

การตัดโปรตีนเอวิติน และสเตรปตาวิดินด้วยอนุพันธ์ของไฟรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง

ปริญญานิพนธ์

ของ

ปิ่นปิ่นท์ มะลัยแก้ว

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2553

การตัดโปรตีนเอวิติน และสเตรปตาเวิตินด้วยอนุพันธ์ของไฟรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง

ปริญญานิพนธ์

ของ

ปิ่นปิ่นท์ มะลัยแก้ว

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การตัดโปรตีนเอวิติน และสเตรปตาวิตินด้วยอนุพันธ์ของไฟรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง

บทคัดย่อ

ของ

ปิ่นปิ่นทร์ มะลัยแก้ว

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2553

ปิ่นปิ่นทร์ มะลัยแก้ว. (2553). การตัดโปรตีนเอวิดิน และสเตรปตาวิดินด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง. ปรินญาณพนธ์ วท.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรยุทธ ลีพรเจริญวงศ์.

เอวิดินและสเตรปตาวิดินเป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถจับกับโมเลกุลของไบโอตินได้ดี เนื่องจากค่าคงที่ในการจับของโปรตีนทั้งสองกับไบโอตินมีค่าสูง จึงได้สังเคราะห์เป็นอนุพันธ์ของไพรีน d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide (Py-biotin) และศึกษาการจับกับโปรตีน avidin และ streptavidin โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี จากการศึกษาพบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ความยาวคลื่น 342 นาโนเมตร ของ Py-biotin เลื่อนไปในทิศทางที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น ประมาณ 3 นาโนเมตร เมื่อจับกับโปรตีน ค่าการคายแสงจะลดลงเมื่อจับกับโปรตีน แสดงให้เห็นว่า ส่วนที่เป็นหมู่ไพรีนในโมเลกุล Py-biotin จะถูกป้องกันโดยโปรตีนเมทริกซ์ ผลการศึกษาการเข้าถึงอนุพันธ์ของไพรีน โดย hexamine cobalt(III) trichloride (CoHA) ในขณะที่จับอยู่กับโปรตีนพบว่า CoHA สามารถเข้าถึง Py-biotin ได้ดีกว่าในกรณีที่ Py-biotin จับกับโปรตีน avidin และ streptavidin เมื่อทำการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 343 nm ให้กับสารละลายผสมของ Py-biotin กับ โปรตีน เมื่อมี CoHA อยู่ด้วย พบว่าโปรตีน avidin ถูกตัดได้เพปไทด์ 2 สาย การตัดโปรตีนจะไม่เกิดขึ้นหากขาดสารตัวใดตัวหนึ่ง หรือแสง เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเพปไทด์ทั้ง 2 สาย พบว่า เพปไทด์สายที่ I และ II มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 9.57 และ 5.75 kDa ตามลำดับ จากการหาลำดับกรดอะมิโนที่ถูกตัดโดย Py-biotin พบว่าเอวิดินถูกตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Thr(77) – Val(78)

PHOTOCLEAVAGE OF AVIDIN AND STREPTAVIDIN BY A NEW PYRENYL PROBE

AN ABSTRACT

BY

PINPINAT MALAIKAEW

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

October 2010

Pinpinat Malaikaew. (2010). *Photocleavage of avidin and streptavidin by a new pyrenyl probe*. Master thesis. M.Sc. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assistant Professor Dr. Apinya Chaivisuthangkura, Assistant Professor Dr. Teerayuth Liwporcharoenwong.

Avidin and streptavidin are glycoproteins which bind very tightly to the small molecule, biotin. The binding constant for this interaction is very high and has made the strept(avidin)/biotin system the focus of our studies. A new probe, d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide (Py-biotin) was synthesized by coupling d-biotin to 1(1-pyrene)methylamine hydrochloride. This study focuses on specific binding of Py-biotin to strept(avidin) and photocleavage of strept(avidin). Binding studies of Py-biotin to strept(avidin) were investigated using spectroscopic techniques. The absorption spectra undergo changes upon binding to avidin with red shifts (3 nm) of the absorption peak positions. The fluorescence of Py-biotin is enhanced by the addition of avidin (0-10 μ M). This observation indicates the protection of pyrene chromophore from aqueous solution by the protein matrix. Irradiation of the probe-protein complexes, in the presence of hexamine cobalt(III) trichloride (CoHA), resulted in cleavage of the avidin backbone. At least two new fragments were observed with molecular weights of approximately 9.57 kDa and 5.75 kDa. The five N-terminal sequencing of the 9.57 kDa fragment indicated the residues ARKCS, the known N-terminal sequence of avidin. The N-terminus of the smaller cleaved fragment (5.75 kDa) had the sequence, ARKCS, and a minor product with the sequence, VFTGQ, a sequence internal to avidin. The cleavage thus occurs between Thr 77 and Val 78, as inferred from the known sequence of avidin.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การตัดโปรตีนเอวิติน และสเตรปตาวิตินด้วยอนุพันธ์ของไฟรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง

ของ
ปิ่นปิ่นท์ มะลัยแก้ว

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่..... เดือน..... พ.ศ. 2553

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ประธาน

..... ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร) (ดร.ปฐมพร อำนาจอนันต์)

.....กรรมการ

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ ลีพรเจริญวงศ์) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ ลีพรเจริญวงศ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยุโซ๊ะ ภูโน)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุน

จาก

คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้จัดสรรเงินทุนงบประมาณรายได้
ประจำปี 2553

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ ความช่วยเหลือความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ ลีพรเจริญวงศ์ คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนการแก้ปัญหาอันเกิดจากการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์นี้แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ ดร.ปฐมพร อำนาจอนันต์ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะยูโซ๊ะ ภูโน ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้และให้ความเมตตาเอาใจใส่แก่ผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ.ศ.2553 และขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณทุกๆ ท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอโน้มรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดาและญาติสนิททุกท่านที่ได้อบรมเลี้ยงดูและให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาแก่ผู้วิจัยตลอดมา และขอบพระคุณครู อาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทั้งหลายที่ได้เอื้อนามมา ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ปิ่นปิ่นท์ มะลัยแก้ว

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
ขั้นตอนของงานวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
หน้าที่และโครงสร้างของโปรตีน.....	4
อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	9
การหาลำดับกรดอะมิโน.....	16
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	16
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	23
การสังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของ Py-biotin	24
การศึกษาทางสเปกโทรสโกปี.....	25
การศึกษาการตัดโปรตีนเอวิดินโดยการกระตุ้นด้วยแสง และ	27
ตรวจสอบการตัดโปรตีนเอวิดินด้วยวิธี SDS-PAGE.....	
การย้ายโปรตีนโดย Western Blot (protein transfer)	29
4 ผลการวิจัย.....	31
การสังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของ Py-biotin.....	31
การศึกษาการ binding โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี.....	34
การศึกษาการตัดโปรตีน avidin และ streptavidin โดยการกระตุ้นด้วยแสงและ	44
ตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	
การย้ายโปรตีนโดย Western Blot (protein transfer) เพื่อหาลำดับกรดอะมิโน	48
5 สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	50

สารบัญ

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	54
อภิธานศัพท์.....	58

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ช่วงของโปรตีนที่ต้องการแยกโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	15
2 องค์ประกอบของ separating gel และ stacking gel.....	15
3 แสดงค่า binding constant (K_b) ของ Py-biotin เมื่อจับกับ avidin และ streptavidin.....	37
4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ fluorescence intensity ของ Py-biotin เมื่อจับกับ avidin และ streptavidin.....	40
5 แสดงค่า K_{sv} ของ Py-biotin เมื่อไม่มีและมีการจับกับ avidin และ streptavidin	43
6 การเตรียมปฏิกิริยาสารละลายผสม เพื่อศึกษาการตัดโปรตีน.....	44

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน	4
2 โครงสร้างไอโซเมอร์ D- และ L- ของกรดอะมิโน	5
3 คุณสมบัติของกรดอะมิโนพื้นฐาน 20 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน	6
4 การเกิดพันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโน	7
5 โครงสร้างทั้ง 4 แบบของโปรตีน	8
6 โครงสร้าง 3 มิติของ avidin และ streptavidin ที่จับกับโมเลกุลของ biotin	9
7 โครงสร้างของ อะคริลาไมด์ เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ และ N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)	10
8 ปฏิกริยาการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันของอะคริลาไมด์	11
9 โครงสร้างของไทรซิน	12
10 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ประกอบด้วย stacking gel และ separating gel	12
11 โครงสร้างของ SDS (A) การจับของ SDS กับกรดอะมิโนในโปรตีนทำให้โมเลกุลเหยียดยาวออก (B) โครงสร้างของ dithiothreitol (C) และ โครงสร้างของ 2-mercaptoethanol	13
12 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล (log M) กับอัตราเร็วในการเคลื่อนที่บนเจล	14
13 ปฏิกริยาของ Edman degradation	16
14 การออกแบบโมเลกุลเพื่อใช้ในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ	18
15 โครงสร้างอนุพันธ์ของแอนทราซีน (Anthracyl Derivatives)	18
16 โครงสร้างอนุพันธ์ของไพรีน (Pyrenyl Derivatives)	19
17 โครงสร้างของ Py-L-Phe และ Py-D-Phe	20
18 โครงสร้างของ Py-L-Phe และ PMA-L-Phe	21
19 โครงสร้างโมเลกุลของ D(+)-biotin	22
20 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ Py-biotin	25
21 การเตรียมอุปกรณ์สำหรับการย้ายโปรตีน	30

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
22 โครงสร้างของ d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide (Py-biotin)	31
23 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-biotin	32
24 กราฟมาตรฐาน Py-biotin	32
25 สเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin	33
26 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-biotin (4.19 μ M) / avidin (0-1.5 μ M)	34
27 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป ของ Py-biotin (4.19 μ M) ที่ความยาวคลื่น 342.5 nm และ 345.2 nm เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ avidin	34
28 Binding isotherm ของ Py-biotin ที่ได้จากข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในภาพประกอบ 26 เส้นที่บ่งชี้สัมพันธ์กับสมการของ Scatchard equation $[1/C_f = K_b((n/r)-1)]$	35
29 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-biotin (4.6 μ M) / streptavidin (0-1.7 μ M)	35
30 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป ของ Py-biotin (4.6 μ M) ที่ความยาวคลื่น 342.8 nm และ 345.7 nm เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ streptavidin	36
31 Binding isotherm ของ Py-biotin ที่ได้จากข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในภาพประกอบ 29 เส้นที่บ่งชี้สัมพันธ์กับสมการของ Scatchard equation $[1/C_f = K_b((n/r)-1)]$	36
32 สเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin ในกรณีที่จับอยู่กับโปรตีน avidin	38
33 แสดง fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปของ Py-biotin (2 μ M) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ avidin ที่ความยาวคลื่น 376 และ 396 นาโนเมตร	38
34 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin (2 μ M) ในกรณีที่จับอยู่กับ Streptavidin	39
35 แสดง fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปของ Py-biotin เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Streptavidin ที่ความยาวคลื่น 376 และ 396 นาโนเมตร	39
36 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin (2 μ M) ในกรณีที่ไม่ได้จับอยู่กับโปรตีน (free probe) ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm	40

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
37 แสดงกราฟระหว่าง I_0/I ต่อ [CoHA] โดยที่ I_0 เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin เมื่อไม่มี CoHA และ I เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin เมื่อมี CoHA ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm	41
38 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของ py-biotin ในกรณีที่จับอยู่กับโปรตีน avidin (1.8 μ M) ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm	41
39 แสดงกราฟระหว่าง I_0/I ต่อ [CoHA] โดยที่ I_0 เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin/avidin เมื่อไม่มี CoHA และ I เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin/avidin เมื่อมี CoHA ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm	42
40 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของ py-biotin (2 μ M) ในกรณีที่จับอยู่กับโปรตีน streptavidin ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm	42
41 แสดงกราฟระหว่าง I_0/I ต่อ [CoHA] โดยที่ I_0 เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin/ streptavidin เมื่อไม่มี CoHA และ I เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin/ streptavidin เมื่อมี CoHA ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm	43
42 แสดง SDS-PAGE ของการตัดโปรตีน avidin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง โดย Py-biotin	45
43 SDS-PAGE ของการตัดโปรตีน streptavidin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง โดย Py-biotin	46
44 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล (log M) ของของโปรตีนมาตรฐานกับ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่บนเจล	47
45 SDS-PAGE แสดงการยับยั้งการตัดโปรตีน avidin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง โดย biotin (15 μ M)	48
46 PVDF membrane ของ avidin ที่ผ่านการฉายแสง	49
47 กลไกที่เป็นไปได้ในการตัดโปรตีน avidin	52
48 ภาพ 3 มิติ ของ avidin-biotin binding site ใน avidin subunit	53

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันนี้ สารเคมีที่สามารถใช้ตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงมีน้อยมาก เนื่องจากพันธะเปปไทด์มีความเสถียรสูง (half life ~7 ปี ที่ 25 °C, pH 7) (Kahne; & Skill. 1988: 7529-7534) ดังนั้นจึงมีผู้วิจัยหลายท่านพยายามสังเคราะห์สารเคมีชนิดใหม่ที่มีขนาดเล็กและสามารถทำหน้าที่แทนเอนไซม์ในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะได้ นอกจากการตัดโปรตีนหรือเปปไทด์ขนาดใหญ่ให้เล็กลงเพื่อเป็นประโยชน์ในการหาลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequencing) แล้ว โมเลกุลเหล่านี้ยังสามารถทำหน้าที่เป็น probe ในการศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีน (protein structural domains) (Rana; & Meares. 1991: 1859-1861); (Ettner; et al. 1995: 22-31) และความสัมพันธ์ของ activity กับโครงสร้างของโปรตีน รวมทั้งการศึกษาถึงอันตรกิริยาของโมเลกุลขนาดเล็กกับโปรตีน (ligand-protein binding interaction) ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการออกแบบและผลิตยาชนิดใหม่ได้ในอนาคต (Hegg; et al. 1999 : 2961-2968)

การกระตุ้นให้เกิดการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะอาจทำได้ 2 ทางคือการใช้ปฏิกิริยาทางความร้อน (thermal reaction) (Buranaprapuk; et al. 1998: 309-316); (Kumar; et al. 2000: 597-598) และปฏิกิริยาทางแสง (photoreaction) ในการออกแบบโมเลกุล อาจทำได้โดยการสร้างโมเลกุลที่มีการจดจำเพาะต่อ binding site ของโปรตีน หรืออาจนำโมเลกุลมาเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนตัวใดตัวหนึ่งของโปรตีนเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะ เช่น การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนที่มี trifluoperazine (TFE) ต่อกับ iron(II) ethylenediamine (Fe(EDTA)) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน TFE-Fe(EDTA) เพื่อใช้ในการจับ calmodulin เนื่องจาก TFE สามารถจับกับ calmodulin ได้ที่ตำแหน่งจำเพาะ ดังนั้น TFE จะพาสารประกอบเชิงซ้อนไปที่ binding site ของ TFE ใน calmodulin จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อน จะถูกกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา โดยการเติม reducing agent และ H₂O₂ กลไกปฏิกิริยาเป็นแบบออกซิเดชัน (oxidative mechanism) เกิด hydroxyl radical (OH[•]) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนและทำให้เกิดการแตกของพันธะเปปไทด์จากการทดลองพบว่า calmodulin ถูกตัดได้ 6 เปปไทด์ย่อย แต่วิธีนี้ได้ผลิตผลของเปปไทด์ที่ถูกตัดในปริมาณที่ต่ำ (Schepartz; & Cuenoud. 1990: 3241-3249)

ตัวอย่างการออกแบบโมเลกุลอีกรูปหนึ่งคือ การนำสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe³⁺ เชื่อมติดกับกรดอะมิโน cystein-34 ของ bovine serum albumin (BSA) พบว่า BSA ถูกตัดในบริเวณที่มี

สารประกอบเชิงซ้อนติดอยู่ โดยอาศัยกลไกปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน และได้มีการนำวิธีเดียวกันนี้มาศึกษาถึงโครงสร้างของ *Staphylococcal nuclease* โดยเชื่อมสารประกอบเชิงซ้อนของ (Fe(EDTA-2-aminoethyl)-2-pyridyl disulfide (EPD-Fe) เข้ากับ cysteine สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาเป็นตัวสำคัญในการกำหนดบริเวณที่โปรตีนถูกตัด เช่นการใช้ Sodium dodecyl sulfate (SDS) หรือ denaturing reagent และบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ พบว่าบริเวณที่โปรตีนถูกตัดจะขึ้นกับโครงสร้างของโปรตีนที่สภาวะนั้น ซึ่งสามารถนำหลักการนี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงตัวกลางที่เกิดในสมดุลของการ folding (equilibrium folding intermediates) ของโปรตีนได้ แต่การตัดแปลงโปรตีนที่กรดอะมิโนจำเพาะจะทำให้ยาก (Rana; & Meares.1990: 2457-2458)

การใช้แสงในปฏิกิริยามีประโยชน์ ดังนี้ 1) สะดวกในการใช้ ราคาไม่แพงและอันตรายน้อย 2) ปฏิกิริยาสามารถควบคุมได้ง่าย (sharp control) โดยการเปิดและปิดแสง 3) ลดสารตั้งต้นตัวหนึ่งในการทำให้บริสุทธิ์ และ 4) การเลือกความยาวคลื่นที่จำเพาะในการกระตุ้นโมเลกุลให้เกิดปฏิกิริยาจะช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงได้

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. สังเคราะห์โมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ เช่น Py-biotin
2. ศึกษาปฏิกิริยาการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่กับโปรตีนเป้าหมาย ได้แก่ เอวิดิน (avidin) และสเตรปตาวิดิน (streptavidin)
3. ศึกษาปฏิกิริยาและกลไกการตัดโปรตีนโดยอนุพันธ์ไพรีน
4. พัฒนาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะอย่างมีประสิทธิภาพ

ความสำคัญของงานวิจัย

1. ทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมที่เกิดการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยอนุพันธ์ไพรีน Py-biotin
2. ทำให้ทราบถึงลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยอนุพันธ์ไพรีน เช่น Py-biotin
3. เป็นพื้นฐานสำหรับงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง และเพื่อการประยุกต์ใช้ในการออกแบบยาที่สามารถจับกับเอนไซม์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ขอบเขตของการวิจัย

1. สังเคราะห์โมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ เช่น Py-biotin
2. ศึกษาการจับของโปรตีน avidin และ streptavidin กับอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ โดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี
3. ศึกษาการตัดของโปรตีนและตรวจสอบผลการตัดของโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
4. หาลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จากการตัดของโปรตีน

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. สังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่
2. ศึกษาการจับระหว่าง avidin และ streptavidin กับอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่
3. ศึกษาการยับยั้งการคายแสงของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ เมื่อมีตัวยับยั้งการคายแสง (quencher)
4. ศึกษาการตัดโปรตีนโดยการกระตุ้นด้วยแสง
5. หาลำดับกรดอะมิโนของสายพอลิเพปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

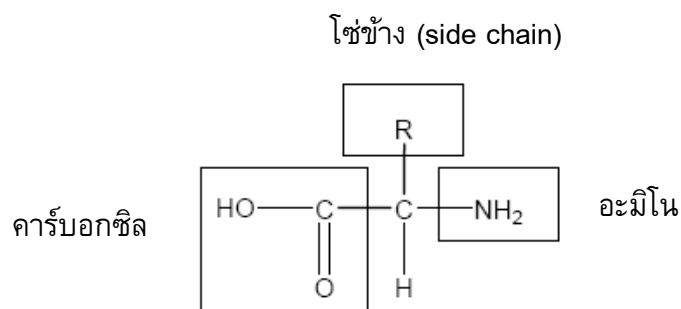
ในงานวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการตัดโปรตีน avidin และ streptavidin ด้วยอนุพันธ์ของไฟรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง ผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

1. หน้าที่และโครงสร้างของโปรตีน
 - 1.1 กรดอะมิโน
 - 1.2 โครงสร้างของโปรตีน
2. อิเล็กโทรโฟรีซิส
3. การหาลำดับกรดอะมิโน
4. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. หน้าที่และโครงสร้างของโปรตีน

