของโปรโมฟีนอล บลู ซึ่งใช้เป็นตำแหน่งสีอ้างอิง (dye reference) ดังแสดงในภาพประกอบ 21 A

ข. เมื่อนำแผ่นเจลนี้ไปตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่า ที่ตำแหน่งแถบสีชมพูของสารไฟโคอิริทริน มีแถบที่เรืองแสงได้ (ภาพประกอบ 21 B ช่องที่ 1) และพบแถบเรืองแสงจาง ๆ ที่ตำแหน่งเดียวกับไฟโคอิริทรินในช่องของไฟโคไซยานิน ดังภาพประกอบ 21 B ช่องที่ 2

ค. หลังจากการย้อมโปรตีนด้วยสีโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู แล้วพบว่าได้แถบโปรตีนตรงตำแหน่งเดียวกับแถบสีชมพูที่เรืองแสงได้ของไฟโคอิริทริน (ภาพประกอบ 21 C) และพบว่าที่ตำแหน่งสีอ้างอิงของสารไฟโคไซยานินมีแถบสีน้ำเงินปรากฏเข้มมากกว่าของสารไฟโคอิริทริน ซึ่งน่าจะเป็นแถบโปรตีนของไฟโคไซยานินที่มาอยู่ตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งสีอ้างอิง



ภาพประกอบ 21 แสดงผลของอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล โพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 %
pH 8.9

A แถบสีชมพูของไฟโคอิริทริน (ลูกศรชี้) ที่เห็นเมื่อหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้าแล้ว
1. ไฟโคอิริทริน 2. ไฟโคไซยานิน

B แถบเรืองแสงที่เห็นจากการส่องด้วยอัลตราไวโอเล็ตก่อนทำการย้อมโปรตีน
1. ไฟโคอิริทริน 2. ไฟโคไซยานิน

C แถบโปรตีนที่ได้จากการย้อมด้วยโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู 1. ไฟโคอิริทริน 2. ไฟโคไซยานิน

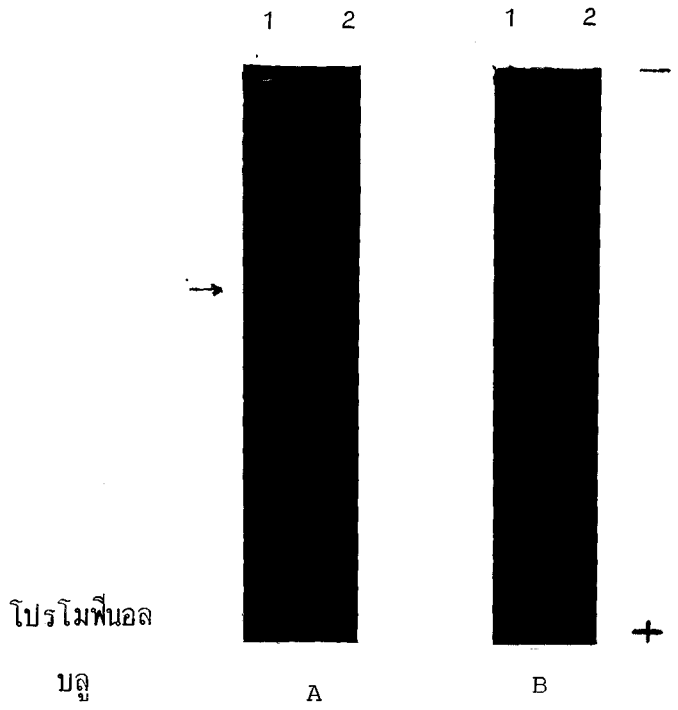
6.2 การตรวจสอบความเป็นสารเอกพันธุ์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 7 % pH 7.0

จากการนำสารละลายของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินไปทำอิเล็กโตรโฟรีซีสที่ pH 7.0 ได้ผลดังนี้

ก. เมื่อหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้าแล้วไม่สามารถเห็นแถบสีชมพูของไฟโคอิริทรินและแถบสีน้ำเงินของไฟโคไซยานิน นอกจากแถบสีน้ำเงินของโปรโมฟีนอลบลู ซึ่งเป็นตำแหน่งสีอ้างอิง

ข. เมื่อนำแผ่นเจลนี้ไปตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบว่าสามารถเห็นแถบที่เรืองแสงได้ของสารไฟโคอิริทริน (ภาพประกอบ 22 A ช่องที่ 1) แต่ไม่พบแถบเรืองแสงใด ๆ ของสารไฟโคไซยานินดังภาพประกอบ 22 A ช่องที่ 2

ค. หลังจากทำการย้อมโปรตีนด้วยสีโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู แล้ว พบว่าได้แถบโปรตีนตรงตำแหน่งเดียวกับแถบที่เรืองแสงได้ของไฟโคอิริทริน และพบว่าได้แถบโปรตีนของสารไฟโคไซยานินอยู่ในตำแหน่งที่สูงกว่าแถบโปรตีนของไฟโคอิริทริน ดังแสดงในภาพประกอบ 22 B