1.1 กรดอะมิโน

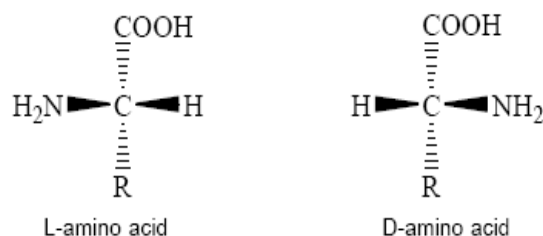
กรดอะมิโน (amino acid) คือ ชีวโมเลกุลที่มีทั้งหมู่ฟังก์ชันอะมิโน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิล ($-COOH$) เป็นส่วนประกอบ (ภาพประกอบ 1) กรดอะมิโนเป็นโครงสร้างพื้นฐานของโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด หมู่ "R" แทน โซ่ข้าง (side chain) หรือหมู่ฟังก์ชัน ซึ่งมีความเฉพาะสำหรับกรดอะมิโนแต่ละตัว



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างพื้นฐานของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนทุกชนิดยกเว้นไกลซีนสามารถเกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบคือ รูปแบบ L (Levorotatory) และ รูปแบบ D (Dextrorotatory) (ภาพประกอบ 2) โดยทั่วไปการสังเคราะห์โปรตีนในธรรมชาติใช้กรดอะมิโนชนิด L หมู่ R หรือ side chain ของกรดอะมิโน จะมีขนาดรูปร่าง ประจุและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ทำให้กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกัน กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างง่ายและ

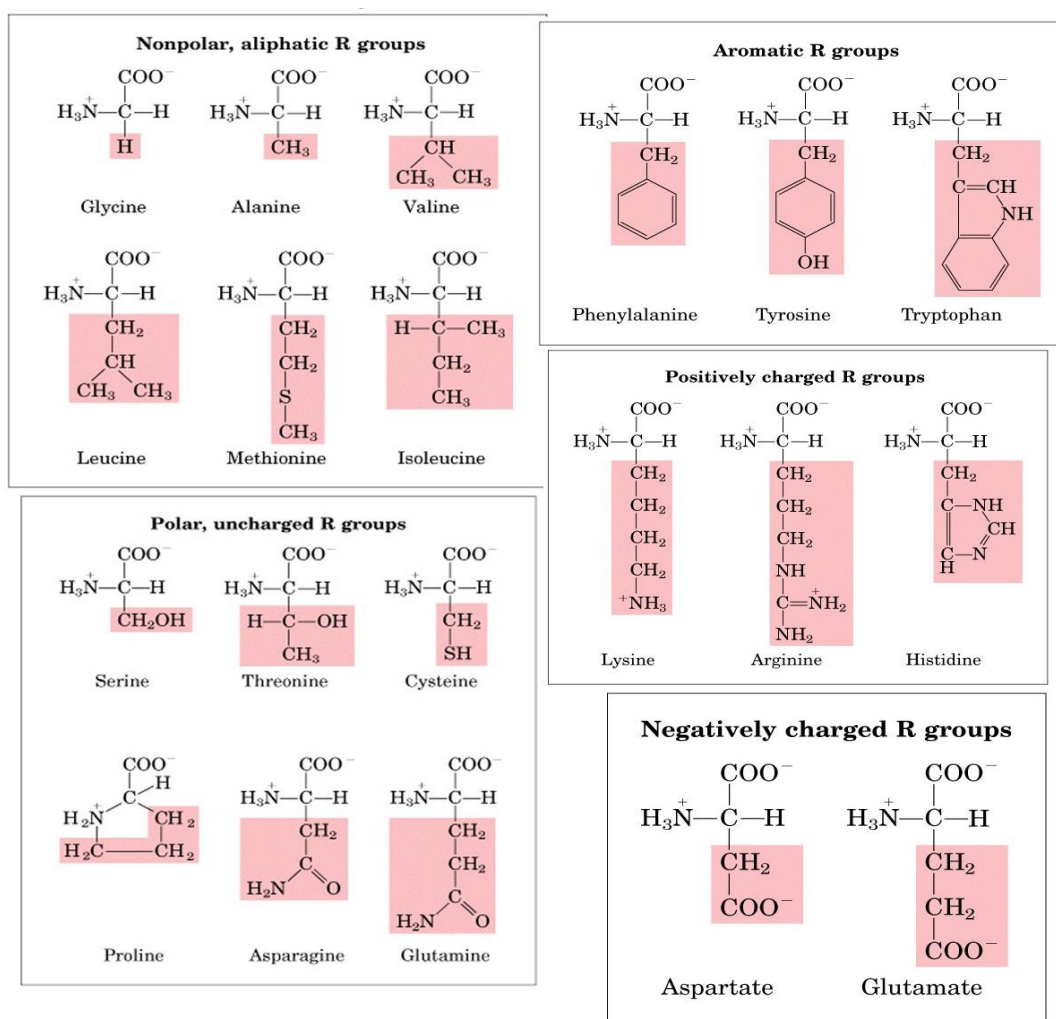
เล็กที่สุดคือ ไกลซีน (glycine) โดยมีไฮโดรเจนเป็น side chain กรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมาคือ อะลานีน (alanine) โดยมีหมู่เมทิล (CH_3) เป็น side chain



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างไอโซเมอร์ D- และ L- ของกรดอะมิโน

กรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่มตามความมีขั้วของหมู่ R ที่ pH 6.0-7.0 (ช่วง pH ที่พบภายในเซลล์) ดังภาพประกอบ 3

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



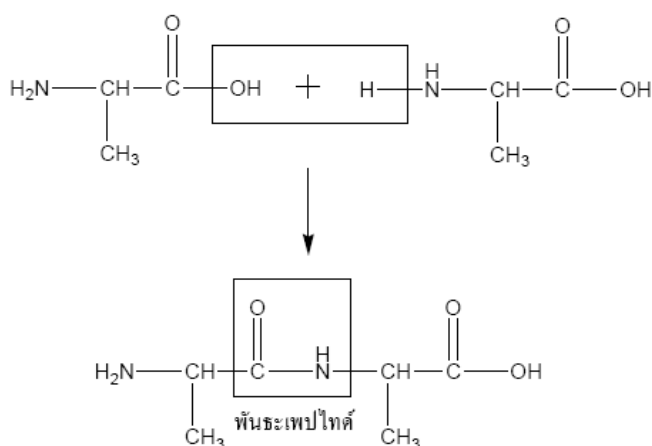
ภาพประกอบ 3 คุณสมบัติของกรดอะมิโนพื้นฐาน 20 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน
ที่มา: Nelson; et al . (2008). *Principle of Biochemistry*. p.75.

ในบรรดากรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิดนั้น ไกลซีนมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุด (75 ดาลตัน) เนื่องจากหมู่ R มีเพียงอะตอมของไฮโดรเจน ส่วนกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) มีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุด (204 ดาลตัน) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของกรดอะมิโนมีค่าอยู่ระหว่าง 100 -110 ดาลตัน

1.2 โครงสร้างของโปรตีน

โปรตีนประกอบไปด้วยสายพอลิเพปไทด์อย่างน้อย 1 สาย ที่มีลำดับกรดอะมิโนเฉพาะตัว หมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวหนึ่งจะเชื่อมกับหมู่เอมิโนของกรดอะมิโนตัวถัดไปด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ดังภาพประกอบ 4 ปลายสายของพอลิเพปไทด์ที่มีหมู่เอมิโนอิสระ (ทางด้านซ้ายของสายพอลิเพปไทด์) เรียกว่า amino terminal หรือปลาย N (N-terminal) ส่วนปลายสายของพอลิเพปไทด์ ที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระ (ทางด้านขวาของสายพอลิเพปไทด์) เรียกว่า carboxyl terminal หรือปลาย C (C-terminal) ลำดับของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ หรือโปรตีนเรียกว่า

โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) สายพอลิเพปไทด์มีความยาวแตกต่างกันไป โดยทั่วไปมีความยาวตั้งแต่ 50 -1000 หน่วย (ภาพประกอบ 5(a))

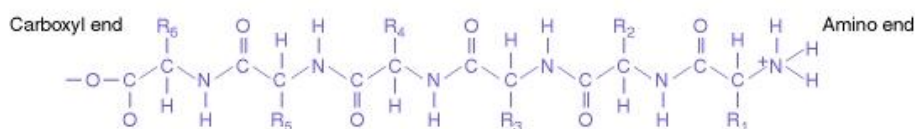
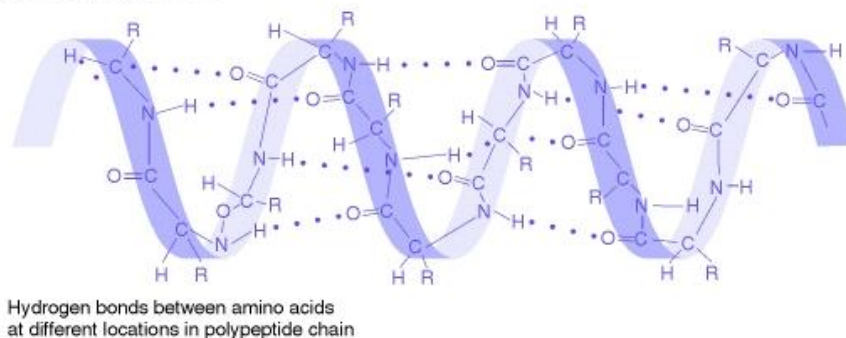
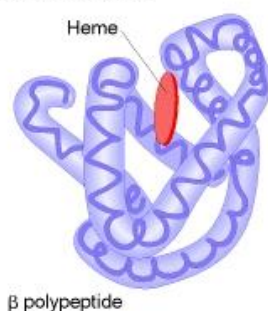
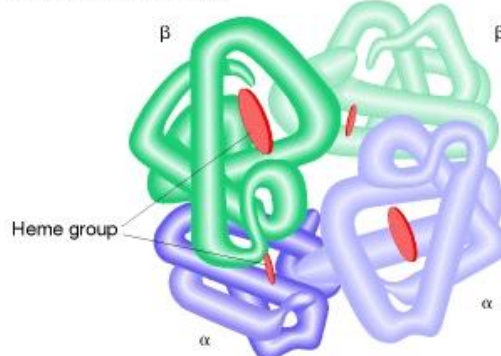


ภาพประกอบ 4 การเกิดพันธะเพปไทด์ของกรดอะมิโน

โดยทั่วไปสายพอลิเพปไทด์ มักไม่อยู่ในสภาพที่เป็นเส้นตรง แต่มักอยู่ในรูปแบบ (conformation) หรือโครงสร้างที่เรียกว่า โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ได้แก่ โครงสร้างเกลียวแอลฟา (α -helix) (ภาพประกอบ 5(b)) และแผ่นเบต้า (β -sheet) โปรตีนบางชนิด เช่น ฮีโมโกลบิน ไมโอโกลบิน และคอลลาเจน ประกอบด้วยเกลียวแอลฟาเป็นจำนวนมาก (ภาพประกอบ 5(c)) ในขณะที่ ทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) เกือบจะไม่มีโครงสร้างเกลียวแอลฟาเลย ในบางครั้งเกลียวแอลฟา 2 สาย หรือมากกว่า อาจพันเกลียวกันขึ้นไปเป็น coiled cable ซึ่งพบในโปรตีนหลายชนิด เช่น เคอราติน (keratin) ในเส้นผม ไมโอซิน (myosin) ในกล้ามเนื้อ อีพิดเอร์มิน (epidermin) ในผิวหนัง และ ไฟบริน (fibrin) ในเลือดที่แข็งตัว

โครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนที่เรียกว่า โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เกิดจากการม้วนพับตัวของเกลียวแอลฟาและแผ่นเบต้าเป็นโครงสร้าง 3 มิติ (ภาพประกอบ 5(c)) โดยอาศัยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (โดยทั่วไปมักเป็นพันธะไฮโดรเจน) ในกระบวนการพับตัวนั้น กรดอะมิโนที่มีหมู่ R ที่ไม่ชอบน้ำมักจะอยู่ด้านในโมเลกุลของโปรตีน ในขณะที่หมู่ R ที่ชอบน้ำมักจะอยู่ภายนอก แรงอีกชนิดหนึ่งที่มีผลต่อโครงสร้าง 3 มิติ คือแรงดึงดูดระหว่างกรดอะมิโนในที่มีขั้วบวกและกรดอะมิโนที่มีขั้วลบ เรียกว่า salt bridge โดยแรงดึงดูดนี้จะทำให้กรดอะมิโนทั้ง 2 กลุ่มมาอยู่ใกล้กัน

โปรตีนบางชนิดอาจประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์มากกว่า 1 สาย เช่น ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์ 4 สาย โดยมี α -globin 2 สาย และ β -globin 2 สาย มีการเรียงตัวของหน่วยย่อย (subunit) เหล่านั้นเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ (quarternary structure) โดยอาศัยแรงดึงดูดระหว่างขั้วและพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดความเสถียรของโครงสร้างนี้

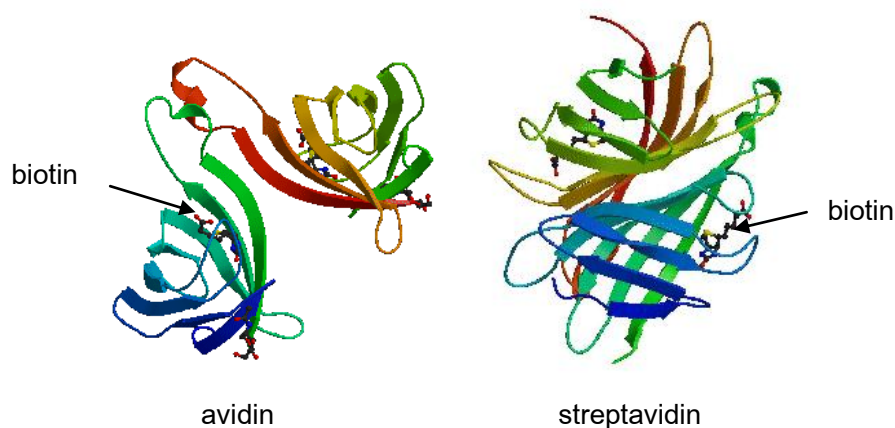
(a) Primary structure**(b) Secondary structure****(c) Tertiary structure****(d) Quaternary structure**

ภาพประกอบ 5 โครงสร้างทั้ง 4 แบบของโปรตีน

ที่มา: Protein structure . (2010). (online).

avidin และ streptavidin เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างจตุรภูมิ (ภาพประกอบ 6) ซึ่ง avidin เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีมวลโมเลกุล ประมาณ 66,000-67,000 ดาลตัน พบได้ในไข่ขาว เนื้อเยื่อของนก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ avidin ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 4 หน่วยย่อยมารวมตัวกัน แต่ละหน่วยย่อยประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 128 ชนิดเรียงต่อกัน และสามารถจับกับโมเลกุลของไบโอตินได้ 1 โมเลกุล avidin มีค่า isoelectric point (pI) ประมาณ 10-10.5 จึงมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิในช่วงที่กว้าง ส่วน streptavidin จะคล้ายกับ avidin แต่มีมวลโมเลกุล 60,000 ดาลตัน แยกได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces avidinii* แต่ละหน่วยย่อยประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 159 ชนิด streptavidin มีค่า isoelectric point (pI) เป็นกรดอ่อนๆ ประมาณ 5 และเนื่องจากว่า binding constant ของ biotin-avidin และ biotin-streptavidin มีค่าสูง

ถึง $\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$ จึงทำให้ปฏิกิริยาระหว่าง biotin-avidin และ biotin-streptavidin มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย



ภาพประกอบ 6 โครงสร้าง 3 มิติของ avidin และของ streptavidin ที่จับกับโมเลกุลของ biotin
ที่มา: Panhorst, M . (2005). (online).

2. อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสาร วิเคราะห์ และเตรียมสารที่มีประจุไฟฟ้าให้บริสุทธิ์ เช่น กรดอะมิโน โปรตีน และ กรดนิวคลีอิก โดยสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วตรงกันข้ามด้วยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ต่างกัน ซึ่งอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร รูปร่างและขนาดของโมเลกุลของสารนั้น และ กระแสไฟฟ้าที่ใช้

อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสารแสดงด้วยสมการดังนี้ $V = E \cdot q / f$

โดยที่ V = ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุล

E = ความเข้มของสนามไฟฟ้า

q = ประจุสุทธิบนโมเลกุล

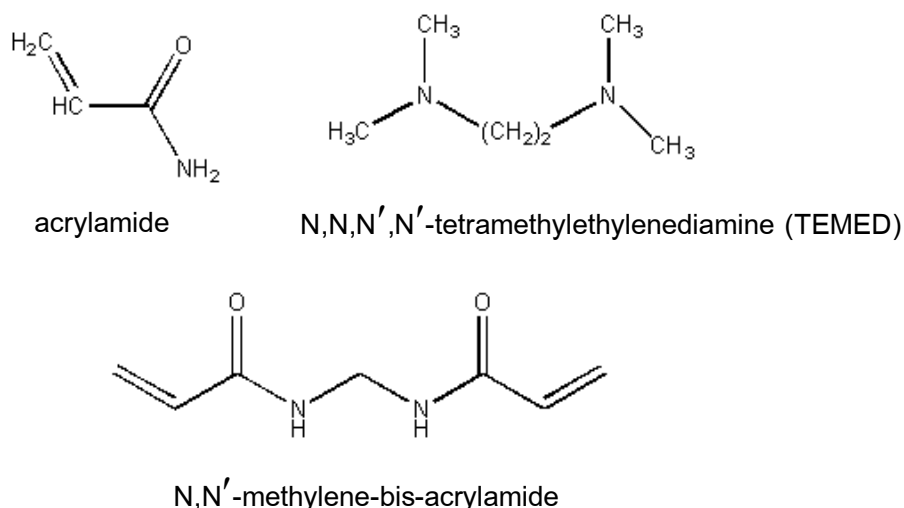
f = frictional coefficient ขึ้นอยู่กับน้ำหนักและรูปร่างโมเลกุล

การเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า แสดงโดยเทอมของการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า (u) ซึ่งหมายถึงความเร็วต่อหน่วยของความเข้มของสนามไฟฟ้า ซึ่งขึ้นตรงกับอัตราส่วนประจุ/มวล

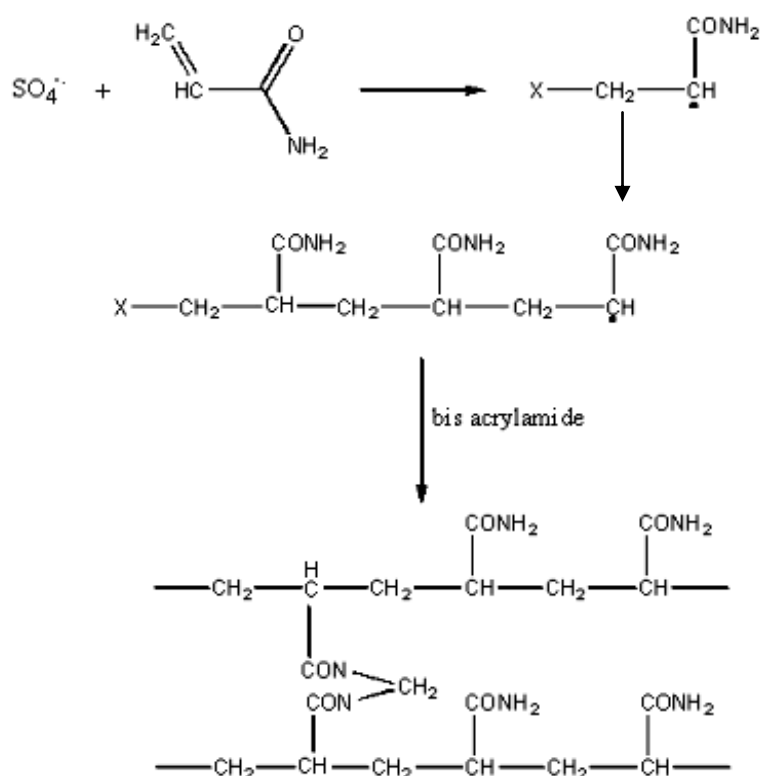
$$u = v/E = E \cdot q / F \cdot E \quad \text{เมื่อ } V = E \cdot q / f \quad u = q / f$$

ในการแยกสารชีวโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสส่วนใหญ่ทำโดยใช้เจลเป็นตัวกลาง เจลที่ใช้เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ ตัวอย่างเช่น อะกาโรส และพอลิอะคริลาไมด์ เป็นต้น

ในการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าหรือที่เรียกว่า อิเล็กโตรโฟรีซิส นิยมใช้เจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) โดยเจลพอลิอะคริลาไมด์เตรียมได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) แบบสายตรงของอะคริลาไมด์ (acrylamide) และแบบระหว่างสาย (cross-link) โดยใช้เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ (methylenebisacrylamide) (ภาพประกอบ 7) ซึ่งเจลที่ได้จากเจลพอลิเมอร์ไรเซชัน จะเป็นแผ่นบางๆ และมีรูพรุน ขนาดของรูพรุนจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ และเมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ที่ใช้ การเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันทำได้ โดยการเติมตัวเร่งปฏิกิริยาที่นิยมใช้คือ N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) ซึ่งจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ของซัลเฟต ($\text{SO}_4^{\cdot-}$) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) ที่เติมลงในสารละลายเจล ดังภาพประกอบ 8

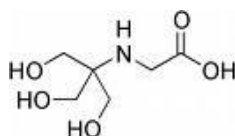


ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของอะคริลาไมด์ เมทิลีนบิสอะคริลาไมด์ และ N,N,N',N' tetramethylethylenediamine (TEMED)



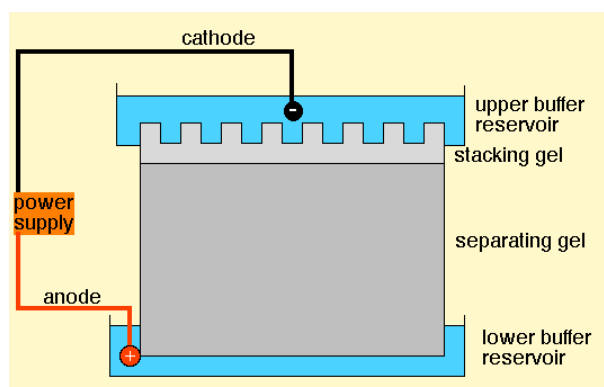
ภาพประกอบ 8 ปฏิกิริยาการเกิดพอลิเมอร์เชนของอะคริลาไมด์

การประกอบเจลเข้ากับอุปกรณ์ 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) เมื่อประกอบอุปกรณ์ตั้งรูปแล้วจึงต่อขั้วทั้งสองเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะมีทิศทางจากบนลงล่าง บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าคือ Tris-HCl (tris hydroxyl methyl) aminomethane ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) ซึ่งมีส่วนผสมของไทรซีน (tricine) อยู่ด้วย (ภาพประกอบ 9) เรียกวิธีการแยกโปรตีนด้วยวิธีนี้ว่า Tricine-SDS-PAGE โดยวิธีนี้จะใช้ในการแยกโปรตีนหรือพอลิเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก (1-100 kDa) ได้ดีกว่าวิธี Glycine-SDS-PAGE และใช้เปอร์เซ็นต์ของอะคริลาไมด์ที่ต่ำกว่าวิธี Glycine-SDS-PAGE



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของไทรซีน

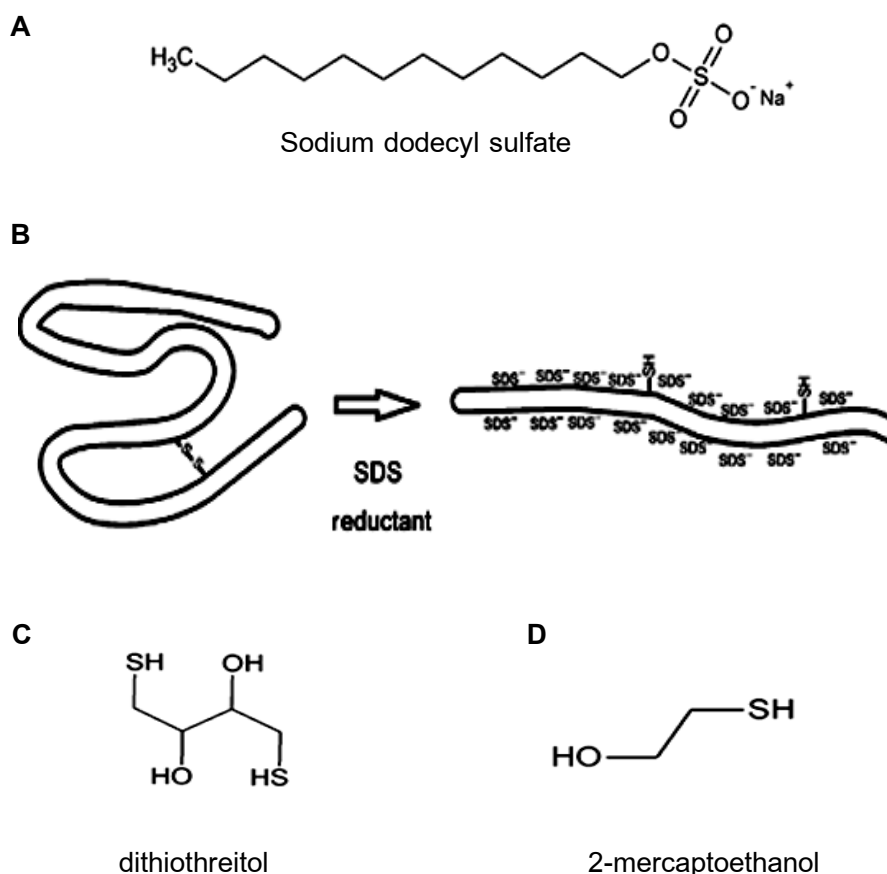
สำหรับการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าจะกระทำภายใต้ระบบที่ไม่ต่อเนื่อง (discontinuous system) เพื่อให้มีความคมชัดของแถบโปรตีนดีขึ้น วิธีนี้ประกอบด้วยเจล 2 ช่วง เจลช่วงบนเรียก stacking gel (บางครั้งเรียก spacer gel) มี pH 6.9 ซึ่งใน stacking gel จะประกอบไปด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยที่ Tris มีค่า pK_a เท่ากับ 8.3 ที่ $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ และเจลช่วงล่างเรียกว่า resolving gel หรือ separating gel มี pH $\sim 8-9$ ในช่วงของ stacking gel จะมีความเข้มข้นของ polyacrylamide ต่ำ (4%) จะมี ionic strength ต่ำ และมี pH ที่ เป็นกลาง ในทางตรงกันข้าม resolving gel จะมีความเข้มข้นของ polyacrylamide สูงกว่า (8-20%) มี ionic strength สูง และมี pH ที่ เป็นด่าง resolving gel จะทำให้เกิดการแยกกันของโปรตีนตัวอย่าง ดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ประกอบด้วย stacking gel และ resolving gel ที่มา: Lipoprotein Analysis. (2008). (online).

เนื่องจากโปรตีนแต่ละชนิดมีประจุสุทธิต่างกัน ดังนั้นประจุของโปรตีนจึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีน การแยกโปรตีนจึงมักทำในสภาพที่โปรตีนถูกทำให้เสียสภาพ โดยการเติม SDS (ภาพประกอบ 11 (A)) ลงในบัฟเฟอร์ โดย SDS จะจับกับกรดอะมิโนในโปรตีน ในอัตราส่วนของ 1 โมเลกุลของ SDS ต่อกรดอะมิโน 2 ตัวโดยประมาณ จึงเรียกรวีส่ววิเคราะห์นี้ว่า SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดังนั้นโครงสร้างจตุรภูมิ ตติยภูมิ และทุติยภูมิ ของโปรตีนจะถูกทำลาย เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน SDS-พอลิเพปไทด์ (SDS-polypeptide complex) ซึ่งมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) เนื่องจากสายโซ่พอลิเพปไทด์ จะคลายการม้วนออกเป็นสายยาว เมื่อถูกจับด้วย SDS และประจุลบบน SDS จะทำให้ประจุสุทธิบนโปรตีนเป็นลบ (ภาพประกอบ 11 (B)) จึง

ทำให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือ เคลื่อนที่เข้าหาขั้วทางขั้วบวก (anode) ดังนั้นการแยกโปรตีนบนเจลจะขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลโปรตีนโดยไม่มีผลของประจุและรูปร่าง เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งเราสามารถนำเทคนิค SDS-PAGE มาใช้ในการหามวลโมเลกุลของโปรตีนและพอลิเพปไทด์โดยประมาณได้



ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของ SDS (A) การจับของ SDS กับกรดอะมิโนในโปรตีนทำให้โมเลกุลเหยียดยาวออก (B) โครงสร้างของ dithiothreitol (C) และโครงสร้างของ 2-mercaptoethanol (D) ที่มา: Gallagher, S. R. (2008). (online).

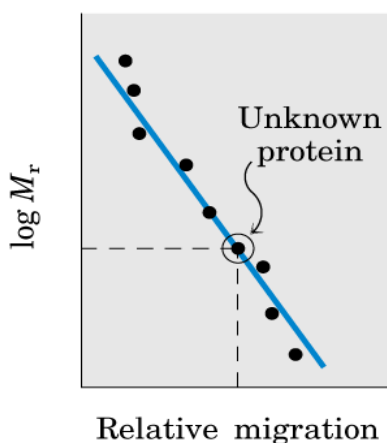
สารผสมที่ต้องการแยกและหามวลโมเลกุลต้องถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ โดยให้ความร้อนที่ 100 °C อย่างน้อย 3 นาที ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี SDS ปริมาณมากเกินไป และมีตัวรีดิวซ์ (reducing agent) ซึ่งจะทำให้เกิดการละลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ในโปรตีน ทำให้พันธะไดซัลไฟด์แยกออกจากกันโดย เปลี่ยนเป็นหมู่ sulfhydryl (SH) พันธะไดซัลไฟด์จะเกิดจากการจับกันของ cysteine ในโปรตีน ส่วน reducing agent ที่นิยมใช้ในการสลายพันธะไดซัลไฟด์ คือ 2-mercaptoethanol (หรือ β-mercaptoethanol) (ภาพประกอบ 11 (D)) และ dithiothreitol (DTT) (ภาพประกอบ 11 (C)) นอกจากนี้ยังมีการเติม bromophenol blue ลงในสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อเป็น tracking dye หลังจากให้ความร้อนสารตัวอย่างโปรตีนแล้ว ต้องปล่อยให้

สารตัวอย่างเป็นที่ยึดเหนี่ยวที่ห้อง ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์โปรตีนหรือพอลิเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงเคลื่อนที่ในระยะทางที่มากกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ในเวลาเท่ากัน

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

$$\log M = a - bx$$

โดยที่ a และ b เป็นค่าคงที่ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะของเจลที่ใช้ และ x คืออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายพอลิเพปไทด์ เมื่อเขียนกราฟระหว่าง logarithm ($\log M$) ของมวลโมเลกุล กับอัตราเร็วในการเคลื่อนที่บนเจลจากการใช้โปรตีนมาตรฐาน ทำให้สามารถสร้างเส้นกราฟมาตรฐาน ซึ่งเป็นกราฟเส้นตรงดังภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล ($\log M$) กับอัตราเร็วในการเคลื่อนที่บนเจล

ที่มา : David; & Cox. (2008). *Principle of Biochemistry*. p.90.

ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ที่ใช้ จะขึ้นกับมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการแยก ช่วงของมวลโมเลกุล ของโปรตีนและความเข้มข้นของอะคริลาไมด์แสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ช่วงของโปรตีนที่ต้องการแยกโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

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: อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร. (2552): เคมีเชิงฟิสิกส์และการประยุกต์ใช้ในงานวิจัย. หน้า 96.

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

ตาราง 2 องค์ประกอบของ separating gel และ stacking gel

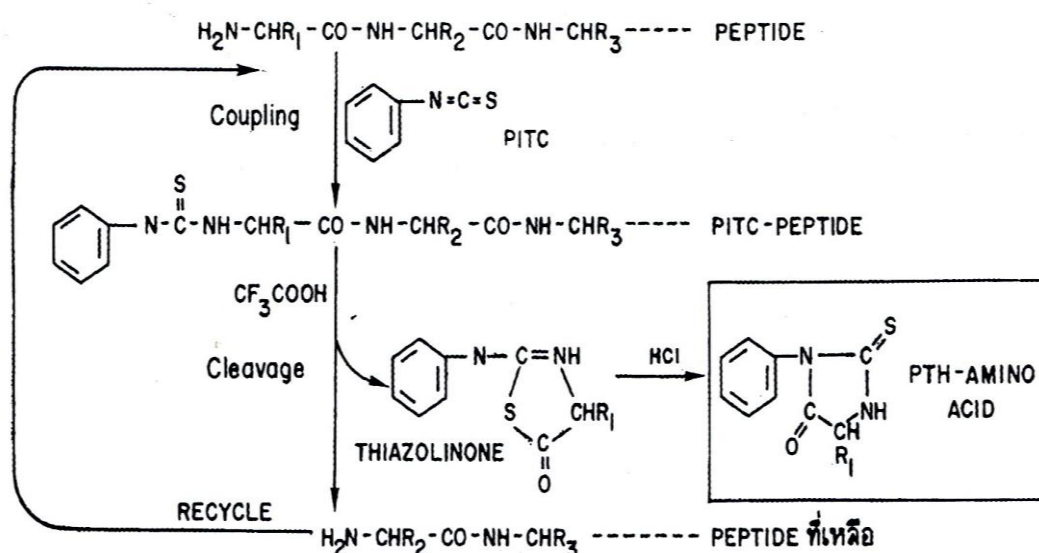
	stacking gel	separating gel
	4% T, 3%C	10% T, 3%C
Acrylamide /bisacrylamide solution (49.5% T, 3%C)	0.125 ml	0.76 ml
Gel buffer	0.39 ml	1.25 ml
80 % Glycerol	-	0.625 ml
Deionized water	1.05 ml	1.11 ml
10% ammonium persulphate	13.75 μ l	18.75 μ l
TEMED	1.38 μ l	1.88 μ l

ที่มา: Shangger; & Jagow. (1987). *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. p.368-379

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

3. การหาลำดับกรดอะมิโน (Amino acid sequencing)

วิธีการหาลำดับกรดอะมิโนที่นิยมกันวิธีหนึ่ง คือวิธี Edman degradation โดยที่หมู่เอมีนที่ปลาย N (N-terminal) ของโปรตีนหรือพอลิเพปไทด์จะถูกติดฉลาก (label) ด้วยโมเลกุลของ phenylisothiocyanate (PITC) เกิดเป็นอนุพันธ์ phenylthiocarbamoyl ในสภาวะกรดที่อ่อน เช่น trifluoroacetic acid (TFA) จะเกิดสารประกอบเป็นวง (cyclic compound) ของ phenylthiohydantoin (PTH)-amino acid หลุดออกจากสายเพปไทด์ ทำให้สายเพปไทด์สั้นลง 1 กรดอะมิโน (ภาพประกอบ 13) และทำการวิเคราะห์ PTH-amino acid ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี (HPLC) เทียบกับ PTH-กรดอะมิโนมาตรฐาน ส่วนสายเพปไทด์ที่เหลือสามารถนำกลับไปทำปฏิกิริยาใน cycle ต่อไปเพื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนตัวต่อไปตามลำดับ ทำให้ทราบลำดับของกรดอะมิโนบนสายเพปไทด์ได้



ภาพประกอบ 13 ปฏิกิริยาของ Edman degradation

ที่มา : มนตรี จุฬาววัฒนทอล; และคนอื่นๆ. (2542) ชีวเคมี. หน้า 103.

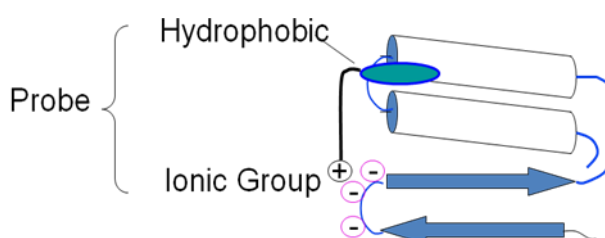
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ได้มีการพัฒนาโมเลกุลที่ใช้ตัดโปรตีนโดยใช้ทั้งปฏิกิริยาทางความร้อน (thermal reaction) และปฏิกิริยาทางแสง (photoreaction) ตัวอย่างรายงานที่มีการใช้ปฏิกิริยาทางความร้อน เช่น

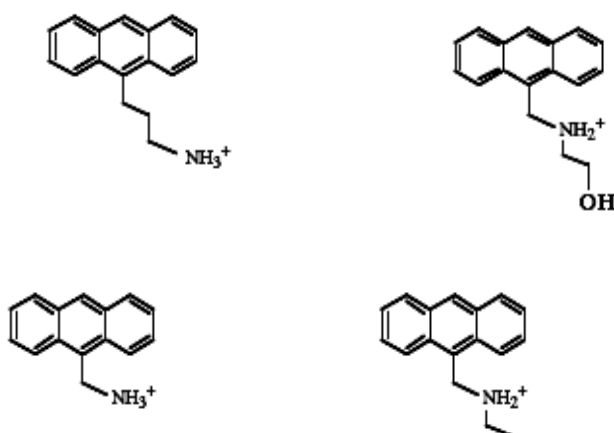
เซไรเกท และคนอื่นๆ (Sereikaite; et al. 2006: 369-378) ได้มีการศึกษาการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยใช้โลหะไอออนในสถานะที่มี ascorbic acid (ASC) และ oxidizing agent เช่น O_2 หรือ H_2O_2 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการตัดโปรตีน พบว่าในระบบ Fe^{3+}/Fe^{2+} -ASC สามารถตัดโปรตีนได้ 4 ชนิด คือ bovine serum albumin (BSA), lysozyme, Ovalbumin, α -casein และ β -casein ระบบ Cu^{2+}/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 polimerase I และ protein UK-114 สำหรับ Pd^{2+} ion สามารถตัดโปรตีนได้ 2 ชนิด (α -casein และ β -casein) โปรตีนส่วนใหญ่ถูกตัดเพียงเล็กน้อย ซึ่งมีเหตุผลที่เป็นไปได้ 2 ประการ ที่ทำให้โปรตีนยังคงเสถียร ด้านการถูกตัดโดยออกซิเดชัน ประการแรก แม้ว่าจะไม่มีการจับหรือเกิดการจับที่ตำแหน่งจำเพาะของโปรตีน ภายใต้สภาวะที่เกิดการออกซิเดชันที่ช้าจะทำให้ไอออนของโลหะถูกปล่อยออกจากตำแหน่งที่จับ และประการที่สอง hGH จะถูกตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ 2 ตำแหน่ง โดยระบบ Cu^{2+}/Cu^+ -ASC จะมีอย่างน้อยที่สุดหนึ่ง amino acid residue ของโปรตีน ถูกตัดแปลง โดยการเกิด reactive carbonyl

ตัวอย่างรายงานที่มีการใช้แสงในการตัดโปรตีน โดยใช้โมเลกุลสังเคราะห์เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่รับแสง เช่น มาร์ตตะ และคนอื่นๆ (Maruta; et al. 1998: 557-564) พบว่าการใช้วานาเดต (vanadate) ในการหา binding site สำหรับฟอสเฟตในโปรตีน โดยที่ vanadate จะมีประจุเหมือนฟอสเฟต จึงเกิดการแข่งขันที่จะจับกับโปรตีน หลังจาก vanadate ได้รับพลังงานแสง (ที่ 366 nm) พันธะหลังหมู่ serine ในโปรตีนจะถูกตัด ถึงแม้ว่าการตัดจะจำเพาะที่ serine แต่จะพบว่ามี การตัดที่กรดอะมิโนตัวอื่นด้วย นอกจากนี้ vanadate จะอยู่ในรูปสมมูลของโอลิโกเมอร์ (oligomers) ทำให้ยากในการศึกษาถึงกลไก และเนื่องจาก vanadate มีค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (absorption extinction coefficient) ที่ต่ำในช่วงความยาวคลื่นมากกว่า 320 nm จึงต้องใช้ความเข้มข้นสูงในการดูดกลืนแสงให้เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีและการประยุกต์ใช้กับโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่จับกับฟอสเฟตเป็นไปได้อย่างจำกัด ดังนั้นการพัฒนาเพื่อหาโมเลกุลใหม่ที่สามารถจับกับโปรตีนได้ดี และสามารถตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงจึงได้รับความสนใจ

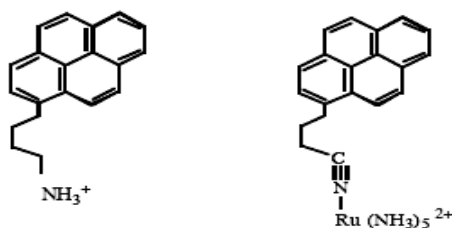
ในระยะแรก กุมาร์ และคนอื่นๆ (Kumar; et al. 1993: 13914-13919) ได้มีการสังเคราะห์อนุพันธ์ของแอนทราซีน (Anthracyl Derivatives) เช่น 9-anthryl-methylamine hydrochloride (AMAC) หรือ 3-(9-anthryl)propylamine hydrochloride (APAC) และอนุพันธ์ของไพรีน (Pyrenyl Derivatives) เช่น 4(1-pyrenyl) butyramine chloride (PBAC) ศึกษาการจับกับดีเอ็นเอ (DNA) และโปรตีน เช่น BSA calmodulin และ lactoglobulin พบว่าอนุพันธ์ของแอนทราซีน สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ดี โดยการแทรกเข้าไประหว่างสายของ DNA (intercalation) ในขณะที่ PBAC จับกับโปรตีนด้วย binding constant ที่สูง โดยการจับของ PBAC จะเลือกจับตรงบริเวณที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ที่อยู่ใกล้กับหมู่ที่มีประจุ (ionic) ในโปรตีนซึ่งจะทำให้การเลือกจับมีความจำเพาะกว่าการจับตรงบริเวณหมู่ที่ไม่ชอบน้ำเพียงอย่างเดียว หรือการจับตรงบริเวณที่มีหมู่ ionic เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 การออกแบบโมเลกุลเพื่อใช้ในการจับกับโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ



ภาพประกอบ 15 โครงสร้างอนุพันธ์ของแอนทราซีน (Anthracyl Derivatives)



ภาพประกอบ 16 โครงสร้างอนุพันธ์ของไพรีน (Pyrenyl Derivatives)

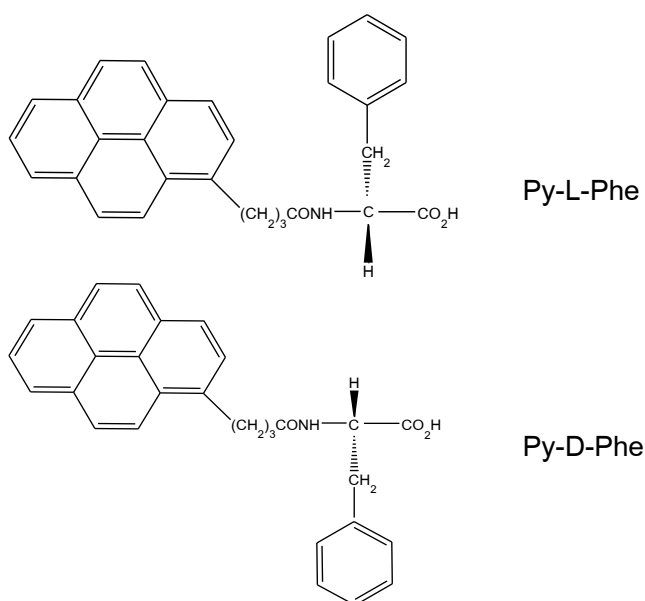
कुमार และบุรณประพฤกษ์ (Kumar; & Buranaprapuk. 1997: 2085-2087) ได้มีการออกแบบและพัฒนาโมเลกุลซึ่งมีปลายด้านหนึ่งเป็นหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และปลายอีกด้านหนึ่งเป็นหมู่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เชื่อมต่อกัน โดยใช้กรดอะมิโน L-phenylalanine เชื่อมต่อเข้ากับ 4(1-pyrene)butyric acid (PBA) ได้เป็นโมเลกุล N-(1-phenylalanine)-4(1-pyrene)butyramide (Py-Phe) จากการศึกษาการตัดโปรตีน bovine serum albumin และ chicken egg-white lysozyme พบว่าการตัดโปรตีนเกิดขึ้นได้เมื่อฉายแสงที่มีความยาวคลื่น 344 nm ($\lambda_{\max}$ ของ Py-Phe) ไปยังสารละลายผสมของโปรตีน Py-Phe และ Hexamine cobalt(III) trichloride ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ หรือ CoHA) ซึ่ง CoHA ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) การแยกเปปไทด์ที่ได้จากการตัดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และการหาลำดับกรดอะมิโน พบว่า BSA ถูกตัดระหว่าง Leu 348 และ Arg 349 ในขณะที่ lysozyme ถูกตัดระหว่าง Val 108 และ Trp 109

कुमार และบุรณประพฤกษ์ (Kumar; & Buranaprapuk. 1999: 4262-4270) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของความยาวของโมเลกุลต่อการตัดโปรตีน โดยนำ glycine มาขึ้นระหว่าง 4(1-pyrene)butyric acid กับ L-phenylalanine เกิดเป็นอนุพันธ์ของไพรีน ในรูปของ $\text{Py}-(\text{Gly})_n\text{-Phe}$ ($n=0, 1, 2$) พบว่าความยาวของโมเลกุลมีผลต่อคุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปีและคุณสมบัติการตัดโปรตีนด้วยแสง ความยาวของโมเลกุลไม่ช่วยให้การตัดโปรตีนดีขึ้น ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนลดลงเมื่อโมเลกุลมีความยาวเพิ่มขึ้น และการตัด lysozyme โดยใช้โมเลกุลของ $\text{Py}-(\text{Gly})_2\text{-Phe}$ เกิดขึ้น 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งแรกเกิดขึ้นระหว่าง Val 108 และ Trp 109 (major cleavage site) และอีกตำแหน่งหนึ่งคือ ระหว่าง Ala 110 และ Trp 111 (minor cleavage site) การตัดของโปรตีนจะไม่เกิดขึ้นถ้าไม่มี probe หรือ แสง หรือ CoHA

บุรณประพฤกษ์ และ कुमार (Buranaprapuk; & Kumar. 2000: 7019-7025) ได้มีการศึกษาการตัดโปรตีน โดยนำกรดอะมิโนชนิดอื่นมาใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีน ได้แก่

L-tryptophan, L-tyrosine และ L-histidine โดยการต่อเข้ากับหมู่คาร์บอกซิลของ 4(1-pyrene)butyric acid แทน L-phenylalanine และมีโมเลกุลของ glycine เป็น linker เพื่อเพิ่ม flexibility ของโมเลกุล เกิดเป็นโมเลกุลในรูปของ Py-(Gly)-X (X = Phe, Trp, Tyr, และ His) พบว่าโปรตีนจะไม่ถูกตัดเมื่อใช้โมเลกุลที่มี Trp และ Tyr เนื่องจากเกิด intramolecular quenching โดยโมเลกุลของ Trp และ Tyr ในการยับยั้งการเกิด Py^* จาก Py^*

กุมาร์ และคนอื่นๆ (Kumar; et al. 2001: 297-298) ได้มีการศึกษาถึงผลของ chiral center ของ phenylalanine บน probe ต่อการจับและตัดโปรตีน โดยการสังเคราะห์โมเลกุล Py-L-Phe และ Py-D-Phe (ภาพประกอบ 17) ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ไพรีน เมื่อไอโซเมอร์ทั้งสองจับกับ BSA การคายแสง fluorescence ของ L-isomer จะลดลง ในขณะที่การคายแสง fluorescence ของ D-isomer จะเพิ่มขึ้น และการเปลี่ยนแปลงสัญญาณ CD เป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม และพบว่า L-isomer สามารถเลือกจับกับ BSA ได้ดีกว่า D-isomer ถึง 100 เท่า



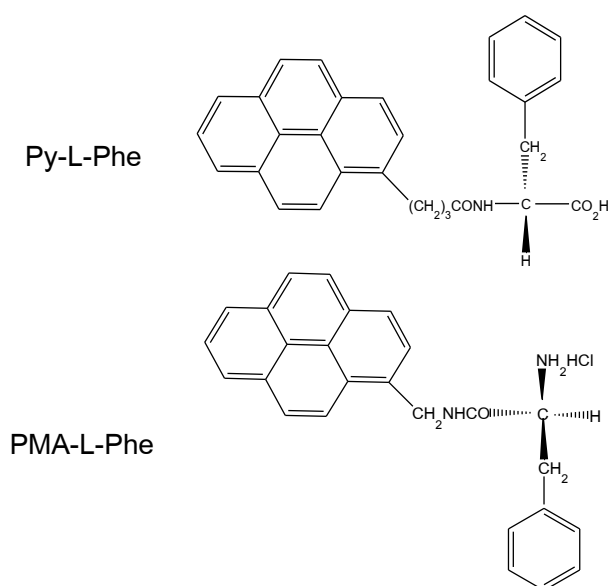
ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของ Py-L-Phe และ Py-D-Phe

จากการศึกษาถึงกลไกของปฏิกิริยาโดยเทคนิคทาง Flash photolysis พบว่าเกิดอนุมูลประจุบวกของไพรีน (pyrene cation radical; Py^*) เป็น intermediate หลังจาก CoHA รับอิเล็กตรอนจาก Py^* ซึ่ง Py^* สามารถดึงอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom abstraction) บน

คาร์บอนตำแหน่งอัลฟาของกรดอะมิโนในโปรตีน ซึ่งก่อให้เกิดการสลาย (hydrolysis) ของพันธะเพปไทด์ (Kumar; & Buranaprapuk. 2002 : 5810-5815)

กุ่มาร์ และโทตา (Kumar; & Thota; et al. 2005: 825-827) ศึกษาการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง โดยศึกษาการตัดโปรตีน lysozyme ด้วย Co(III) complexes ได้แก่ $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Br}]^{2+}$ $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]^+$ และ $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ พบว่า เมื่อฉายแสงให้กับสารละลายผสมของโปรตีน lysozyme กับ Co(III) complexes เมื่อแยกเพปไทด์ที่ได้จากการตัด ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และการหาลำดับกรดอะมิโน พบว่า lysozyme ถูกตัดระหว่าง Val 108 และ Trp 109

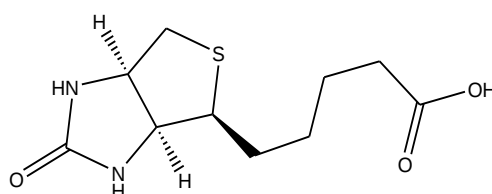
บุรณประพฤกษ์ และคนอื่นๆ (Buranaprapuk; et al. 2008 : 9258-9265) ได้ศึกษาถึงความสำคัญของขั้วที่ปลายโมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนโดยการสังเคราะห์อนุพันธ์ไพรีนในรูป PMA-L-Phe และ PMA-D-Phe การกลับขั้วที่ปลายของโมเลกุล phenylalanine จากหมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) เป็นหมู่เอมีน (NH₂) ให้ปลายของอนุพันธ์ไพรีนเป็นหมู่อะมิโนของ phenylalanine แทนหมู่คาร์บอกซิล (ภาพประกอบ 18) พบว่าไม่มีผลต่อตำแหน่งในการตัดโปรตีน แต่มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการตัดโปรตีนดีขึ้นอย่างมาก และ yield ที่ได้จัดว่ามีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับการตัดโปรตีนที่เคยมีรายงานมา และจากการศึกษาโดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี พบว่าขั้วของปลายอนุพันธ์ไพรีนมีผลต่อค่าคงที่การจับ (binding constant)



ภาพประกอบ 18 โครงสร้างของ Py-L-Phe และ PMA-L-Phe

ดังนั้นผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าถ้านำโมเลกุลที่เป็นสับสเตอร์ทจำเพาะต่อเอนไซม์มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ไพรีน จะได้อนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ที่มีหมู่จำเพาะต่อเอนไซม์ชนิดนั้น ซึ่งสามารถใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีในการศึกษาโครงสร้างบริเวณ binding site ได้ ในงานวิจัยนี้จึงมีการใช้ D(+)-biotin ซึ่งเป็นสับสเตอร์ทของ avidin และ streptavidin มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ไพรีน

ไบโอติน (biotin, vitamin B หรือ vitamin H) เป็นสารประกอบไบไซคลิก (bicyclic) ที่มีกำมะถัน (S) อยู่ในโมเลกุล ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของเตตระไฮโดรไทโอเฟน (tarahydrotiophene) และ imidazolidone ring เข้าด้วยกัน มีกรดวาเลริก (valeric) มาจับเป็นโซ่ข้าง (side chain) biotin มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวแยกได้จากไข่ขาว ชนิดที่พบในธรรมชาติ คือ dextro-rotary form หรือ D(+)-biotin (ภาพประกอบ 19) ซึ่งเป็นชนิดเดียวที่ร่างกายใช้เป็น ส่วนประกอบของโคเอนไซม์ ซึ่ง binding constant ของ biotin-avidin และ biotin-streptavidin มีค่าสูงถึง $\sim 10^{15} \text{M}^{-1}$ นอกจากนี้ปฏิกิริยาระหว่าง biotin-avidin และ biotin-streptavidin มีการนำไปประยุกต์ใช้ (Diamandis; & Christopoulos. 1991: 625-636) เนื่องจากมีข้อดีได้แก่ 1) avidin และ streptavidin จะจับกับ biotin ที่จำเพาะเฉพาะกับตำแหน่งหรือเป้าหมายที่สนใจ 2) biotin มีตำแหน่งการจับกับ avidin และ streptavidin จำนวน 4 binding sites ต่อหนึ่งโมเลกุลของ avidin และ streptavidin 3) biotin เป็นโมเลกุลเล็ก ที่เมื่อถูกนำเข้าไปใน biologically active macromolecules จะไม่มีผลต่อ biological activity เช่น enzymatic catalysis หรือ antibody binding และ 4) สามารถที่จะมาสังเคราะห์เป็นโมเลกุลอนุพันธ์ไพรีน เช่น Py-biotin ได้



ภาพประกอบ 19 โครงสร้างโมเลกุลของ D(+)-biotin

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการตัดโปรตีน avidin และ streptavidin ด้วยอนุพันธ์ของไฟรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง

1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- ไมโครปิเปตต์ขนาด 20 200 และ 1000 ไมโครลิตร จากบริษัท Gilson
- Blot Filter Paper จากบริษัท Bio-rad
- Sequi-BlotTM PVDF membrane (0.2 μ m) จากบริษัท Bio-rad
- แผ่นอะลูมิเนียม TLC จากบริษัท Merck
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง จากบริษัท Mettler toledo รุ่น AB104-S
- pH meter จากบริษัท Mettler toledo
- ชุดอุปกรณ์ Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell จากบริษัท Bio-rad
- ชุดอุปกรณ์ SDS - PAGE apparatus จากบริษัท Bio-rad
- เครื่องยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น UV-2401 PC จากบริษัท Shimadzu
- เครื่องฟลูออเรสเซนส์สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น FP-6200 (PC) จากบริษัท Jasco
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น ENF-240C / FE จากบริษัท Spectronics Corporation

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 1-Pyrenemethylamine hydrochloride (PMAC) จากบริษัท Acros
- D(+)-biotin จากบริษัท Acros
- Acetonitrile จากบริษัท Merck
- Tetrahydrofuran จากบริษัท Carlo Erbra
- N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) จากบริษัท Fluka
- Dichloromethane จากบริษัท Carlo Erbra
- Methanol จากบริษัท Merck
- 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
- Tetramethylethylenediamine (TMEDA หรือ TEMED) จากบริษัท Sigma
- Avidin from egg white (MW= 66,000 Da) จากบริษัท Sigma
- Streptavidin from *Streptomyces avidinii* (MW= 60,000 Da) จากบริษัท Sigma
- Hexamine cobalt(III) trichloride (CoHA) จากบริษัท Sigma
- Coomassie blue R-250 จากบริษัท Sigma
- Cyclohexylaminopropane sulfonic acid (CAPS) จากบริษัท Sigma
- Trizma[®] base จากบริษัท SAFC
- Trizma[hydroxyl]aminomethane hydrochloride (Trizma[®] hydrochloride) จากบริษัท Sigma
- Tricine จากบริษัท Sigma
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) จากบริษัท Sigma
- Mark12[™] MW Standard จากบริษัท Invitrogen
- Bromophenol Blue จากบริษัท Plusone
- 2-Mercaptoethanol จากบริษัท Merck
- Magnesium sulfate anhydrous จากบริษัท Fluka

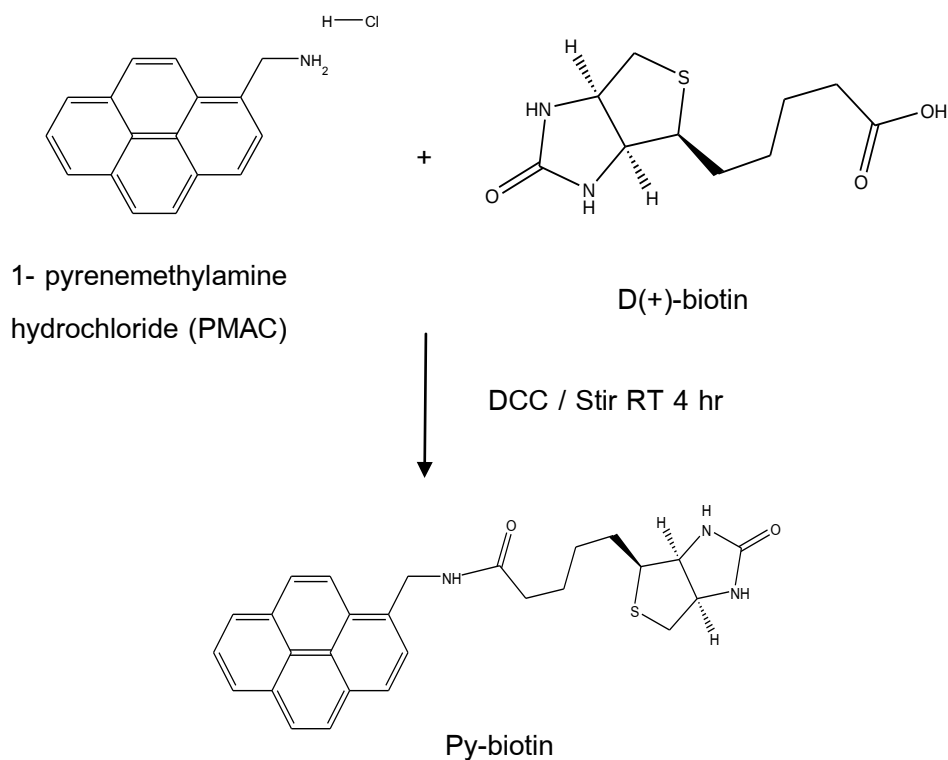
2. การสังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของ Py-biotin

วิธีการทดลอง

1. นำ 1-Pyrenemethylamine hydrochloride, PMAC (50 มิลลิกรัม) ไปทำปฏิกิริยากับ D(+)-biotin (50 มิลลิกรัม) โดยละลายใน acetonitrile ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และ tetrahydrofuran ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
2. เติม dicyclohexyl carbodiimide (DCC) (100 มิลลิกรัม) และ 5% (w/v) sodium bicarbonate (ละลายใน 80% acetonitrile/water) ดังภาพประกอบ 20
3. คนสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ TLC (ใช้ 10% CH₂Cl₂/MeOH เป็นระบบพา) ทุกๆ 1 ชั่วโมง เมื่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ไม่เกิดเพิ่มขึ้นจึงเติมน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยา
4. ทำการสกัดผลิตภัณฑ์ด้วย CH₂Cl₂ จากนั้นนำชั้น CH₂Cl₂ ที่ได้มารวมกัน แล้วนำไปกำจัดน้ำโดยใช้ MgSO₄ anhydrous แล้วนำไประเหยแห้ง

5. นำสารที่ได้ (crude) มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และใช้ตัวทำละลายผสมของ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ เป็นตัวชะ

6. ตรวจสอบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ โดยใช้ UV, Fluorescence, IR, NMR และ mass spectroscopy



ภาพประกอบ 20 ปฏิกริยาการสังเคราะห์ Py-biotin

5. การศึกษาทางสเปกโทรสโกปี

3.1 การศึกษาการจับ (binding) ของ Py-biotin กับ avidin และ streptavidin โดยการวัดการดูดกลืนแสง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย avidin หรือ streptavidin ความเข้มข้น 0-10 μM ลงในสารละลาย Py-biotin (2 μM) ใน 50 mM Tris – HCl buffer, pH 7.0 นำไปวัดการดูดกลืนแสง (300-400 nm)
2. นำค่าการดูดกลืนแสงของ Py-biotin ที่ความยาวคลื่น 343 nm ที่แต่ละความเข้มข้นของ avidin และ streptavidin มาพลอตกราฟกับความเข้มข้นของ avidin และ streptavidin
3. คำนวณหาค่าคงที่การจับ (binding constant) จากสมการของ Scatchard equation

$$1/C_f = K_b((n/r)-1)$$

โดยที่ r = อัตราส่วนความเข้มข้นของ bound probe ต่อความเข้มข้นของโปรตีน (C_b / [avidin หรือ streptavidin])