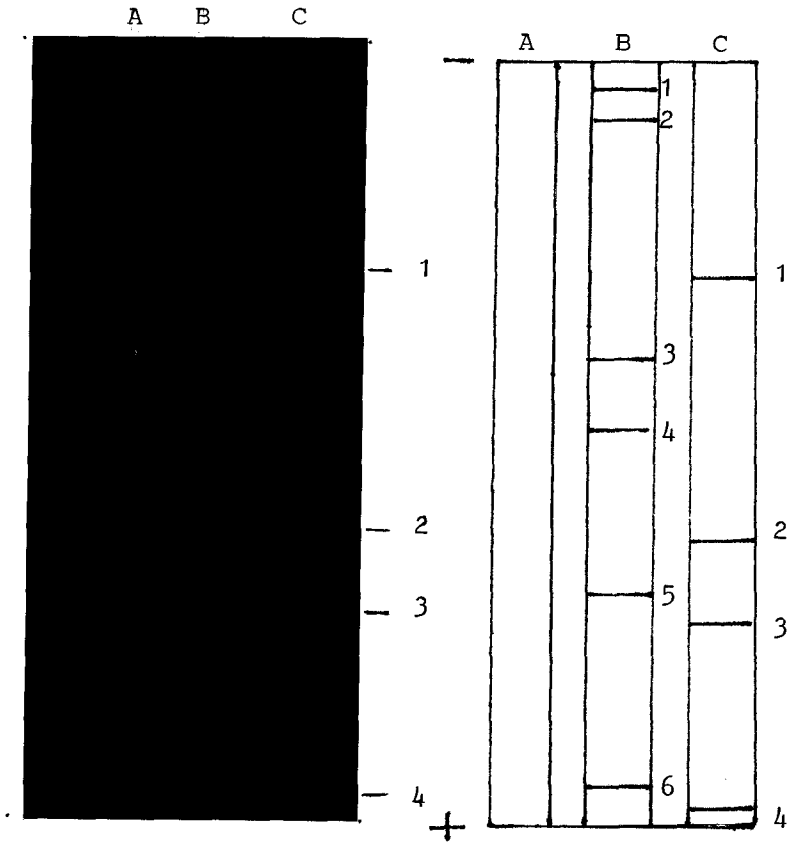
ภาพประกอบ 22 แสดงผลของอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 %
pH 7.0
A แถบเรืองแสงที่เห็นจากการส่องด้วยอัลตราไวโอเล็ตก่อนทำการย้อมโปรตีน
1. ไฟโคอิริทริน (ลูกศรชี้) 2. ไฟโคไซยานิน
B แถบโปรตีนที่ได้จากการย้อมด้วยโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู 1. ไฟโคอิริทริน 2. ไฟโคไซยานิน

6.3 การศึกษาหน่วยย่อยด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 8.9

ผลจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ pH 8.9 ได้ผลดังนี้

ก. เมื่อหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้าสังเกตเห็นแถบสีชมพู 1 แถบ บริเวณตอนบนของแผ่นเจล ในส่วนที่ใส่สารไฟโคอิริทริน แต่ไม่เห็นแถบสีใด ๆ ในส่วนที่ใส่สารไฟโคไซยานิน

ข. หลังจากย้อมโปรตีนด้วยโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู แล้ว พบว่าบริเวณที่เห็นสีชมพูก่อนย้อมโปรตีนนั้นติดสีน้ำเงินของโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู ด้วย แล้วยังพบแถบโปรตีนอีก 3 แถบ ในบริเวณด้านล่างของแผ่นเจล ดังแสดงในภาพประกอบ 23 c แถบโปรตีนทั้ง 4 แถบนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 81,500, 41,000, 33,000 และ 19,000 ดาลตัน จากการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาพประกอบ 23 b และ 24) แต่ไม่พบแถบโปรตีนใด ๆ ในส่วนของไฟโคไซยานิน (ภาพประกอบ 23 a) และแม้จะเพิ่มปริมาณของไฟโคไซยานินอีก 50 % ก็ไม่สามารถตรวจพบแถบโปรตีนบนแผ่นเจลได้



ภาพประกอบ 23 แสดงผลของอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจลเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 8.9

A สารไฟโคไซยานิน

B โปรตีนมาตรฐาน (high molecular weight protein kit, HMW)

1 = Thyroglobulin (330,000)

2 = Ferritin (220,000)

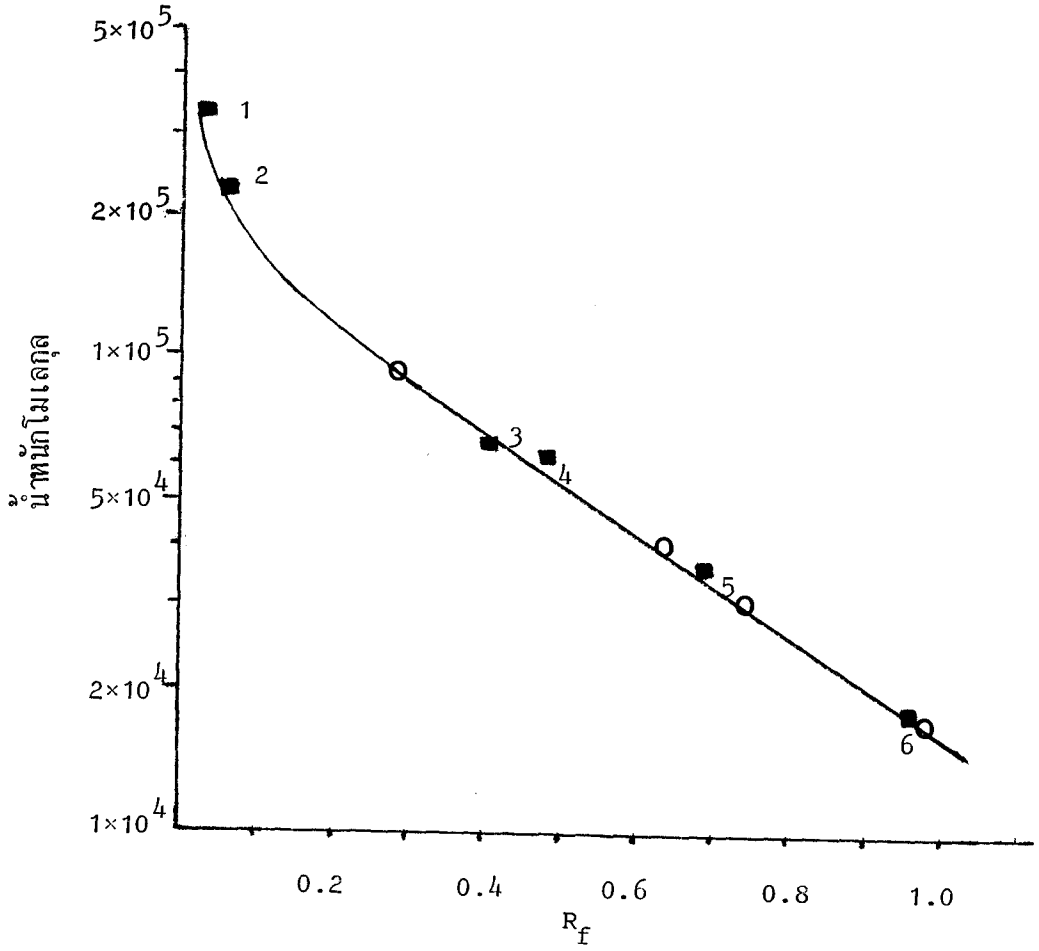
3 = Albumin (67,000)