C_f = ความเข้มข้นของ free probe

n = จำนวน binding site

K_b = ค่าคงที่การจับ

3.2 การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (quenching) ของ Py-biotin ในกรณีที่มี avidin และ streptavidin เป็นตัวยับยั้งการคายแสง (quencher) โดยการวัดการคายแสง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย avidin หรือ streptavidin ความเข้มข้น 0-10 μM ลงในสารละลาย Py-biotin (2 μM) ในสารละลาย 50 mM Tris – HCl buffer, pH 7.0 นำไปวัดการคายแสง (350-500 nm)
2. นำค่าการคายแสงของ Py-biotin ที่ได้จากความยาวคลื่น 377 nm ที่แต่ละความเข้มข้นของ avidin และ streptavidin มาเทียบกับค่าการคายแสงของ Py-biotin ที่ได้จากความยาวคลื่น 377 nm ที่ความเข้มข้น 0 μM ของ avidin และ streptavidin จะได้ I_0/I
3. พล็อตกราฟระหว่าง I_0/I กับความเข้มข้นของ avidin และ streptavidin
4. คำนวณหาค่าคงที่ K_{sv} จากสมการ Stern-Volmer equation

$$I_0/I = 1 + K_{sv} [Q]$$

โดยที่ I_0 และ I คือ ความเข้มข้นแสง fluorescence ของ probe ก่อนและหลังเติม avidin และ streptavidin ตามลำดับ

K_{sv} คือ Stern-Volmer quenching constant

$[Q]$ คือ ความเข้มข้นของตัวยับยั้งการคายแสง (avidin และ streptavidin)

1.3 การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (quenching) ของ Py-biotin ในกรณีจับอยู่กับ avidin และ streptavidin (10 μ M) โดยใช้ CoHA เป็นตัวยับยั้งการคายแสง (quencher) โดยการวัดการคายแสง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลาย quencher (hexamine cobalt(III) trichloride, CoHA) (0-1 mM) ลงในสารละลายผสมของ Py-biotin (2 μ M) กับ avidin และ streptavidin (10 μ M) แล้วนำไปวัดการคายแสง (350-500 nm)
2. นำค่าการคายแสงของ probe ที่ความยาวคลื่น 377 nm ที่แต่ละความเข้มข้นของ CoHA มาเทียบกับค่าการคายแสงของ probe ที่ 377 nm ที่ความเข้มข้น 0 μ M ของ CoHA จะได้ I_0/I
3. พล็อตกราฟระหว่าง I_0/I กับความเข้มข้นของ CoHA
6. นำมาคำนวณหา quenching constant จากสมการของ Stern-Volmer

$$\text{Stern-Volmer equation} : I_0/I = 1 + K_{sv} [Q]$$

โดยที่ I_0 และ I ความเข้มข้นแสง fluorescence ของ probe ก่อนและหลังเติม CoHA ตามลำดับ
 K_{sv} = Stern-Volmer quenching constant
 $[Q]$ = ความเข้มข้นของ quencher (CoHA)

4. การศึกษาการตัดโปรตีน avidin และ streptavidin โดยการกระตุ้นด้วยแสงและตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

4.1 การตัดโปรตีน avidin และ streptavidin โดยการกระตุ้นด้วยแสง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายผสมของ Py-biotin (15 μ M), avidin หรือ streptavidin (15 μ M) และ CoHA (1 mM) ใน 50 mM Tris – HCl buffer, pH 7.0 และสารละลายผสมที่ไม่มี Py-biotin (probe) หรือ CoHA ในสถานะเดียวกัน
2. ทำการฉายแสงด้วย 150W xenon lamp ที่ความยาวคลื่น 342 nm ในช่วงที่หุ้มโฟลีนดูดกลืนแสง
3. เตรียมสารละลายผสมที่ไม่มีการฉายแสง (dark control) เพื่อเป็นการเปรียบเทียบ โดยการทดลองทำในห้องมืด

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

4.2.1 การเตรียมสารละลายแคโทด 5x (500 มิลลิลิตร)

Trizma [®] base	6.05 กรัม
Tricine	8.96 กรัม
SDS	0.50 กรัม

1. ละลาย Trizma[®] base, Tricine และ SDS ในน้ำ deionize
2. ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ deionize (pH ของสารละลาย ประมาณ 8.25)

4.2.2 การเตรียมสารละลาย แอนโนด 5x (500 มิลลิลิตร)

Trizma [®] base	12.20 กรัม
--------------------------	------------

1. ละลาย Trizma[®] base ใน deionized water ปรับ pH ให้เป็น 8.9 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
2. ปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วย deionized water

4.2.3 การเตรียมสารละลายเจลบัฟเฟอร์ (50 มิลลิลิตร)

Trizma [®] base	36.32 กรัม
SDS	0.30 กรัม

1. ละลาย Trizma[®] base และ SDS ด้วยน้ำ deionize 40 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย
2. ปล่องยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับ pH ให้เป็น 8.45 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
3. ปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย deionized water

4.2.4 การเตรียมสารละลาย อะคริลาไมด์/บิสอะคริลาไมด์ (50 มิลลิลิตร)

Acrylamide	23.25 กรัม
Bisacrylamide	1.50 กรัม

1. ละลาย Acrylamide และ Bisacrylamide ด้วย deionized water 40 มิลลิลิตร โดยใช้ความร้อนช่วยในการละลาย
2. ปล่องยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร ด้วย deionized water

4.2.5 การเตรียม staining solution (250 มิลลิลิตร)

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

1. ละลาย Coomassie blue R-250 ใน deionized water
2. เติม isopropanol และ acetic acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
3. ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

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

5. การย้าย โปรตีนโดย Western Blot (protein transfer)

5.1 การเตรียมสารละลาย CAPS buffer 100mM , pH 10.5

1. ละลาย CAPS 22.13 กรัม ใน deionized water
2. ปรับ pH ให้เป็น 11.0 โดยใช้ 2 N NaOH
3. ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

1.1 การเตรียม staining solution สำหรับย้อม Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane

1. ละลาย CAPS 22.13 กรัม ใน deionized water
2. ปรับ pH ให้เป็น 11.0 โดยใช้ 2 N NaOH
3. ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

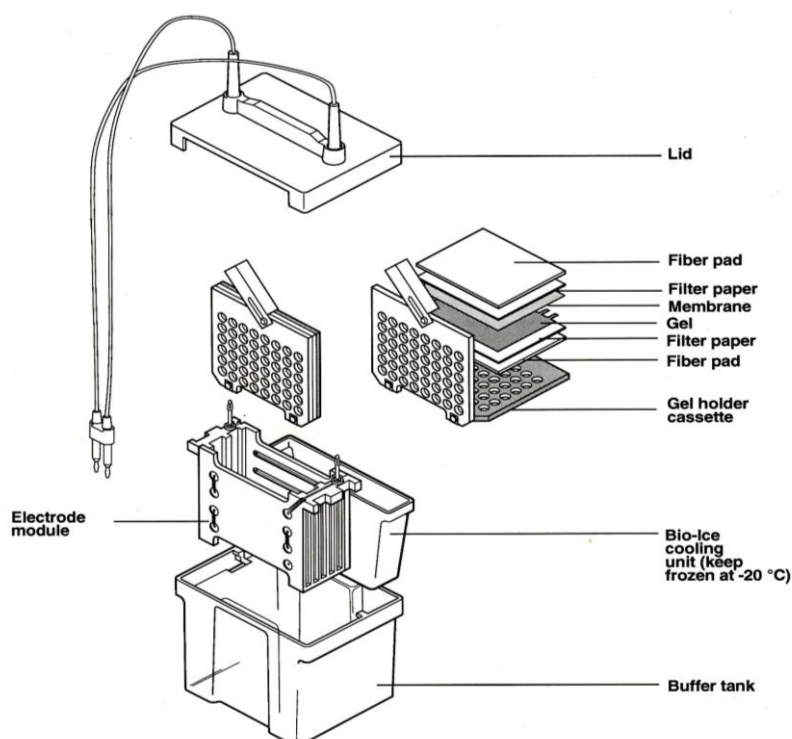
1.2 วิธีการทดลอง

1. ตัด PVDF membrane และ Blot Filter Paper ให้มีขนาดเท่ากับเจลที่ได้
2. นำ PVDF membrane ไปแช่ใน 100% methanol เป็นเวลา 2-3 วินาที
3. นำเจลที่ได้ผ่านกระแสไฟฟ้าเพื่อทำการแยกเปปไทด์แล้ว (โดยไม่ต้องย้อมเจล) และ

Blot Filter Paper กับ PVDF membrane ที่เตรียมไว้ มาแช่ใน CAPS buffer, pH 10.5 เป็นเวลา 10-15 นาที

4. นำเจล Blot Filter paper และ PVDF membrane ประกอบเข้าด้วยกันใน buffer tank และต่อเข้ากับแหล่งจ่ายไฟ (power supply) ดังภาพประกอบ 21 โดยทำการปรับกระแสไฟฟ้า และ เวลาที่ใช้ในการ transfer เพื่อให้เกิดการ transfer อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งการทดลองใช้เวลา ประมาณ 0.5-1.5 ชั่วโมง

5. นำ PVDF membrane ที่ได้ทำการ transfer โปรตีนแล้วมาย้อมใน Coomassie blue R-250 (0.1%) methanol (45%) /acetic acid (10%) เป็นเวลาประมาณ 2 นาที (หรือจนมองเห็น band) แล้วจึงนำ PVDF membrane ไปล้าง (destain) ด้วย methanol (50%) / water (50%) ประมาณ 5 นาที แล้วจึงล้าง PVDF membrane ด้วยน้ำกลั่น ทำการตัด band ของเพปไทด์ แล้ว หลั่งลำดับของกรดอะมิโน



ภาพประกอบ 21 การเตรียมอุปกรณ์สำหรับการย้ายโปรตีน
ที่มา : Bio-Rad Laboratories . (2010). (online).

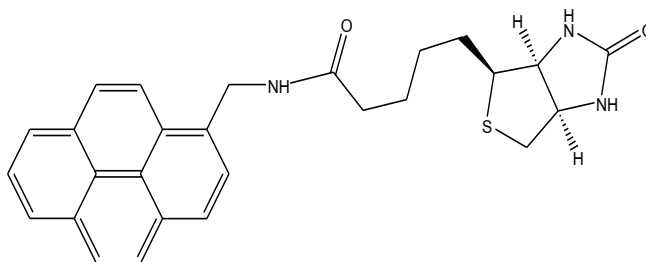
บทที่ 4

ผลการทดลอง

ในงานวิจัยครั้งนี้เกี่ยวข้องกับการตัดโปรตีน avidin และ streptavidin ด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง ผู้วิจัยได้แสดงผลการทดลองดังนี้

1. การสังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของ Py-biotin
2. การศึกษาการ binding โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. การศึกษาการตัดโปรตีน avidin และ streptavidin โดยการกระตุ้นด้วยแสงและตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE
4. การย้ายโปรตีนโดย Western Blot (protein transfer) เพื่อหาลำดับกรดอะมิโน

1. การสังเคราะห์ และตรวจสอบโครงสร้างของ Py-biotin

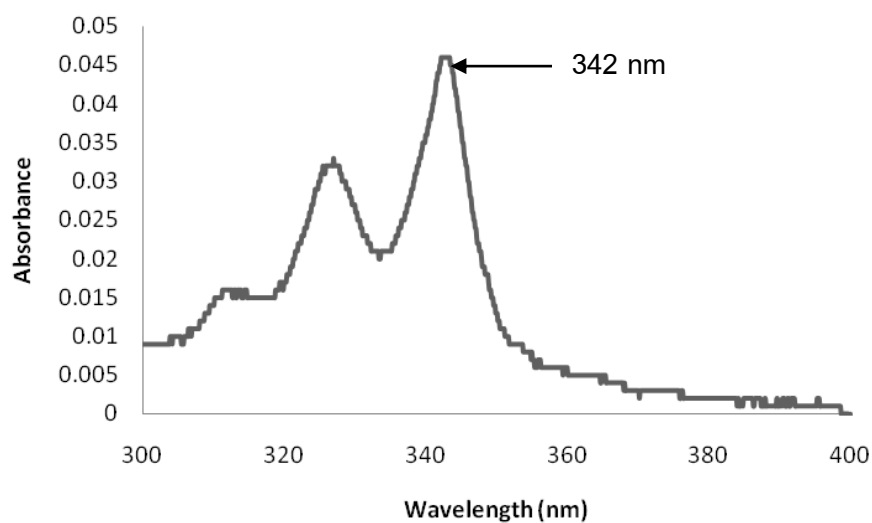


ภาพประกอบ 22 โครงสร้างของ d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide (Py-biotin)

จากการสังเคราะห์โมเลกุลของ d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide (Py-biotin) และทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี แล้วนำสารที่บริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 22) ซึ่งเป็นของแข็งสีขาวอมเหลือง ไปตรวจสอบโครงสร้าง ได้ผลดังนี้

การตรวจสอบโครงสร้างของ Py-biotin

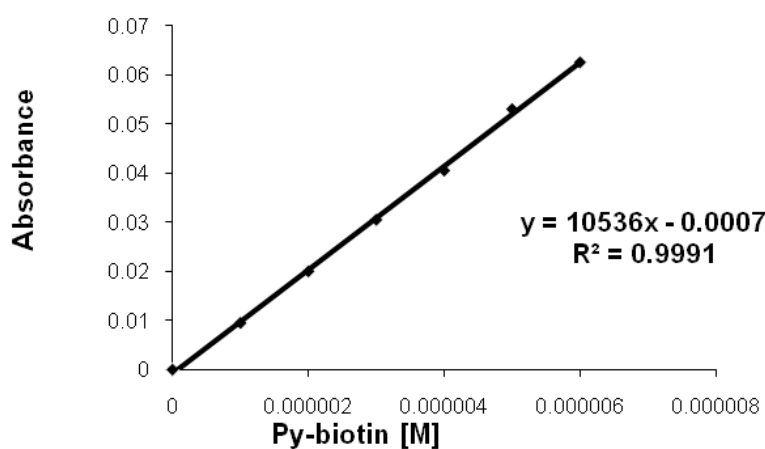
1.1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง



ภาพประกอบ 23 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-biotin

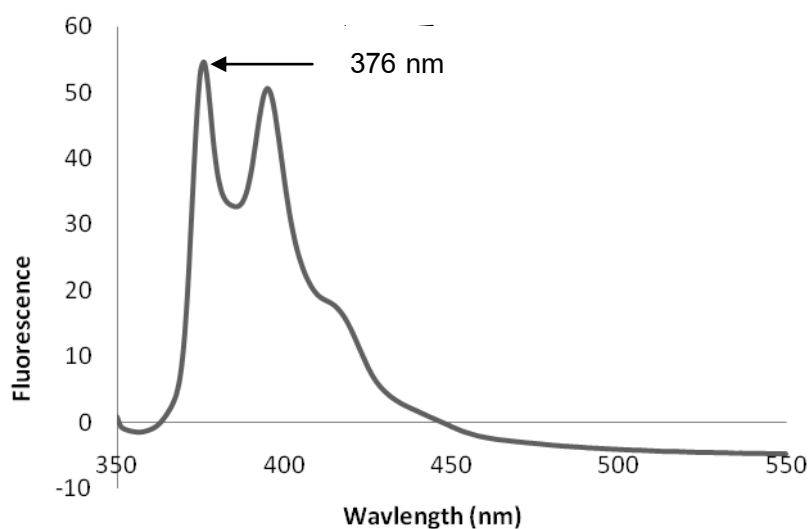
จากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-biotin พบว่าให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 342 nm และจากการหาค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ Py-biotin โดยใช้กราฟมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ $1.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

STD. curve of Py-biotin



ภาพประกอบ 24 กราฟมาตรฐาน Py-biotin

1.2 สเปกตรัมการคายแสง



ภาพประกอบ 25 สเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin

จากสเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin พบว่าให้ค่าการคายแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 376 nm ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm

1.3 NMR spectrum

^1H NMR (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) : δ 7.8–8.2 (9H), 7.1 (5H), 5.0 (1H), 4.1 (1H), 3.8 (1H), 3.3 (2H), 2.2 (2H), 1.8–2.1 (6H)

1.4 Mass spectrum

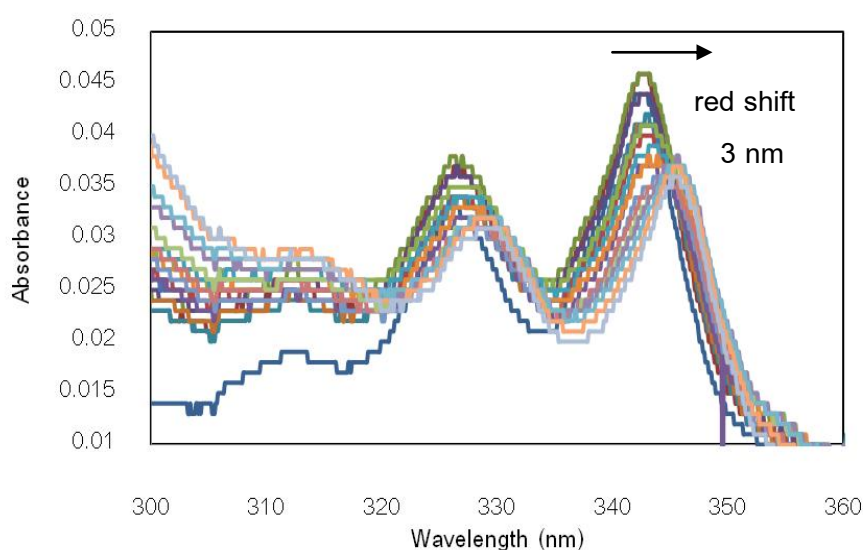
MS data (FAB): m/z 456.4 (M^+)

1.5 จุดหลอมเหลว : 176 -180 องศาเซลเซียส

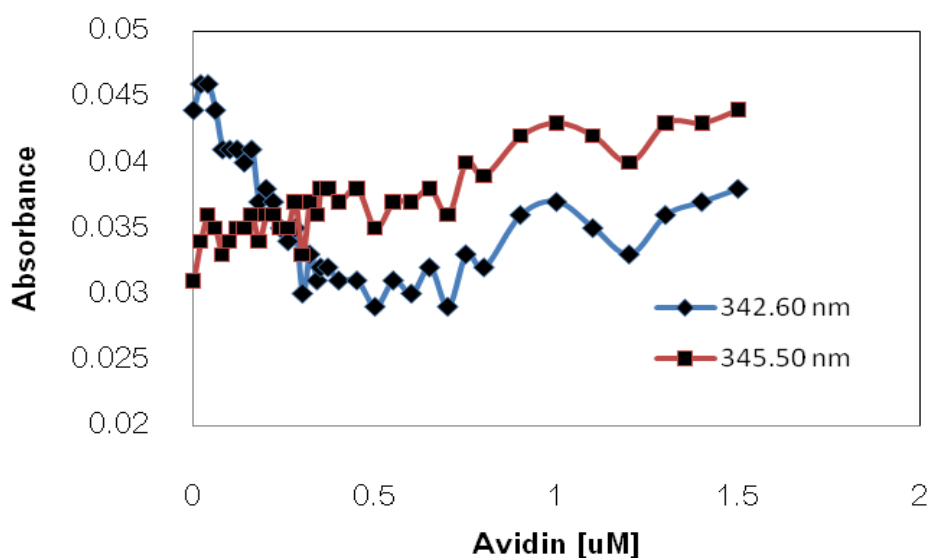
2. การศึกษาการ binding โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีของ Py-biotin

2.1 การศึกษาการจับ (binding) ของ Py-biotin กับ avidin และ streptavidin โดยการวัดการดูดกลืนแสง