4 = Catalase (60,000)

5 = Lactate Dehydrogenase (36,000)

6 = Ferritin (18,000)

C สารไฟโคอิริทริน



ภาพประกอบ 24 แสดงผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของสารไฟโคอิริทรินเปรียบเทียบกับสารโปรตีนมาตรฐาน ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 8.9 ■ HMW, o ไฟโคอิริทริน

HMW : 1 = Thyroglobulin (330,000), 2 = Ferritin (220,000), 3 = Albumin (67,000), 4 = Catalase (60,000), 5 = Lactate Dehydrogenase (36,000), 6 = Feritin (18,000)

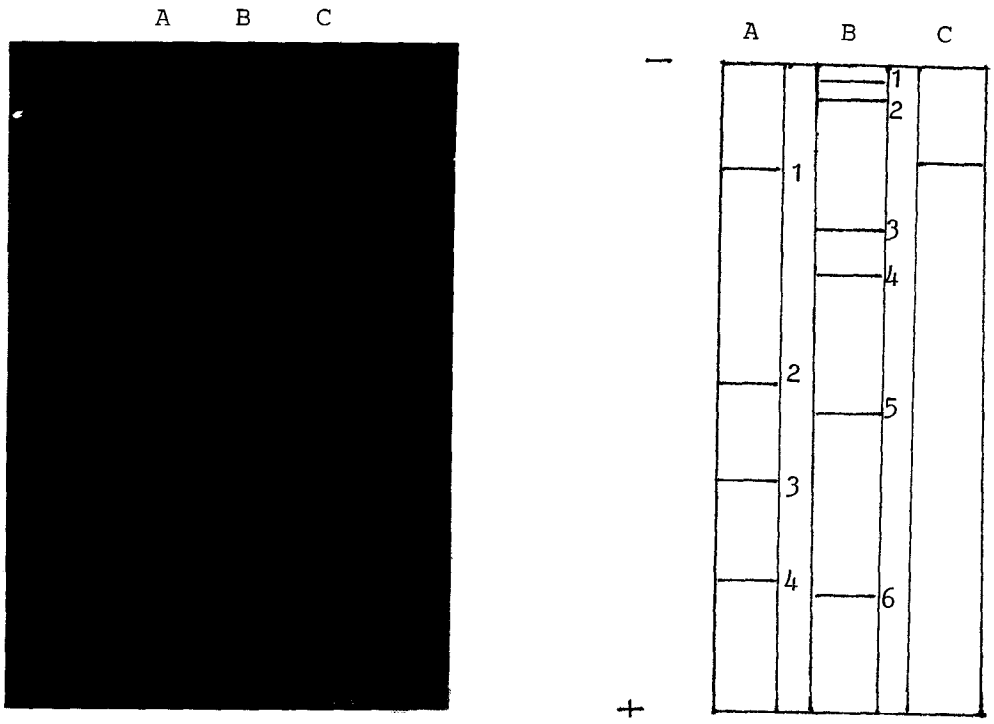
6.4 การศึกษาหน่วยย่อยด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 7.0

ผลจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ pH 7.0 ได้ผลดังนี้

ก. เมื่อหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้า สังเกตเห็นแถบสีชมพู 1 แถบ บริเวณตอนบนของแผ่นเจลในส่วนที่ใส่สารไฟโคอิริทริน แต่ไม่เห็นแถบสีใด ๆ ในส่วนที่ใส่สารไฟโคไซยานิน

ข. หลังจากย้อมโปรตีนด้วยโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู แล้ว พบว่าบริเวณที่เห็นสีชมพูก่อนย้อมโปรตีนนั้นติดสีน้ำเงินของโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู ด้วย และยังพบแถบโปรตีนอีก 3 แถบในส่วนล่างของแผ่นเจล ดังแสดงในภาพประกอบ 25 A แถบโปรตีนทั้ง 4 แถบนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 90,500, 38,000, 29,000 และ 18,000 ดาลตัน จากการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาพประกอบ 25 B และ 26)

สำหรับผลของสารไฟโคไซยานินนั้น พบว่าปรากฏแถบสีโปรตีน 1 แถบ หลังจากย้อมด้วยโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู (ภาพประกอบ 25 C) แถบโปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 92,000 ดาลตัน จากการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาพประกอบ 25 B และ 26)



ภาพประกอบ 25 แสดงผลของอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นเจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 7.0

A สารไฟโคอิริทริน

B โปรตีนมาตรฐาน (high molecular weight protein kit, HMW)

1 = Thyroglobulin (330,000)

2 = Ferritin (220,000)

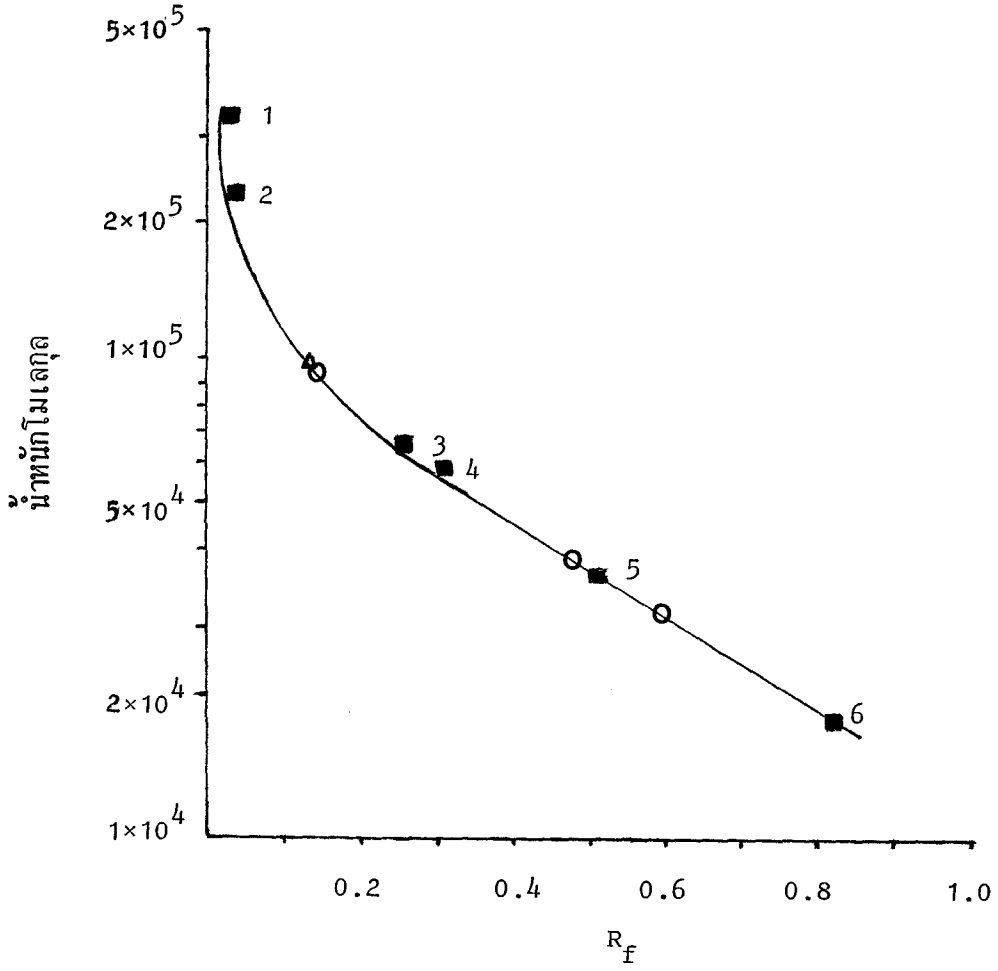
3 = Albumin (67,000)

4 = Catalase (60,000)

5 = Lactate dehydrogenase (36,000)

6 = Ferritin (18,000)

C สารไฟโคไซยานิน



ภาพประกอบ 26 แสดงผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของสารไฟโคอิริทริน และไฟโคไซยานิน เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส บนแผ่นเจลเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้น 10 % pH 7.0 ■ HMW O ไฟโคอิริทริน Δ ไฟโคไซยานิน

HMW : 1 = Thyroglobulin (330,000), 2 = Ferritin (220,000), 3 = Albumin (67,000), 4 = Catalase (60,000) 5 = Lactate Dehydrogenase (36,000) 6 = Ferritin (18,000)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

เพื่อศึกษาสมบัติและวิธีการสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. การศึกษาครั้งนี้ใช้สาหร่ายสกุลกราซิลาเรีย จากชายฝั่งทะเลตำบลแหลมหิน จังหวัดตราด

2. ศึกษาวิธีการสกัดไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

3. ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration)

4. ศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสง (absorption spectrum) ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน ที่ความยาวช่วงคลื่น 250 - 700 นาโนเมตร

5. ศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence emission spectra) ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน ที่ความยาวช่วงคลื่น 500 - 700 นาโนเมตร

6. ศึกษาหน่วยย่อย (subunit) ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเทคนิคเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซีส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล

1. เก็บตัวอย่างสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียที่ตำบลแหลมหิน จังหวัดตราด ในเดือนมีนาคม สุ่มเก็บที่ระดับน้ำลึก 1 เมตร จำนวน 10 กิโลกรัม แล้วนำมาล้างแยกสิ่งเจือปนออกและแบ่งเก็บเป็นถุงเล็ก ๆ เก็บในช่องแช่แข็งของตู้เย็น

2. สกัดสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินจากสาหร่ายด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย ดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

3. หาน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยเทคนิค เจล ฟิลเตรชัน

4. บันทึกสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

ค. บันทึกสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

6. ทดสอบความเป็นสารเอกพันธุ์และวิเคราะห์หาจำนวนหน่วยย่อยของสารไฟโคอิริทริน และไฟโคไซยานินด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล และเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซีส

สรุปผลการศึกษาค้นคว้า

1. สามารถสกัดสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 และสามารถแยกสิ่งเจือปนออกได้ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และด้วยวิธี ดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี

2. ไฟโคอิริทรินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 495, 535 และ 565 นาโนเมตร โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 565 : 280 เท่ากับ 3.85

3. ไฟโคไซยานินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 498, 570 และ 615 นาโนเมตร โดยมีอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 615 : 280 เท่ากับ 1.6