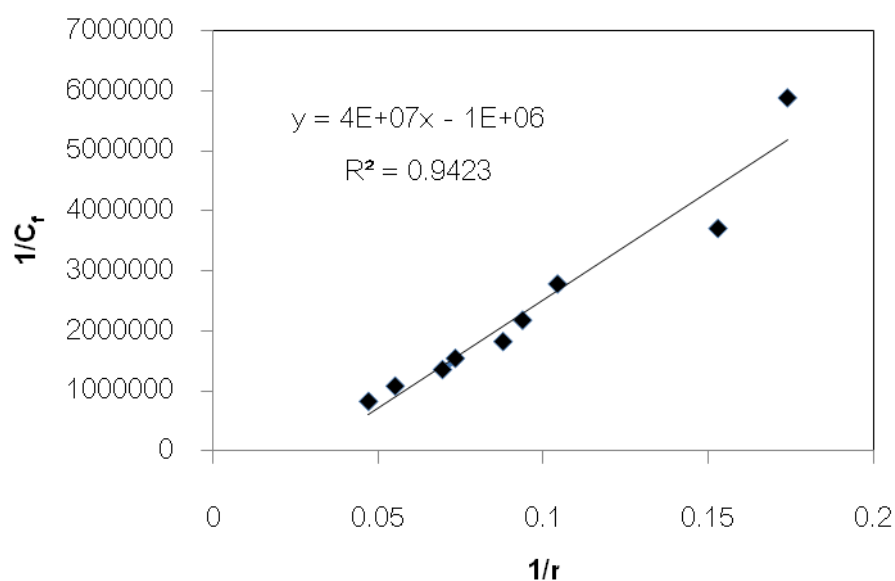
การเติมสารละลายโปรตีน avidin ลงในสารละลาย Py-biotin ($4.19 \mu\text{M}$) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่ความยาวเพิ่มขึ้นประมาณ 3 นาโนเมตร และมีสเปกตรัมที่ลดต่ำลง (hypochromism) ในภาพประกอบ 26



ภาพประกอบ 26 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-biotin ($4.19 \mu\text{M}$) / avidin ($0-1.5 \mu\text{M}$)

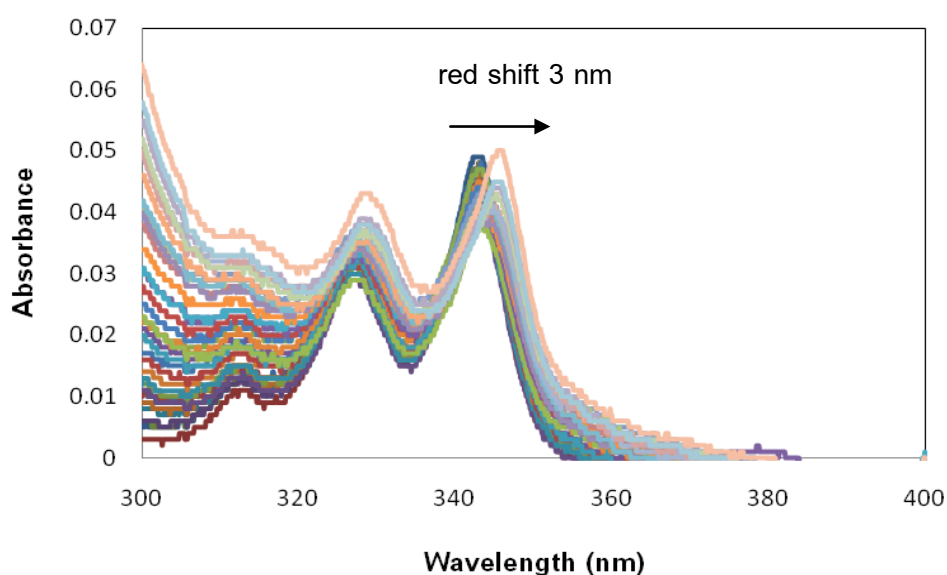


ภาพประกอบ 27 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปของ Py-biotin ($4.19 \mu\text{M}$) ที่ความยาวคลื่น 342.5 nm และ 345.2 nm เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ avidin

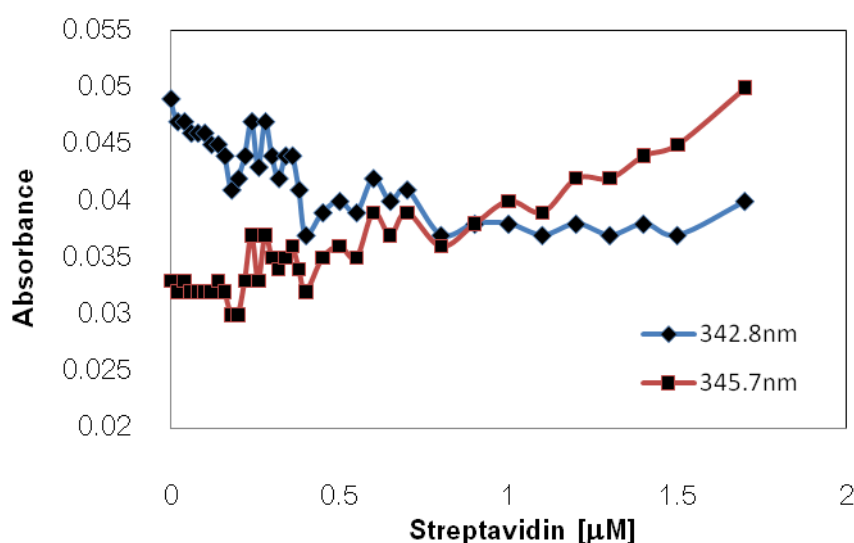


ภาพประกอบ 28 binding isotherm ของ Py-biotin ที่ได้จากข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในภาพประกอบ 26 เส้นที่บ่งชี้สัมพันธ์กับสมการของ Scatchard equation [$1/C_f = K_b((n/r)-1)$]

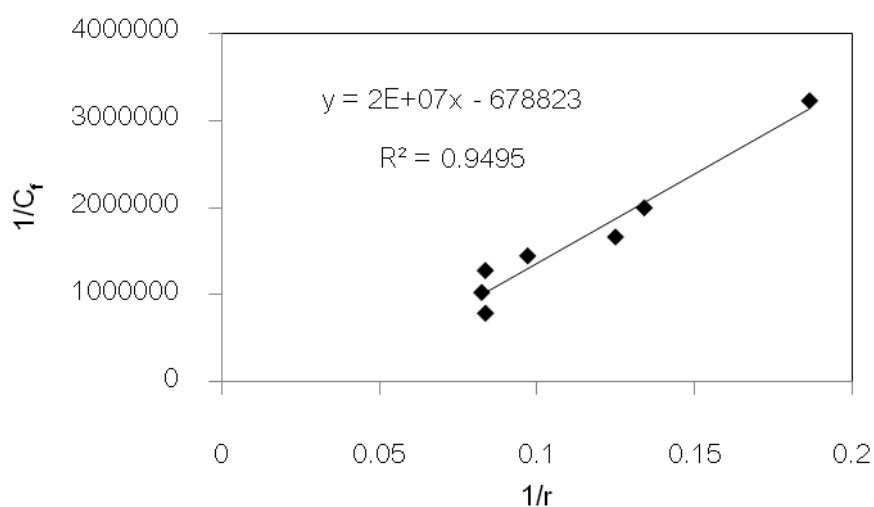
การเติมสารละลายโปรตีน streptavidin ลงในสารละลาย Py-biotin ($4.6 \mu\text{M}$) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่มีความยาวเพิ่มขึ้นประมาณ 3 นาโนเมตร และมีสเปกตรัมที่ลดต่ำลง (hypochromism) ในภาพประกอบ 29



ภาพประกอบ 29 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-biotin ($4.6 \mu\text{M}$) / streptavidin ($0-1.7 \mu\text{M}$)



ภาพประกอบ 30 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป ของ Py-biotin (4.6 μM) ที่ความยาวคลื่น 342.8 nm และ 345.7 nm เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ streptavidin



ภาพประกอบ 31 binding isotherm ของ Py-biotin ที่ได้จากข้อมูลสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในภาพประกอบ 29 เส้นที่จับสัมพันธ์กับสมการของ Scatchard equation [$1/C_f = K_b((n/r)-1)$]

จากการคำนวณโดยใช้ Scatchard equation ได้ค่าคงที่การจับ (binding constant, K_b) สำหรับ Py-biotin/avidin เท่ากับ $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ และค่าคงที่การจับ (binding constant, K_b) สำหรับ Py-biotin/streptavidin เท่ากับ $6.79 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ จากค่าที่ได้ จะพบว่า Py-biotin สามารถจับกับโปรตีน avidin ได้ดีกว่า streptavidin ประมาณ 1.5 เท่า ค่าคงที่การจับที่ได้สรุปในตาราง 3

ตาราง 3 แสดงค่า binding constant (K_b) ของ Py-biotin เมื่อจับกับ avidin และ streptavidin

Probe / Protein	Py-biotin/avidin	Py- biotin/streptavidin
K_b (M^{-1})	1.00×10^6	6.79×10^5

2.2 การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (quenching) ของ Py-biotin ในกรณีที่มี avidin และ streptavidin เป็นตัวยับยั้งการคายแสง (quencher) โดยการวัดการคายแสง

พารามิเตอร์การตรวจวัด (Parameter measurement) การยับยั้งการคายแสง

Measurement mode : Emission spectrum

Band width (Ex) : 5 nm

Band width (Em) : 5 nm

Response : Fast

Sensitivity : Low

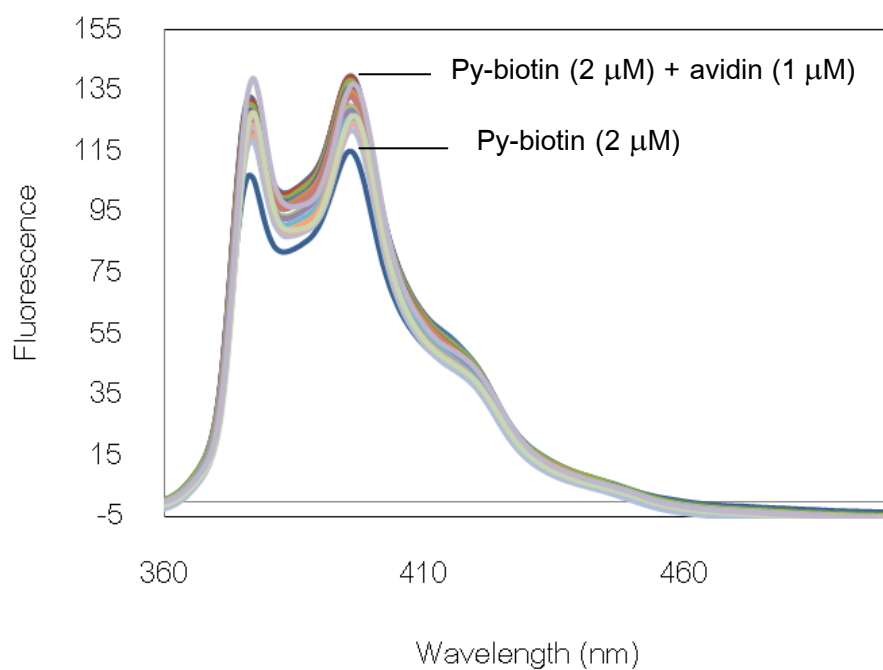
Measurement range : 350-550 nm

Data pitch : 1 nm

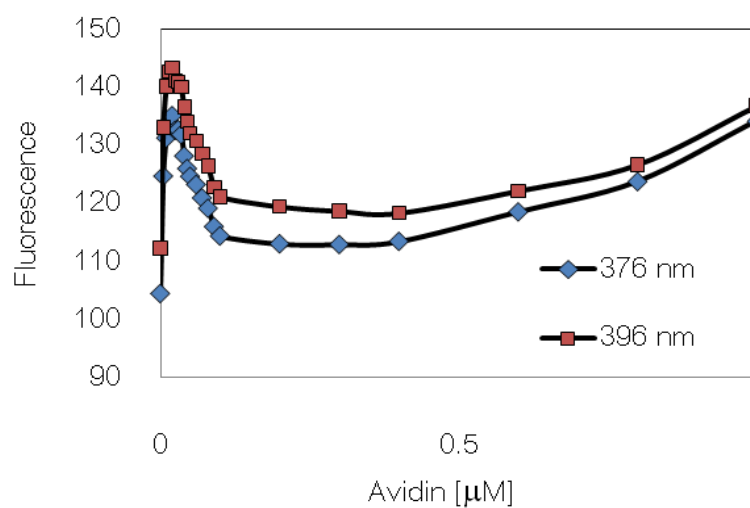
Excitation wavelength : 342.0 nm

Scanning speed : 125 nm/min

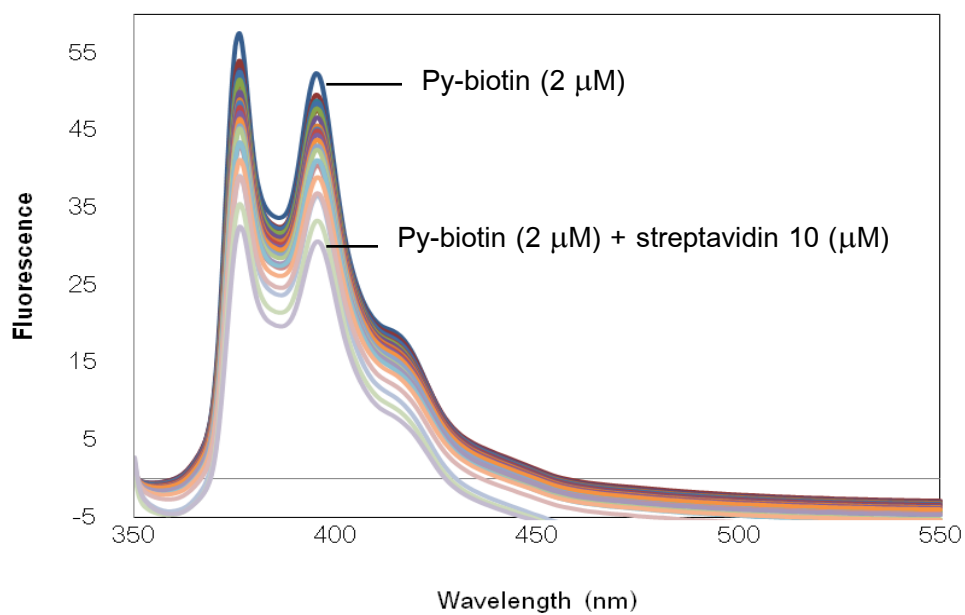
จากการศึกษาถึงผลต่อฟลูออเรสเซนซ์ของ Py-biotin ($2 \mu M$) ขณะจับอยู่กับโปรตีน avidin และ streptavidin ($0-10 \mu M$) พบว่า fluorescence intensity ของ Py-biotin (ภาพประกอบ 33) จะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการเติม avidin ($0, 0.005, 0.01, 0.015 \mu M$) และลดลงในช่วงความเข้มข้นของ avidin 0.02 ถึง $0.10 \mu M$ หลังจากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอีกครั้งที่ความเข้มข้นของ avidin 0.2 ถึง $1.0 \mu M$ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงแรกของการเติม avidin โมเลกุลของ Py-biotin ไม่ได้อยู่ในบริเวณที่เป็น binding site เมื่อความเข้มข้นของ avidin เพิ่มขึ้นจะทำให้ tyrosine หรือ tryptophan ใน avidin ไปบดบังหรือยับยั้งการคายแสงของหมู่ไพรีน จึงทำให้ fluorescence intensity ลดลง สำหรับ fluorescence intensity ของ Py-biotin ในกรณีที่ได้เติม streptavidin ความเข้มข้น 0 ถึง $10.0 \mu M$ นั้น จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ streptavidin เพิ่มขึ้น (ภาพประกอบ 35) ซึ่งเหตุผลจะคล้ายกับการลดลงของ fluorescence intensity ในกรณีของ Py-biotin จับอยู่กับ avidin 0.02 ถึง $0.10 \mu M$ ผลการศึกษาทางฟลูออเรสเซนซ์ในการจับกับโปรตีนแสดงในตาราง 4



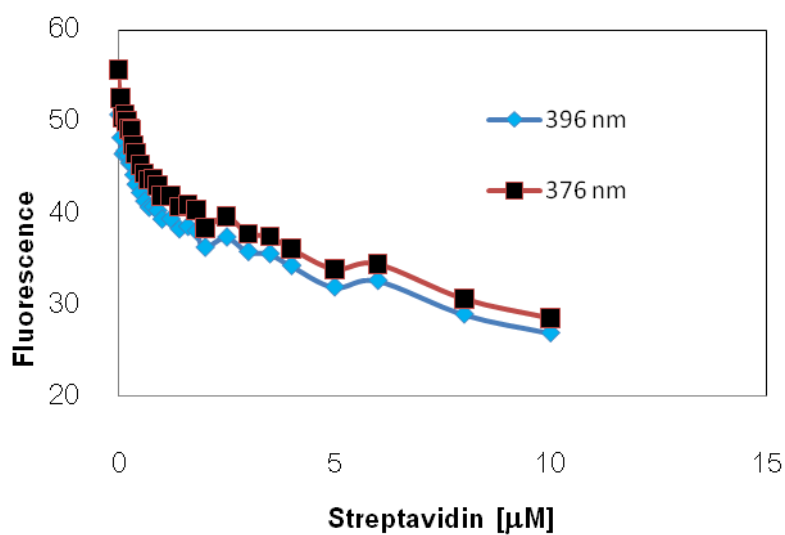
ภาพประกอบ 32 สเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin ในกรณีที่จับอยู่กับโปรตีน avidin



ภาพประกอบ 33 แสดง fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปของ Py-biotin (2 μM) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ avidin ที่ความยาวคลื่น 376 และ 396 นาโนเมตร



ภาพประกอบ 34 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin ($2\ \mu\text{M}$) ในกรณีที่จับอยู่กับ Streptavidin



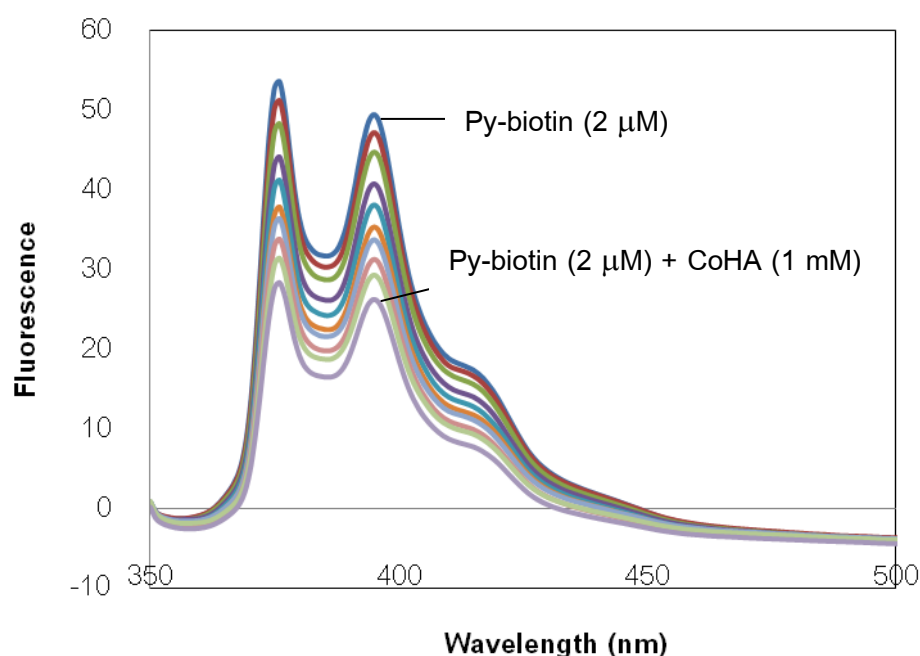
ภาพประกอบ 35 แสดง fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปของ Py-biotin เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Streptavidin ที่ความยาวคลื่น 376 และ 396 นาโนเมตร

ตาราง 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ fluorescence intensity ของ Py-biotin เมื่อจับกับ avidin และ streptavidin

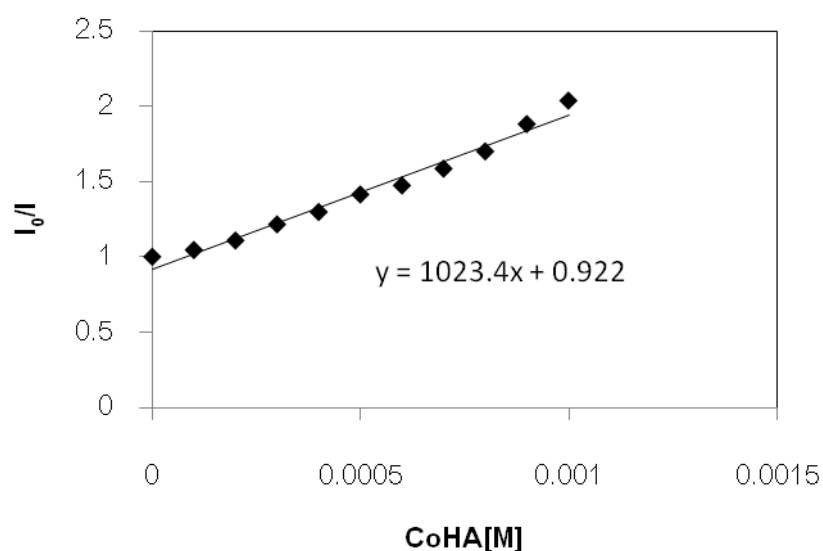
	Py-biotin + avidin	Py-biotin + streptavidin
การยับยั้งการคายแสง (Quenching)	fluorescence intensity เพิ่มขึ้น ในช่วงความเข้มข้น 0-0.015 μM แล้วลดลงในช่วงความ เข้มข้น 0.02 - 0.10 μM	fluorescence intensity ลดลง

2.3 การศึกษาการยับยั้งการคายแสง (quenching) ของ Py-biotin ในกรณีจับอยู่กับ avidin และ streptavidin ($10 \mu\text{M}$) โดยใช้ CoHA เป็นตัวยับยั้งการคายแสง (quencher) โดยการวัดการคายแสง

2.3.1 การยับยั้งการคายแสง (quenching) ของ Py-biotin โดย CoHA ในกรณีที่ไม่ได้จับกับโปรตีน

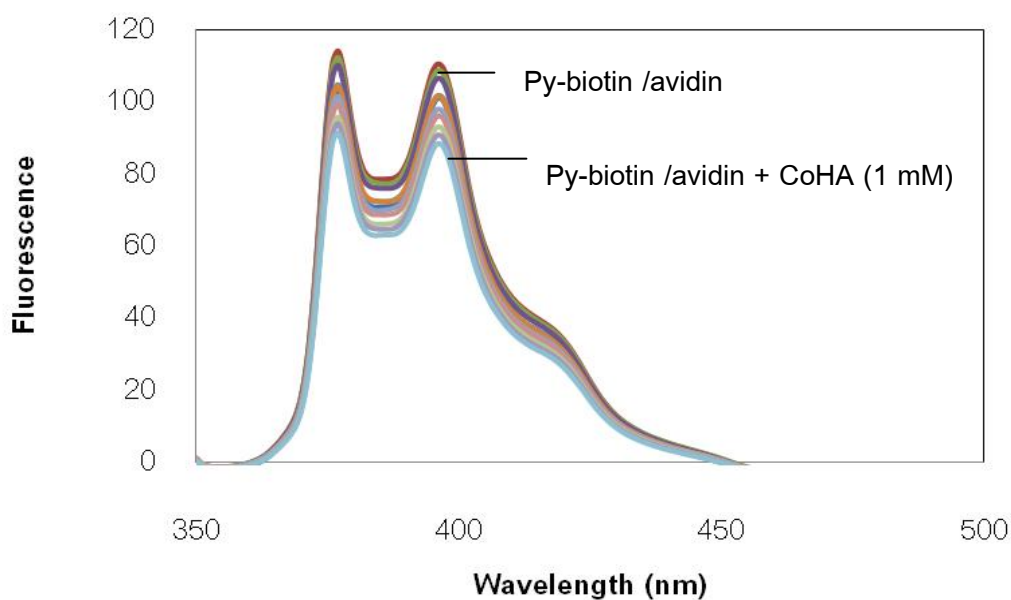


ภาพประกอบ 36 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin ($2 \mu\text{M}$) ในกรณีที่ไม่ได้จับอยู่กับโปรตีน (free probe) ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm

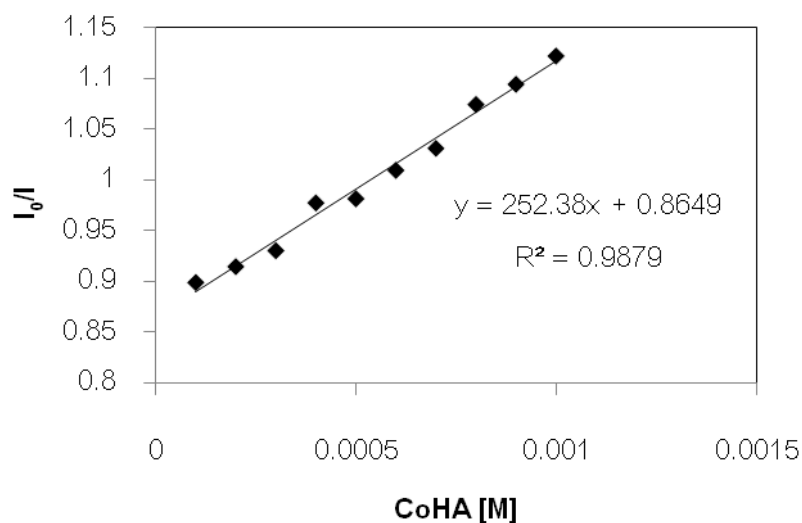


ภาพประกอบ 37 แสดงกราฟระหว่าง I_0/I ต่อ [CoHA] โดยที่ I_0 เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin เมื่อไม่มี CoHA และ I เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin เมื่อมี CoHA ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm

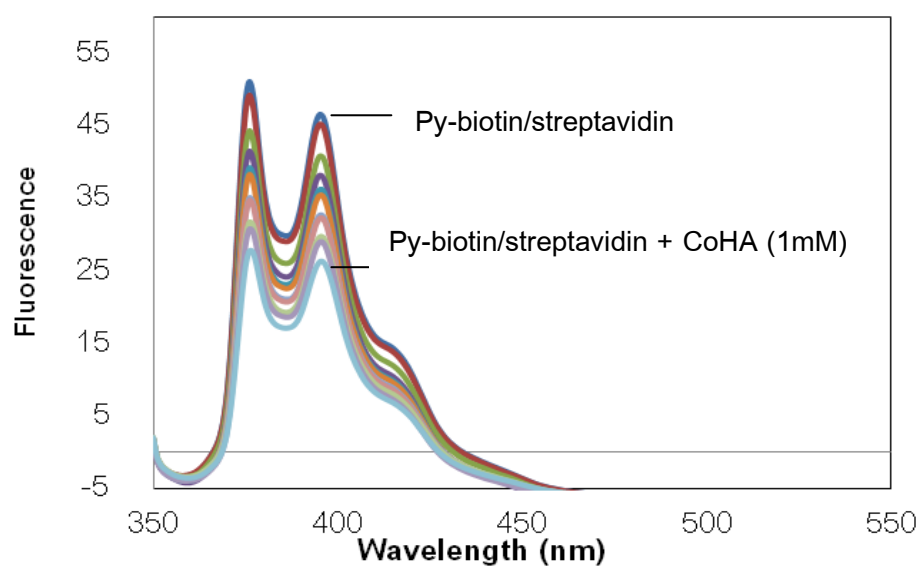
2.3.2 การยับยั้งการคายแสง (quenching) ของ Py-biotin โดย CoHA ในกรณีที่จับกับโปรตีน avidin



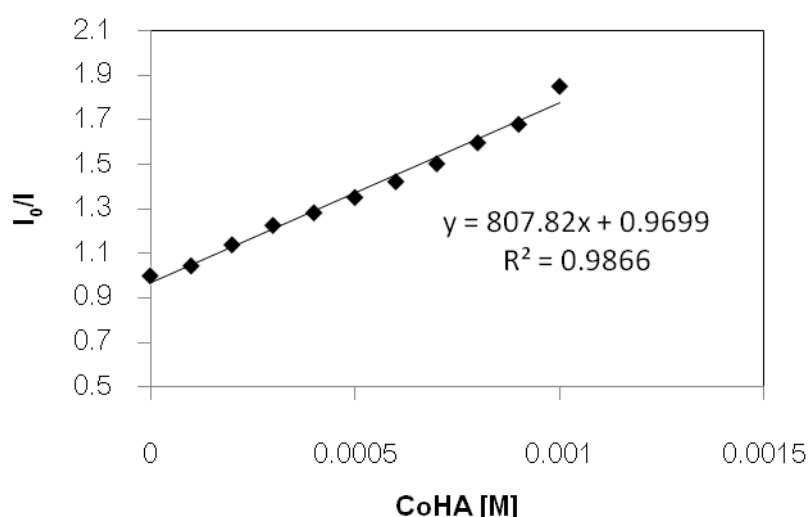
ภาพประกอบ 38 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin (1.8 μ M) ในกรณีที่จับอยู่กับโปรตีน avidin ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm



ภาพประกอบ 39 แสดงกราฟระหว่าง I_0/I ต่อ [CoHA] โดยที่ I_0 เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin/avidin เมื่อไม่มี CoHA และ I เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin/avidin เมื่อมี CoHA ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm



ภาพประกอบ 40 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของ Py-biotin (2 μ M) ในกรณีที่จับอยู่กับโปรตีน streptavidin ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm



ภาพประกอบ 41 แสดงกราฟระหว่าง I_0/I ต่อ [CoHA] โดยที่ I_0 เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin/ streptavidin เมื่อไม่มี CoHA และ I เป็น fluorescence intensity ของ Py-biotin/ streptavidin เมื่อมี CoHA ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 nm

การศึกษาการคายแสงของ Py-biotin โดยใช้ CoHA เป็นตัวยับยั้งการคายแสง (quencher) เพื่อดูความสามารถของ CoHA ในการเข้าถึง Py-biotin ขณะที่จับกับโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับความสามารถของ CoHA ในการเข้าถึง Py-biotin อิสระในบัฟเฟอร์ การที่ Py-biotin อยู่ภายในโปรตีนจะถูกป้องกันไม่ให้ CoHA เข้าถึง แต่ถ้า Py-biotin อยู่ภายนอกหรือที่พื้นผิวโปรตีน จะทำให้ CoHA เข้าถึงได้ และส่งผลให้ fluorescence intensity ของ Py-biotin ลดลง สำหรับ CoHA ที่เลือกใช้เป็นตัวยับยั้งการคายแสง ในงานวิจัยครั้งนี้มีข้อดี คือ สามารถละลายได้ดีใน aqueous solution ไม่ใช่สารที่คายแสงได้ มีการจับกับโปรตีนได้เพียงเล็กน้อย และที่สำคัญสามารถเห็นยว่นำให้เกิดการตัดโปรตีน

เมื่อทำการฉายแสงให้กับสารละลายผสมของ Py-biotin กับ avidin และสารละลายผสมของ Py-biotin กับ streptavidin ที่ความยาวคลื่น 342 nm และวัด fluorescence intensity ที่ความยาวคลื่น 376 nm จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า quenching constant (K_{sv}) ตามสมการของ Stern-Volmer equation ($I_0/I = 1 + K_{sv} [Q]$) โดยค่า K_{sv} ที่คำนวณได้แสดงในตาราง 5

ตาราง 5 แสดงค่า K_{sv} ของ Py-biotin เมื่อไม่มีและมีการจับกับ avidin และ streptavidin

Probe / Protein	ไม่มีการจับกับโปรตีน (free probe)	Py-biotin/avidin	Py-biotin/streptavidin
$K_{sv} (M^{-1})$	1.023×10^3	2.520×10^2	8.078×10^2

จากตาราง 5 แสดงให้เห็นว่า ในกรณีที่ Py-biotin ไม่มีการจับกับโปรตีน CoHA สามารถที่จะเข้าถึง Py-biotin ได้ดีกว่าในกรณีที่ Py-biotin จับกับโปรตีน avidin และ streptavidin ซึ่งดูได้จากค่า K_{sv} ของ free probe ที่มากกว่า ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่า ในกรณีที่ Py-biotin มีการจับกับโปรตีน avidin หมู่ไพรีนในโมเลกุลของ Py-biotin ถูกฝังอยู่ในโปรตีนในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน ทำให้ CoHA ไม่สามารถเข้าถึงหมู่ไพรีนได้ ค่า K_{sv} จึงน้อย แต่การจับกับโปรตีน streptavidin จะจับที่บริเวณผิวด้านนอกของโปรตีนจึงทำให้ CoHA สามารถที่จะเข้าถึง Py-biotin ได้มากกว่า ค่า K_{sv} จึงใกล้เคียงกับค่า K_{sv} ของ free probe

3. การศึกษาการตัดโปรตีน avidin และ streptavidin โดยการกระตุ้นด้วยแสง และตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

3.1 การตัดโปรตีน avidin และ streptavidin โดยการกระตุ้นด้วยแสง

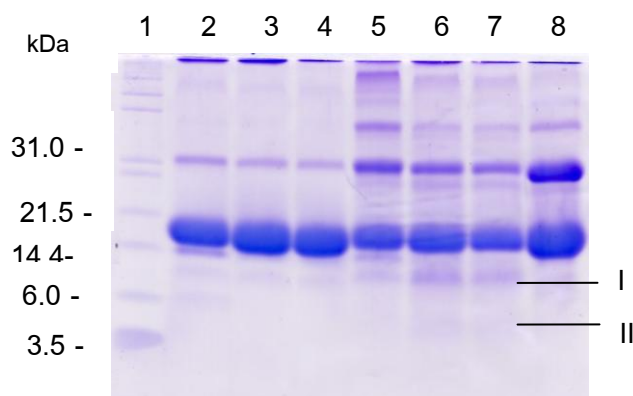
การเตรียมสารละลายผสมของ Py-biotin (15 μ M), avidin หรือ streptavidin (15 μ M) และ CoHA (1 mM) ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl pH 7.0 เตรียมดังในตารางที่ 6

ตาราง 6 การเตรียมปฏิกิริยาสารละลายผสม เพื่อศึกษาการตัดโปรตีน

หลอดที่	รีเอเจนต์			เวลาที่ใช้ในการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 343 nm
1	-	Avidin	-	-
2	Py-biotin	Avidin	CoHA	Control
3	Py-biotin	Avidin	CoHA	5 นาที
4	Py-biotin	Avidin	CoHA	10 นาที
5	Py-biotin	Avidin	CoHA	15 นาที
6	Py-biotin	Avidin	CoHA	20 นาที
7	Py-biotin	Avidin	CoHA	30 นาที
8	Py-biotin	Avidin	-	Control
9	Py-biotin	Avidin	-	15 นาที

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

จากการนำสารละลายผสมที่ผ่านการฉายแสงที่ความยาวคลื่น 343 nm ไปประเหยให้แห้ง และนำมาตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงผลในภาพประกอบ 42 และ 43



ภาพประกอบ 42 แสดง SDS-PAGE ของการตัดโปรตีน avidin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง โดย Py-biotin เมื่อ

Lane 1 : M.W. marker

Lane 2 : 15 μ M avidin

Lane 3 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin , dark control

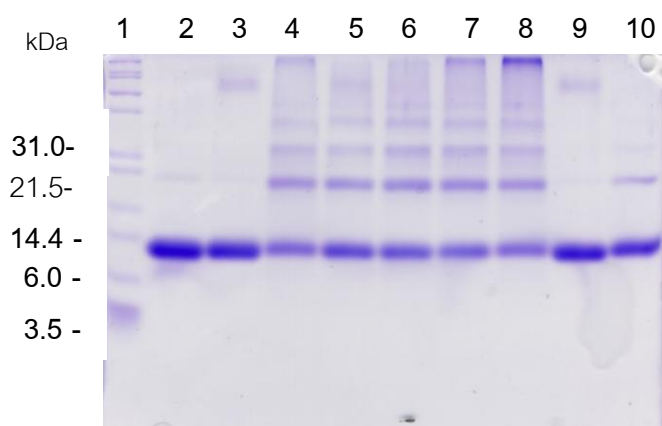
Lane 4 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 5 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 5 min

Lane 6 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 15 min

Lane 7 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 30 min

Lane 8 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin, 343 nm, 15 min



ภาพประกอบ 43 SDS-PAGE ของการตัดโปรตีน streptavidin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง โดย Py-biotin เมื่อ

Lane 1 : M.W. marker

Lane 2 : 15 μ M streptavidin

Lane 3 : 15 μ M streptavidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, dark control

Lane 4 : 15 μ M streptavidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 5 min

Lane 5 : 15 μ M streptavidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 10 min

Lane 6 : 15 μ M streptavidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 15 min

Lane 7 : 15 μ M streptavidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 20 min

Lane 8 : 15 μ M streptavidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 30 min

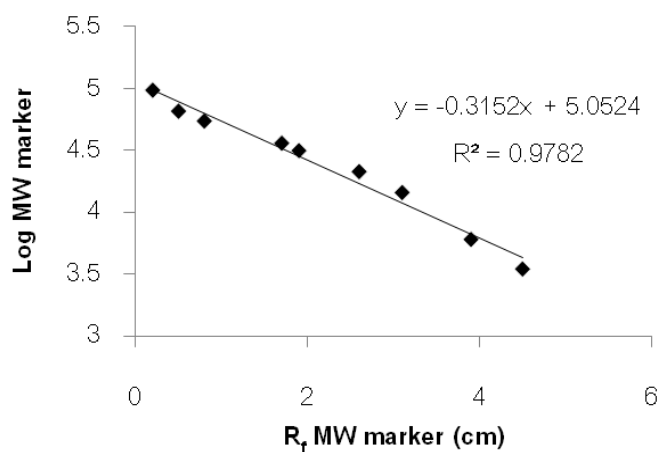
Lane 9 : 15 μ M streptavidin + 15 μ M Py-biotin, dark control

Lane 10 : 15 μ M streptavidin + 15 μ M Py-biotin, 343 nm, 15 min

การตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยเทคนิคทางอิมมูโนโพรบ (SDS-PAGE) พบว่า โปรตีน avidin ถูกตัดได้เปปไทด์ 2 สาย ในขณะที่ streptavidin ไม่เกิดการตัดโปรตีน จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการตัดโปรตีน เมื่อทำการฉายที่ 343 nm จะเริ่มเกิดที่เวลา 5 นาที และการตัดโปรตีน จะขาดสารตัวใดตัวหนึ่ง หรือแสงไม่ได้ เมื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเปปไทด์ทั้ง 2 สาย พบว่า เปปไทด์สายที่ I และ II มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 9.57 และ 5.75 kDa ตามลำดับ

การคำนวณหามวลโมเลกุลของของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดโปรตีนเอวดีนทั้ง 2 เปปไทด์

MW (โปรตีนมาตรฐาน)	R _f (MW) (โปรตีนมาตรฐาน)	log MW (โปรตีนมาตรฐาน)	R _f (fragment)	MW (frangment)
(kDa)	(cm)		(cm)	(kDa)
97.4	0.2	4.99		
66.3	0.5	4.82		
55400	0.8	4.74		
36500	1.7	4.56		
31000	1.9	4.5		
21500	2.6	4.33		
14400	3.1	4.16		
6000	3.9	3.78	3.4	9.57
3500	4.5	3.54	4.1	5.75



ภาพประกอบ 44 กราฟระหว่าง logarithm ของมวลโมเลกุล (log M) ของโปรตีนมาตรฐานกับ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเปปไทด์บนเจล

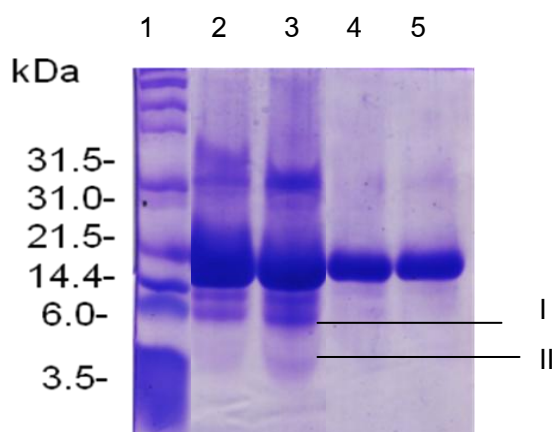
อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ (mobility) ของสายเปปไทด์ จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับ logarithm ของมวลโมเลกุลของโปรตีน (log M) ดังสมการ

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

โดยที่ a และ b เป็นค่าคงที่ และ x คืออัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสายเพปไทด์ จากการคำนวณหามวลโมเลกุลของ fragments ที่ระยะทางของเพปไทด์เป็น 3.4 และ 4.1 เซนติเมตร พบว่ามีมวลโมเลกุลประมาณ 9.57 และ 5.75 kDa