4. ไฟโคอิริทรินมีค่าการปล่อยแสง (emission) ฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 574 นาโนเมตร ส่วนสารไฟโคไซยานินมีค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ความยาวคลื่น 635 นาโนเมตร

5. ไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 175,000 และ 120,000 ดาลตัน ตามลำดับ (หาโดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน)

6. ในอิเล็กโตรโฟรีซีสที่ pH 7.0 ไฟโคอิริทรินมีการเคลื่อนที่ (electrophoretic mobility) เร็วกว่าไฟโคไซยานิน และสามารถเห็นการเรืองแสงของไฟโคอิริทรินภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตได้ แต่ไม่เห็นการเรืองแสงของไฟโคไซยานิน

7. ในอิเล็กโตรโฟรีซีสที่ pH 8.9 พบแถบไฟโคอิริทรินที่เรืองแสงได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต 1 แถบ ซึ่งย้อมติดสีโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู ด้วย และพบแถบไฟโคไซยานินที่ย้อมติดสีโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู ที่ตำแหน่งเดียวกับสีอ้างอิงเท่านั้น

8. พบหน่วยย่อยของไฟโคอิริทริน 4 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 81,500 - 90,500, 38,000 - 41,000, 29,000 - 33,000 และ 18,000 - 19,000 ดาลตัน จากเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 % ที่ pH 7.0 และ 8.9

9. พบหน่วยย่อยของไฟโคไซยานินเพียง 1 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 92,000 ดาลตัน จากเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 10 % ที่ pH 7.0 แต่ไม่พบแถบโปรตีนใด ๆ ที่ pH 8.9

อภิปรายผล

ในการศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารไฟโคอิริทรินที่สกัดได้จากสาหร่าย Gracilaria spp. มีลักษณะสเปกตรัมที่สอดคล้องกับอาร์-ไฟโคอิริทริน ที่สกัดได้จากสาหร่าย Gracilaria confervoides (Van der Velde 1973 : 246 - 257) โดยแสดงถึงค่าดูดกลืนแสงของไฟโคบิลินที่เป็นส่วนประกอบคือ ไฟโคยูโรบิลิน ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร และไฟโคอิริโทรบิลินมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 และ 565 นาโนเมตร (Teale Dale. 1970 : 161 - 169) ส่วนสารไฟโคไซยานินที่สกัดได้มีลักษณะสเปกตรัมที่แสดงว่ามีไฟโคบิลินที่เป็นส่วนประกอบคือ ไฟโคไซยาโนบิลิน ไฟโคอิริโทรบิลิน และไฟโคยูโรบิลิน ซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 615,570 และ 498 นาโนเมตร ตามลำดับ (Glazer and Hixson. 1977 : 32 - 42)

จากการศึกษาสเปกตรัมการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารไฟโคอิริทริน พบว่า มีค่าความยาวคลื่นสูงสุดที่ 574 นาโนเมตร สอดคล้องกับ อาร์-ไฟโคอิริทริน ที่สกัดจากสาหร่าย Callithamnion byssoides (Yu and Others 1981 : 482 - 488) และไฟโคไซยานินมีค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่นสูงสุด 635 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับ อาร์-ไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย Porphyridium cruentum (Glazer and Hixson. 1975 : 5487 - 5495)

สารไฟโคอิริทรินที่สกัดได้เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าสารไฟโคไซยานิน ดังผลจากการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคเจล ฟิลเตรชัน และจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสที่ pH 7.0 พบว่า สามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารไฟโคไซยานิน ดังนั้นแสดงว่าสารไฟโคอิริทรินมีปริมาณประจุ

สุทธิต่อมวลมากกว่าของไฟโคไซยานินและไฟโคอิริทรินที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์พอควร ทั้งนี้เนื่องจากสามารถพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสที่ pH 7.0 และ 8.9 แต่ที่ pH 8.9 พบว่ามีแถบโปรตีนจาง ๆ อีก 1 แถบ ปรากฏที่ตำแหน่งของสีอ้างอิง ซึ่งแสดงว่าอาจมีไฟโคไซยานินเจือปนอยู่ซึ่งไม่คงตัว ณ pH 8.9 จึงเคลื่อนที่ไปพร้อมกับสีอ้างอิง สำหรับไฟโคไซยานินที่สกัดได้ก็มีความบริสุทธิ์พอควรคือพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสที่ pH 7.0 และพบว่าสารไฟโคไซยานินเป็นสารที่ไม่คงตัวในภาวะเบส เนื่องจากไม่สามารถพบแถบโปรตีนใด ๆ บนแผ่นเจลที่ pH 8.9 นอกจากที่ตำแหน่งของสีอ้างอิง ซึ่งแสดงว่าสารไฟโคไซยานินถูกไฮโดรไลส์ด้วยเบสเป็นเปปไทด์สั้น ๆ และเคลื่อนที่ไปบนแผ่นเจลพร้อมกับสีอ้างอิง แต่จากการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตก่อนย้อมด้วยสีโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู พบว่าสามารถเห็นแถบเรืองแสงจาง ๆ ตรงตำแหน่งเดียวกับไฟโคอิริทรินในช่องของไฟโคไซยานิน แสดงว่าน่าจะมีไฟโคอิริทรินเจือปนอยู่กับสารไฟโคไซยานินที่สกัดได้แต่มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยการย้อมสีโคมาสซี บริลเลียนท์ บลู

จากการศึกษาหน่วยย่อยบนแผ่น เจล เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ พบว่า สารไฟโคอิริทรินประกอบด้วย หน่วยย่อย 4 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 81,500 - 90,500, 38,000 - 41,000, 29,000 - 33,000 และ 18,000 - 19,000 ดาลตัน เมื่อรวมน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยทั้ง 4 หน่วยแล้ว พบว่ามีค่าประมาณ 175,000 ดาลตัน ซึ่งเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคอิริทรินที่หาได้จากเทคนิคเจล ฟิลเตรชัน ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าในโครงสร้างธรรมชาติของสารไฟโคอิริทรินประกอบด้วยหน่วยย่อย ๆ 4 หน่วยย่อยดังกล่าว และพบหน่วยย่อยเพียงหน่วยเดียวของสารไฟโคไซยานินจากการทำเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซีสที่ pH 7.0 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 92,000 ดาลตัน ซึ่งไม่เท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของไฟโคไซยานินที่มีค่าประมาณ 120,000 ดาลตัน จากเทคนิคเจล ฟิลเตรชัน การที่น้ำหนักโมเลกุลของไฟโคไซยานินที่ได้จาก 2 วิธีนี้ไม่เท่ากัน อาจเนื่องมาจากไฟโคไซยานินมีหน่วยย่อยอีกหน่วยหนึ่งที่เป็นหน่วยย่อยเล็ก ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน และมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้บนแผ่นเจลเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ และจากรายงานการศึกษาหน่วยย่อยของอาร์-ไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่าย Prophydium cruentum (Glazer and Hixson. 1975 : 5487 - 5495) พบว่า สามารถแยกได้ 2 หน่วยย่อย คือ อัลฟา (α) และบีตา (β)

โดยบีตามีปริมาณมากกว่าอัลฟา ดังนั้นสารไฟโคไซยานินที่สกัดได้จึงน่าจะประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 92,000 ดาลตัน และมีปริมาณมากกว่าอีกหน่วยย่อยหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดาลตัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาปริมาณและชนิดของโลหะหนักที่มีอยู่ในสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่ายแหล่งต่าง ๆ เพื่อทดสอบความเป็นพิษก่อนจะนำมาใช้เป็นสีผสมอาหาร

2. ควรทำการศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินกับไอออนของโลหะหนักบางชนิดที่ pH แตกต่างกัน เพื่อสามารถนำสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินมาใช้วิเคราะห์หาโลหะหนักบางชนิดได้

3. ควรทำการศึกษาสมบัติการเกิดสารประกอบของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินกับโปรตีนบางชนิดในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อนำไปวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกันโดยสมบัติฟลูออเรสเซนซ์ของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

4. ควรทำการศึกษาสกัดสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสกุลอื่น ๆ อีก เพื่อเปรียบเทียบสมบัติของสารไฟโคอิริทรินและไฟโคไซยานิน

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์ สาหร่าย คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2527, 343 หน้า

Fritsch, F.E. "Rhodophyceae" The Structrue and Reproduction of Algae V2, p. 397 - 422, London, Cambridge at the University Press, 1965.

Glazer, A.N. and C.S. Hixson "Structure and chromophore Composition of Rhodophytan phycoerythrins" The Journal of Biological Chemistry 252 (1), 32 - 42, January, 1977.

_____ "Characterization of R-Phycocyanin" The Journal of Biological Chemistry 248 (14), 5487 - 5495, July, 1975.

Goodwin, T.W. "Algal Biliproteins and Phycobilins" Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments V1, p. 328 - 376, London, Academic Press, 1976.

Klotz, A.V. and A.N. Glazer "Characterization of the Bilin Attachment Sites in R-Phycoerythrin" The Journal of Biological Chemistry 260 (8), 4856 - 4863, 1985.

MacCall, R., W. Habing and D.S. Berns "Characterization of Phycocyanin from Chroomonas spp." The Journal of Biological Chemistry 248 (20), 7080 - 7086, 1973.

Mizuno, H.,N. Ise and Others "Solution Properties of Phycoerythrin I Characterization of Phycoerythrin" Bulletin of the chemical society of Japan. 59, 1161 - 1165, April, 1986.

Nagy, J.O., J.E. Bishop and Others "Bilin Attachment Sites in the α β and γ Subunit of R-Phycoerythrin structural studies on Singly and doubly liked phycourobilins" The Journal of Biological Chemistry 260 (8), 4864 - 4868, April, 1985.

Oi, V.T., A.N. Glazer and L. Stryer "Fluorescent Phycobiliprotein conjugates for Analysis of Cells and Molecules" The Journal of Cell Biology 93, 981 - 986, 1982.

Teale, F.W. and R.E. Dale "Isolation and Spectral Characterization of Phycobiliprotein" Biochemical Journal 116, 161 - 169, 1970.

Van Der Velde, H.H. "The natural occurrence in red algae of two Phycoerythrins with different molecular weights and spectral properties" Biochimica et Biophysica Acta 303, 246 - 257, 1973.

Weber, K. and M. Osborn "The Reliabity of Molecular weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis" The Journal of Biological Chemistry 240 (16), 4406 - 4412, 1969.

Yu, M.H., A.N. Glazer and Others "Phycoerythrins of the Red Algae Callithamnion spp." Plant Physiology 68, 482 - 488, 1981.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. Acrylamide : Bis-acrylamide (30 : 0.8 %)

Acrylamide	30.0	g
Bis-acrylamide	0.8	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	100.0	ml

เขย่าให้ละลาย กรองเอาตะกอนส่วนที่ไม่ละลายออก และเก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C สารละลายนี้ใช้ได้ไม่เกิน 1 เดือน

2. 1.5 M Tris HCl buffer pH 8.9

Tris	36.330	g
น้ำกลั่น	180.0	ml
ปรับ pH ด้วย 6 M HCl ให้ได้ pH 8.9		
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200	ml

เก็บสารละลายในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 °C

3. 0.5 M Tris HCl buffer pH 6.8

Tris	6.055	g
น้ำกลั่น	85	ml
ปรับ pH ด้วย 6 M HCl ให้ได้ pH 6.8		
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	100	ml

เก็บสารละลายในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 °C

4. 10% N,N,N',N' - tetramethylenediamine (TEMED)

TEMED	2.0	ml
เติมน้ำกลั่น	18.0	ml

5. 10 % $(NH_4)_2S_2O_8$ (เตรียมเมื่อต้องการใช้)

$(NH_4)_2S_2O_8$	0.1	g
เติมน้ำกลั่น	1.0	ml

6. 10 % เอสดีเอส (sodium dodecyl sulfate, SDS)

เอสดีเอส	0.1	g
เติมน้ำกลั่น	1.0	ml

7. 10 % SDS-polyacrylamide gel (running gel) pH 8.9

Acrylamide : bis-acrylamide (30 : 0.8 %)	3.33	ml
1.5 M Tris HCl buffer pH 8.9	2.50	ml
10 % เอสดีเอส	0.20	ml
10 % TEMED	0.02	ml
น้ำกลั่น	3.98	ml

นำสารละลายที่ได้ไปดูดอากาศออก (deair) หลังจากนั้นเติม

10 % $(NH_4)_2S_2O_8$	0.07	ml

นำสารละลายไปบรรจุลงในบล็อคทันที ปิดผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นจำนวนเล็กน้อย เพื่อให้หน้าเจลเรียบ

8. 4 % SDS-polyacrylamide gel (spacer gel)

Acrylamide : bis-acrylamide (30 : 0.8 %)	0.665	ml
0.5 M Tris HCl buffer pH 6.8	1.25	ml
10 % เอสดีเอส	0.2	ml
10 % TEMED	0.02	ml
น้ำกลั่น	2.955	ml
10 % $(NH_4)_2S_2O_8$	0.07	ml

9. 7 % Polyacrylamide gel (running gel) pH 8.9

Acrylamide : bis-acrylamide (30 : 0.8 %)	2.331	ml
1.5 M Tris HCl buffer pH 8.9	2.50	ml
10 % TEMED	0.02	ml
น้ำกลั่น	5.05	ml

นำสารละลายที่ได้ไปดูดอากาศออก (deair) หลังจากนั้นเติม

10 % $(NH_4)_2S_2O_8$	0.1	ml

10. 4 % Polyacrylamide gel (spacer gel) pH 6.8

Acrylamide : bis-acrylamide (30 : 0.8 %)	0.665	ml
0.5 M tris HCl buffer pH 6.8	1.25	ml
10 % TEMED	0.02	ml
น้ำกลั่น	2.955	ml
10 % $(NH_4)_2S_2O_8$	0.07	ml

11. 10 % SDS-Polyacrylamide gel pH 7.0

Acrylamide : bis-acrylamide (30 : 0.8 %)	3.33	ml
0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.0	5.0	ml
10 % TEMED	0.02	ml
10 % SDS	0.2	ml
น้ำกลั่น	1.35	ml

นำสารละลายที่ได้ไปดูดอากาศออกหลังจากนั้นเติม

10 % $(NH_4)_2S_2O_8$	0.1	ml

12. 7 % Polyacrylamide gel pH 7.0

Acrylamide : bis-acrylamide (30 : 0.8 %)	2.331	ml
0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.0	5.0	ml
10 % TEMED	0.02	ml
น้ำกลั่น	1.549	ml

นำสารละลายที่ได้ไปดูดอากาศออกหลังจากนั้นเติม

10 % $(NH_4)_2S_2O_8$	0.1	ml

13. Sample buffer for 10 % SDS-polyacrylamide gel pH 8.9

Glycerol	2.5	ml
0.5 M Tris HCl pH 6.8	0.5	ml
SDS	0.25	g
2-mercaptoethanol	1.25	ml
Bromophenol blue	0.001	g

14. Sample buffer for 7 % polyacrylamide gel pH 8.9

Glycerol	1.0	ml
0.5 M Tris HCl pH 6.8	1.0	ml
Bromophenol blue	0.001	g

15. Sample buffer for 10 % SDS-polyacrylamide gel pH 7.0

Glycerol	2.5	ml
0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.0	1.25	ml
2-mercaptoethanol	1.25	ml
SDS	0.25	g
Bromophenol blue	0.001	g

16. Sample buffer for 7 % polyacrylamide gel pH 7 %

Glycerol	2.5	ml
0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.0	0.25	ml
Bromophenol blue	0.001	g
น้ำกลั่น	2.25	ml

17. SDS-Electrophoresis buffer pH 8.3

Tris	1.212	g
Glycine	5.704	g
SDS	0.2	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200	ml

18. Electrophoresis buffer pH 8.3

Tris	1.212	g
Glycine	5.704	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200	ml

19. SDS-Electrophoresis buffer pH 7.0

0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0	100	ml
SDS	0.2	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200	ml

20. Electrophoresis buffer pH 7.0

0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0	100	ml
เติมน้ำกลั่น	100	ml

21. Coomassie Brilliant Blue R. Stain

Coomassie Brilliant Blue	0.4	g
Gracial acetic acid	14.0	ml
Methanol	9.3	ml
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม	200.0	ml

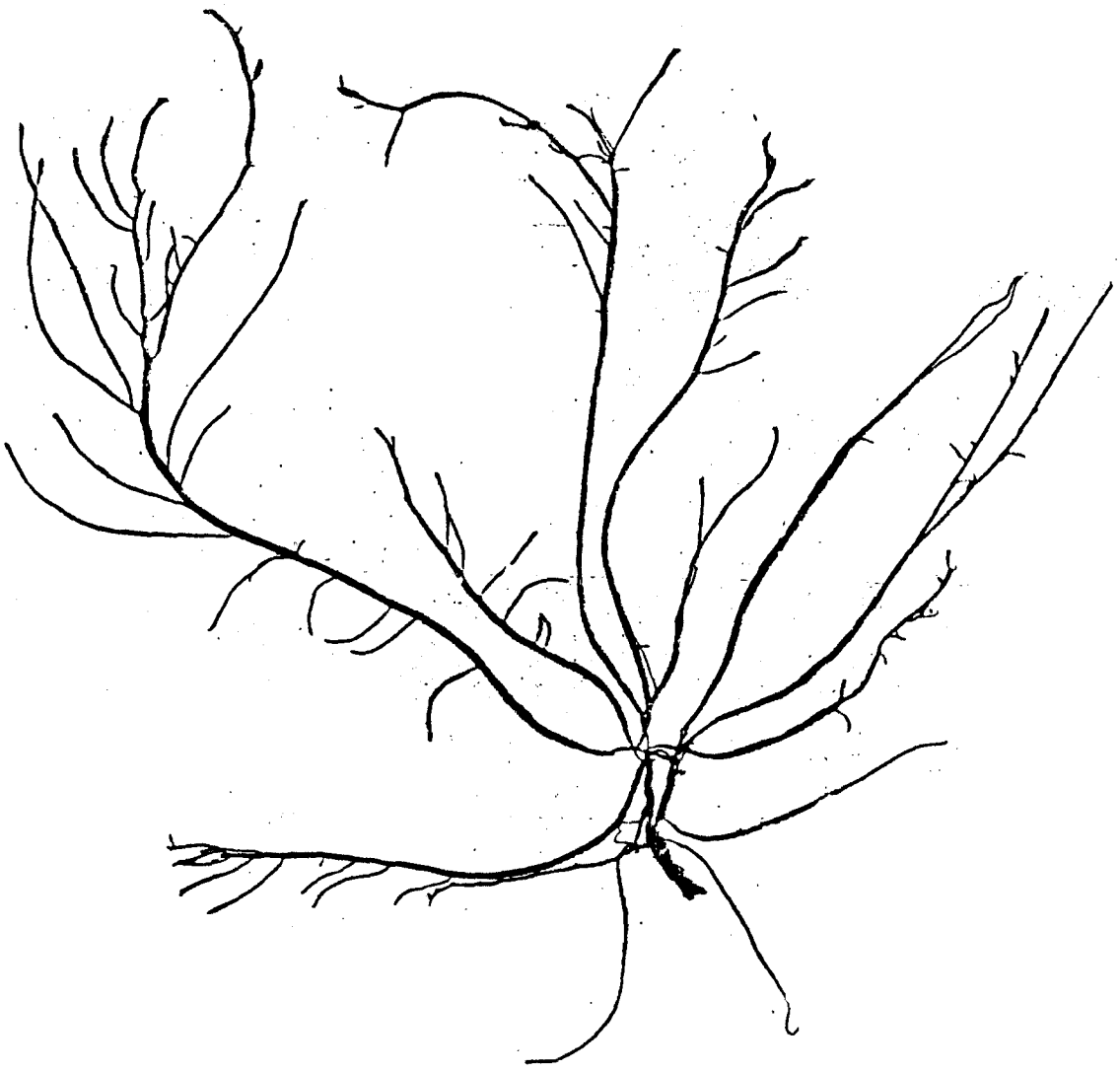
<u>การคำนวณค่า K_{av}</u>

$$k_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

เมื่อ V_o = void volume

V_t = total volume

V_e = elution volume



รูปร่างลักษณะของสาหร่าย **Gracilaria spp.**

การแยก อาร์-ไฟโคอิริทริน และอาร์-ไฟโคไซยานิน จากสาหร่ายสกุล กราซิลาเรีย ในแหลมหิน จังหวัดตราด

ปริญญานิพนธ์

ของ

นิยม ชลิตะนาวิน

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2531

การศึกษาครั้งนี้ได้แยกสาร อาร์-ไฟโคอิริทริน และอาร์-ไฟโคไซยานิน จากสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และดีอีเออี-เซลลูโลส คอลัมน์โครมาโทกราฟี จากการศึกษาพบว่า อาร์-ไฟโคอิริทริน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 495, 535 และ 565 นาโนเมตร มีค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ 574 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 175,000 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน และพบว่าประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 81,500 - 90,500, 38,000 - 41,000, 29,000 - 33,000 และ 18,000 - 19,000 ดาลตัน โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซีส สำหรับ อาร์-ไฟโคไซยานิน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 498, 570 และ 615 นาโนเมตร มีค่าการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์สูงสุดที่ 635 นาโนเมตร และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120,000 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน และตรวจพบหน่วยย่อยเพียง 1 หน่วย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 92,000 ดาลตัน ด้วยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซีส

ISOLATION OF R-PHYCOERYTHRIN AND R-PHYCOCYANIN FROM *Gracilaria spp.* IN LAEM HIN, CHANGWAT TRAD

AN ABSTRACT

BY

NIYOM CHALITANAWIN

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree

at Srinakharinwirot University

February 1988

R-phycoerythrin and R-phycocyanin were extracted from Gracilaria spp. by using ammonium sulphate precipitation and DEAE-cellulose column chromatography. The purified R-phycoerythrin had the maximum absorption at 495, 535 and 565 nm and its fluorescence emission spectrum was maximum at 574 mn. Its molecular weight was 175,000 daltons as determined by gel filtration. It had four subunits with molecular weight of 81,500 - 90,500, 38,000 - 41,000, 29,000 - 33,000 and 18,000 - 19.000 daltons as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The purified R-phycocyanin had the maximum absorption at 498, 570 and 615 nm and its fluorescence emission spectrum was maximum at 635 nm. The molecular weight was found to be 120,000 daltons as determined by gel filtration, but the only one subunit with molecular weight of 92,000 daltons was found by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.