3.3 ศึกษาการยับยั้งการตัดโปรตีน avidin โดยการใช้ biotin

ผลของ biotin ที่มีต่อการตัดโปรตีน avidin จะทำการศึกษาโดย ผสม avidin (15 μ M) กับ biotin (15 μ M) ก่อนเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเติม CoHA และ Py-biotin และทำการทดลองขั้นตอนต่อไปเหมือนการศึกษาการตัดโปรตีน avidin



ภาพประกอบ 45 SDS-PAGE แสดงการยับยั้งการตัดโปรตีน avidin ที่ตำแหน่งจำเพาะด้วยแสง โดย biotin (15 μ M) เมื่อ

Lane 1 : M.W. marker

Lane 2 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 5 min

Lane 3 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 10 min

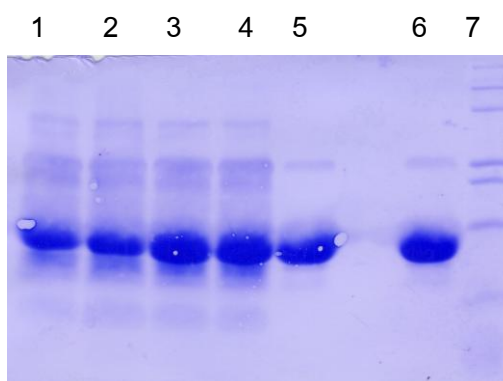
Lane 4 : 15 μ M (avidin + biotin) + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 5 min

Lane 5 : 15 μ M (avidin + biotin) + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 10 min

ผลการศึกษาการยับยั้งการตัดโปรตีน avidin ด้วย biotin โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดเป็น 1:1 พบว่า biotin จะมีอิทธิพลต่อการตัดโปรตีนของ Py-biotin ดังแสดงในภาพประกอบ 45 จากรูปแบบการตัดโปรตีนที่ได้ พบว่า biotin จะยับยั้งการตัดโปรตีน avidin ซึ่งจะเห็นได้จาก เพปไทด์สายที่ I และ II ใน Lane 4 และ Lane 5 จะหายไปเมื่อเทียบกับ Lane 2 และ Lane 3 ซึ่งไม่มีการเติม biotin และทำการทดลองที่สภาวะเดียวกัน

4. การย้ายโปรตีน (protein transfer) โดย Western Blot เพื่อหาลำดับกรดอะมิโน

เมื่อตรวจสอบการตัดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้ว จะทำการย้ายโปรตีนที่ได้ เพื่อหาลำดับของกรดอะมิโนต่อไป การทดลองในขั้นตอนนี้ จะใช้สภาวะในการ transfer ดังนี้คือ กระแสไฟฟ้า 140 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เวลา 60 นาที และ CAPs buffer, pH 10.95 เป็นอิเล็กโทรไลต์ ผลการ transfer ที่ได้แสดงในภาพประกอบ 46



ภาพประกอบ 46 PVDF membrane ของ avidin ที่ผ่านการฉายแสง เมื่อ

Lane 1 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 30 min

Lane 2 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 30 min

Lane 3: 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 15 min

Lane 4 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, 343 nm, 15 min

Lane 5 : 15 μ M avidin + 15 μ M Py-biotin + 1 mM CoHA, control

Lane 6 : 15 μ M avidin

Lane 7 : M.W. marker

การหาลำดับกรดอะมิโนที่ถูกตัดจะทำโดยส่งไปวิเคราะห์ที่ Midwest analytical, Inc. พบว่า 5 ลำดับของกรดอะมิโน ที่ได้จาก fragment ที่มีมวลโมเลกุล 9.57 kDa มีลำดับของกรดอะมิโน เป็น ARKCS (Ala-Arg-Lys-Cys-Ser) และ 5 ลำดับของกรดอะมิโนที่ได้จาก fragment ที่มีมวลโมเลกุล น้อยที่สุด (5.75 kDa) และเป็น minor product มีลำดับของกรดอะมิโน เป็น VFTGQ (Val-Phe-Thr-Gly-Glu) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ avidin พบว่าการตัดเกิดขึ้นที่ตำแหน่งระหว่าง Thr(77) – Val(78)

H₂N-AlaArgLysCysSer.....GluSerThrThr(77) – Val(78)PheThrGlyGlu.....COOH

N-terminal fragment

C-terminal fragment (5.75 kDa)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

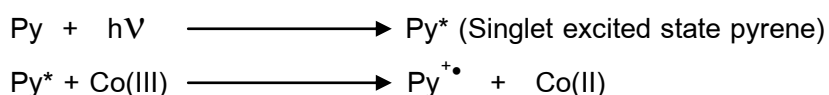
งานวิจัยได้ศึกษาการตัดโปรตีน avidin และ streptavidin ด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ โดยการกระตุ้นด้วยแสง ซึ่งจะสรุปผล อภิปรายผลการวิจัย และให้ข้อเสนอแนะดังนี้

จากการศึกษาการตัดโปรตีนโดยใช้ Py-biotin เป็น probe โดยโมเลกุลนี้ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ส่วนที่มีขั้ว (polar) และ linker สายสั้นๆ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำซึ่งเป็นหมู่ไพรีนจะทำหน้าที่รับแสง ความยาวคลื่นสูงสุด เท่ากับ 342 nm ในช่วงความยาวคลื่น 300-400 nm พบว่า avidin ถูกตัด เมื่อทำการฉายแสงที่ 343 nm สารละลายผสมของ Py-biotin (15 μM) + avidin (15 μM) + CoHA (1 mM) โดยการตัดโปรตีนนั้น ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ถ้าไม่มี Py-biotin หรือ CoHA หรือ แสง อย่างใดอย่างหนึ่ง

เนื่องจากไพรีนเป็นโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 300-400 nm ซึ่งเป็น ช่วงความยาวคลื่นที่โปรตีนไม่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคทางสเปกโตรสโกปีในการศึกษาการจับกับโปรตีน และไพรีนมีสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (absorption extinction coefficient) ที่สูง ประมาณ $1.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ที่ 342 nm จึงสามารถใช้ความเข้มข้นน้อย (μM) ในการรับแสงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

การเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ Py-biotin เมื่อจับกับ avidin และ streptavidin แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม (microenvironment) ของหมู่ไพรีนขณะจับกับโปรตีน ซึ่งเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งสเปกตรัมไปที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น (red shift) ทั้งใน Py-biotin/avidin และ Py-biotin/streptavidin การลดลงของการคายแสงของ Py-biotin/avidin และ Py-biotin/streptavidin เนื่องมาจากการที่หมู่ไพรีนเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่อยู่ภายในโปรตีน เช่น tryptophan หรือ tyrosine จึงทำให้ fluorescence intensity ลดลง

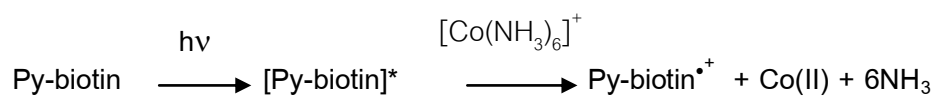
จากการศึกษาการตัดโปรตีนที่ผ่านมาโดยใช้โมเลกุลที่เป็นอนุพันธ์ของไพรีน (Py-Phe) (Kumar; et al. 1998: 10361-10366) พบว่าความสามารถในการตัดโปรตีนอธิบายได้จากความสามารถของ CoHA ที่ไปยับยั้ง (quench) การคายแสงของหมู่ไพรีนในสภาวะกระตุ้น (excited state pyrene, Py^*) ซึ่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการตัดโปรตีนเป็นดังนี้



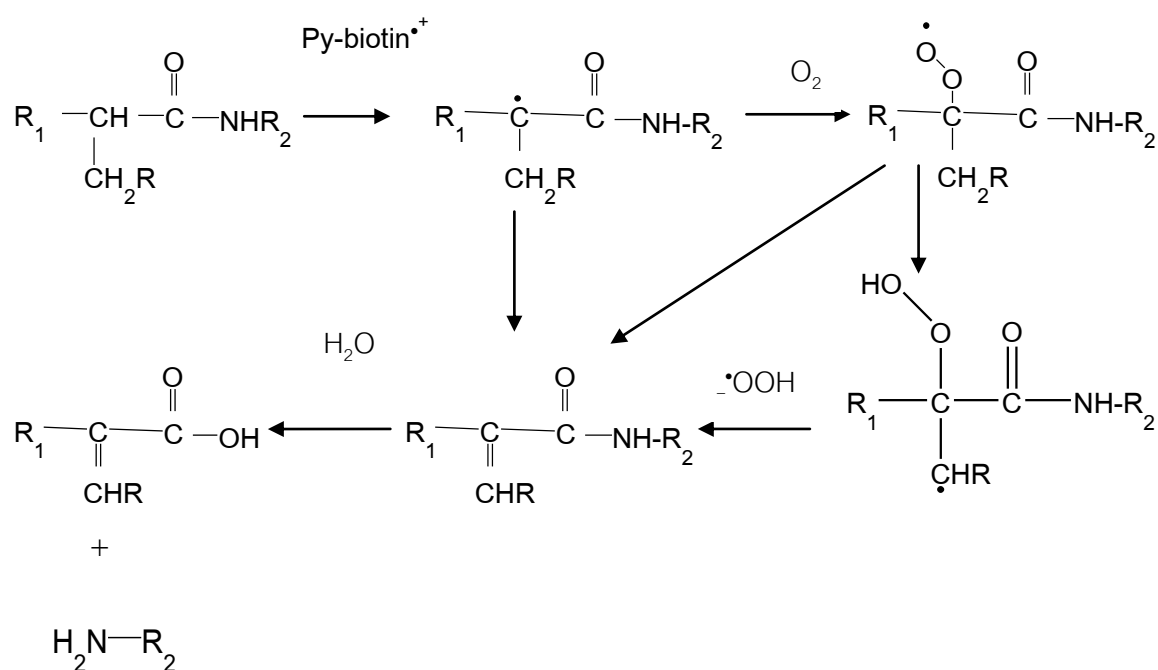
$\text{Py}^{+\bullet}$ คือ pyrene cation radical ซึ่ง $\text{Py}^{+\bullet}$ เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่สำคัญในการตัดโปรตีน การตัดของพันธะเพปไทด์ในโปรตีนอาจเกิดจากการดึงอะตอมของไฮโดรเจนออก

จากแอลฟาคาร์บอนของกรดอะมิโนตัวหนึ่งในโปรตีน ตรงตำแหน่งที่ probe จับ เกิดเป็นอนุมูลอิสระของแอลฟาคาร์บอน ซึ่งจะเกิดการสลายด้วยน้ำของพันธะเพปไทด์ขึ้น และทำให้โปรตีนถูกตัด

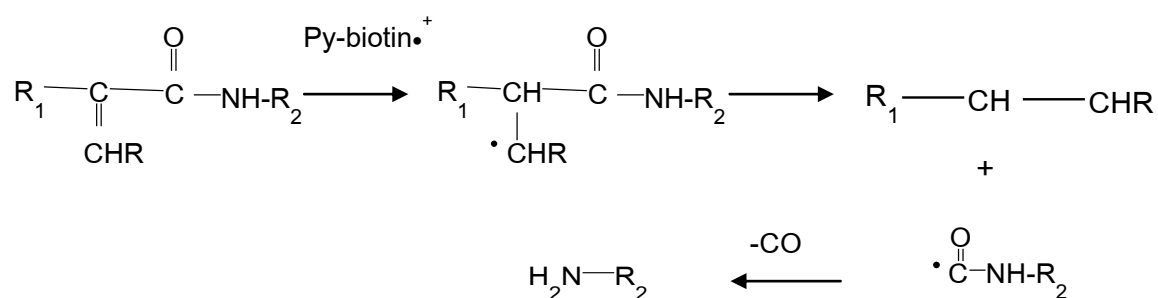
ดังนั้นกลไกที่เป็นไปได้ในการตัดโปรตีน avidin ด้วยแสงจึงคาดว่าเหมือนกับกลไกการตัดโปรตีนในกรณีของ Py-Phe ซึ่งบูรณประพุกษ์ และคนอื่นๆ (Buranaprapuk; et al. 2008 : 9258-9265) ได้นำเสนอไว้จะมี 2 กลไก (ภาพประกอบ 47) ได้แก่ การหลุดของอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งแอลฟา (α -hydrogen abstraction) และ การหลุดของอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งบีต้า (β -Hydrogen abstraction) การหลุดของอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งแอลฟา จะเริ่มจาก Py-biotin^{•+} ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากฉายแสง เข้าไปจับกับอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน (α -carbon) ของ selected amino acid residues จากนั้นเกิดการเติมออกซิเจน (O_2) ที่ตำแหน่ง carbon-centered radical ได้เป็น hyperoxyl radical ($-C-COO^\bullet$) แล้วเกิดการตัดพันธะเพปไทด์โดยการสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) การหลุดของอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งแอลฟา ทำให้เกิดการตัดทางด้านปลาย C (C-terminal) ของ amino acid residue สำหรับการหลุดของอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งบีต้าจะทำให้เกิดการตัดทางด้านปลาย N (N-terminal) ของ amino acid residue ซึ่งการหลุดของอะตอมไฮโดรเจนทั้งสองแบบสามารถนำไปหาลำดับหรือชนิดของกรดอะมิโนทางปลายอะมิโน (N-terminus) ได้



การหลุดของอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งแอลฟา (α -Hydrogen abstraction)



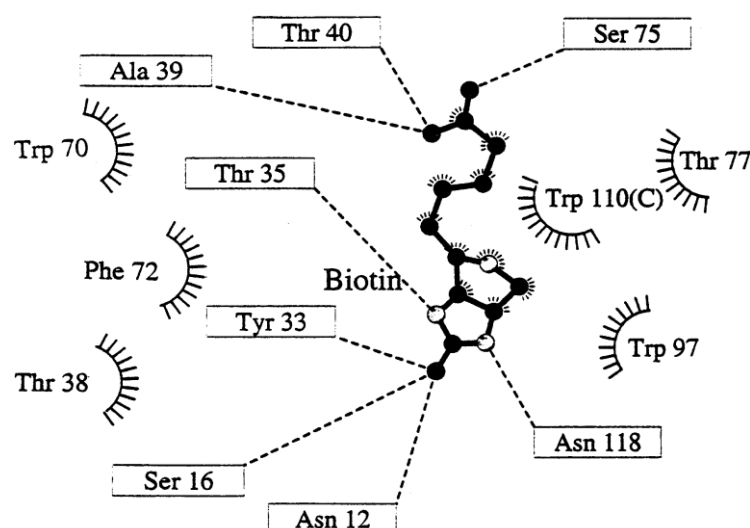
การหลุดของอะตอมไฮโดรเจนที่ตำแหน่งบีต้า (β-Hydrogen abstraction)



ภาพประกอบ 47 กลไกที่เป็นไปได้ในการตัดโปรตีน avidin

จากการวิจัยนี้จะพบว่าโปรตีน avidin จะถูกตัด ในขณะที่โปรตีน streptavidin ไม่ถูกตัด ถ้าพิจารณาที่ค่า K_{sv} จะเห็นได้ว่า ในกรณีที่ Py-biotin จับอยู่กับ avidin ($K_{sv} = 2.520 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$) จะน้อยกว่า ในกรณีที่ Py-biotin จับอยู่กับ streptavidin ($K_{sv} = 8.078 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า CoHA ที่ไปยับยั้ง (quench) การคายแสงของหมู่ไพรีนในสภาวะกระตุ้น (excited pyrene, Py^*) ในกรณีที่ Py-biotin จับอยู่กับ streptavidin ได้มากกว่า ซึ่งน่าจะทำให้เกิดการตัดโปรตีน streptavidin แต่ไม่เกิด ซึ่งอาจเนื่องมาจากโครงสร้างของ streptavidin เอง ดังนั้นค่า K_{sv} จึงไม่สามารถบอกได้ว่าการตัดโปรตีนหรือไม่

เมื่อเทียบตำแหน่งที่ถูกตัดของโปรตีน avidin กับภาพ 3 มิติ ของ avidin-biotin binding site จะพบว่า ใกล้เคียงกับที่ โรซาโน และคนอื่นๆ (Rosano; et al. 1999 : 5-12) ได้นำเสนอไว้ ซึ่ง Thr(77) จะเกิด binding กับอะตอมซัลเฟอร์ (S) ของโมเลกุล biotin ดังนั้น threonine amino acid อาจเกิดพันธะไฮโดรเจน (H-bond) กับอะตอมซัลเฟอร์ จึงทำให้เกิดการตัดโปรตีน avidin ที่ตำแหน่ง ใกล้เคียงกับ biotin binding site



ภาพประกอบ 48 ภาพ 3 มิติ ของ avidin-biotin binding site ใน avidin subunit

ที่มา: Rosano; et al. (1999): *The X-ray three-dimensional structure of avidin*.p.9.

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- มนตรี จุฬารัตนทล; และคณะ. (2542). *ชีวเคมี*. กรุงเทพฯ: จีรรัชการพิมพ์.
- อภิญา ชัยวิสุทธิทางกูร. (2552). *เคมีเชิงฟิสิกส์และการประยุกต์ใช้ในงานวิจัย*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: แดเน็กซ์ อินเทอร์เน็ตคอร์ปอเรชั่น.
- 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.
- Nelson, D. L.; & Cox, M. M. (2008). Principle of Biochemistry. 5th ed ; New York: Freeman
- Diamandis, E. P.; & Christopoulos, T. K. (1991). The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clinical Chemistry*. 37: 625-636.
- 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>
- 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.
- 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.; 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. (1997). Site-Specific Photocleavage of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36: 2085-2087.
- (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.
- (2001). Large Chiral Discrimination of a Molecular Probe by Bovine Serum Albumin. *Chem. Comm.* 297-298.
- (2002). 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.
- Kumar, C.V.; & Thota, J. (2005). Photocleavage of lysozyme by Cobalt(III) complexes. *Inorganic Chemistry*. 44: 825-827.
- Lipoprotein Analysis. (2008). Electrophoresis. Retrieved April 30, 2010, from <http://www.39kf.com/medicine/pro/experimental/Biochemistry-experiment/02/2008-02-03-451236.shtml>.
- Maruta, S.; et al. (1998). ADP/vanadate mediated photocleavage of myosin light chain kinase at the autoinhibitory region. *J. Biochem. (Tokyo)*. 124: 557-564.
- Panhorst, M. (2005). *Ph.D. Thesis in physics: On-chip manipulation and positioning of biomolecules with magnetic beads*. Retrieved April 3, 2010, from <http://www.panhorst.com/PhD/thesis/html>.
- Protein structure. (2010). Retrieved March 30, 2010, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=iga&part=A1622>.
- 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.

- Rosano, C.: et al. (1999). The X-ray three-dimensional structure of avidin. *Biomolecular Engineering*. 16: 5-12.
- 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.

ภาคผนวก

อภิธานศัพท์

α	= alpha
AMAC	= 9-anthryl-methylamine hydrochloride
APAC	= 3-(9-anthryl)propylamine hydrochloride
Arg	= arginine
ASC	= ascorbic acid
β	= beta
BSA	= bovine serum albumin
CAPS	= Cyclohexylaminopropane sulfonic acid
CoHA	= hexamine cobalt(III) trichloride
DCC	= N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DTT	= dithiothreitol
Fe(EDTA)	= iron(II) ethylenediamine
hGH	= Human growth hormone
His	= histidine
Leu	= leucine
OH $\cdot$	= hydroxyl radical
PBAC	= 4(1-pyrenyl)butylamine chloride
Phe	= phenylalanine
pI	= isoelectric point
PITC	= phenylisothiocyanate
PVDF	= polyvinylidene fluoride
Py $^{+\bullet}$	= pyrene cation radical
SDS	= sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	= sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
TFE	= trifluoperazine

TEMED	= N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TFA	= trifluoroacetic acid
Trp	= tryptophan
Tyr	= tyrosine
Val	= valine

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อสกุล	นางสาวปิ่นปิ่นทร์ มะลัยแก้ว
วันเดือนปีเกิด	5 ตุลาคม พ.ศ. 2520
สถานที่เกิด	จังหวัดชัยภูมิ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 220 หมู่ 10 ตำบลนาหนองทุ่ม อำเภอแก้งคร้อ จังหวัดชัยภูมิ 35150
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2538	มัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนแก้งคร้อ อำเภอแก้งคร้อ จังหวัดชัยภูมิ
พ.ศ. 2543	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2553	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมี จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพมหานคร