

บทที่ 5 โปรตีน II

สรุปสาระสำคัญของการทดลอง

1. การตกตะกอนโปรตีน ทำเพื่อ

- นำโปรตีนมาใช้ประโยชน์ต่อ เช่น ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ต้องใช้วิธีที่โปรตีนไม่เสียสภาพธรรมชาติ เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

- กำจัดโปรตีน เพื่อไม่ให้ปนกับสารอื่นที่ต้องการศึกษา เช่น DNA

2. โปรตีนที่ศึกษาทดลองในครั้งนี้อยู่ประกอบด้วยโปรตีนในน้ำนม และโปรตีนในไข่ขาว

3. โปรตีนในน้ำนม ประกอบด้วยโปรตีนหลัก 3 ชนิดคือ casein, lactalbumin และ lactoglobulin

4. casein มีค่า $pI = 4.8$ สามารถตกตะกอนออกมาได้โดยปรับ pH น้ำนมด้วยกรดไฮโดรคลอริก และใช้ pH meter วัดค่า pH ตลอดเวลา ส่วนใสจะประกอบด้วยโปรตีนอีก 2 ชนิดที่เหลือ

5. lactalbumin จะตกตะกอนได้ ต้องเติม ammonium sulfate จนอิ่มตัว 100%

6. lactoglobulin จะตกตะกอนได้ ต้องเติม ammonium sulfate จนเข้มข้น 34-50% ของความอิ่มตัวขึ้นไป

7. การต้ม จะทำให้ lactalbumin และ lactoglobulin เกิดการจับตัวเป็นก้อนลิม (coagulate) ได้ แต่ casein ไม่เกิด coagulate

8. ไข่ขาว ประกอบด้วยโปรตีน albumin และ globulin

9. การตกตะกอนด้วย cation ต้องปรับ pH ให้มีประจุสุทธิเป็นลบ (โดยทั่วไปคือเป็นกลางหรือต่างเล็กน้อย) ในห้องปฏิบัติการใช้ cation 2 ชนิดคือ Zn^{2+} ในรูป zinc acetate และ Hg^{2+} ในรูปปรอทคลอไรด์ เมื่อได้ตะกอนโปรตีนแล้ว ถ้าเติม EDTA ลงไป EDTA จะทำหน้าที่เป็น chelating agent ดึง cation กลับออกมาจากโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายได้อีก

10. การตกตะกอนด้วย anion ต้องทำที่ค่า pH เป็นกรดมากกว่าค่า pI ของโปรตีนนั้น ๆ เพื่อให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นบวก ในห้องปฏิบัติการใช้กรด picric, กรด trichloroacetic และ sodium tungstate เมื่อได้ตะกอนโปรตีนแล้ว ถ้าเติม NaOH ลงไป Na^+ จะไปดึง anion กลับมาจากโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายได้อีก

คำถามท้ายบท

การทดลอง 5.1-5.3

เมื่อนำตะกอนทั้ง 3 หลอด (หลอดที่ 1 และ 2 จากการทดลองที่ 5.2 และหลอดที่ 3 จากการทดลองที่ 5.3) ไปละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ตะกอนจะละลายทุกหลอดหรือไม่ เพราะเหตุใดจงอธิบาย

ตอบ หลอดที่ 1 กับหลอดที่ 2 เป็นโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนยังไม่เสียสภาพธรรมชาติ จึงละลายได้เมื่อเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ส่วนหลอดที่ 3 เป็นโปรตีนที่เกิด coagulate จากการต้ม ไม่สามารถละลายได้อีก เพราะโปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (denatured) ไปแล้ว

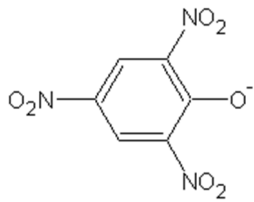
การทดลอง 5.4

EDTA ทำหน้าที่อย่างไร จงอธิบาย

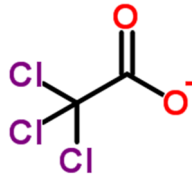
ตอบ ทำหน้าที่เป็น chelating agent จับกับ cation ทำให้โปรตีนสามารถละลายได้อีก

การทดลอง 5.5

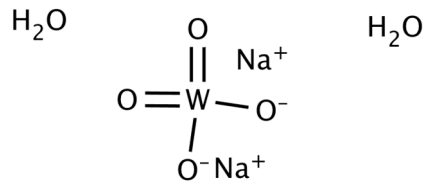
1. แอนไอออนที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนครั้งนี้คืออะไร (เขียนตอบในรูปโครงสร้างเคมีของแอนไอออนนั้น ๆ)



Picrate



Trichloroacetate



Na tungstate

2. แอนไอออนที่ใช้ในครั้งนี้อาจสามารถตกตะกอนได้สำเร็จทุกชนิดหรือไม่ เพราะเหตุใด จงสรุปสถานะที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

ตอบ ตกตะกอนสำเร็จเพียงบางชนิด แอนไอออนที่ตกตะกอนได้ดีจะเป็นแอนไอออนที่มีขนาดใหญ่ เช่น กรดพิคริก และโปรตีนที่ตกตะกอนได้ดีต้องมีค่า pI ค่อนข้างสูง เพื่อให้ที่สถานะของการทดลอง จะมีค่า pH ต่ำกว่าค่า pI โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นบวก ทำให้รวมตัวกับแอนไอออนได้

3. เพราะเหตุใดการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จึงทำให้โปรตีนกลับมาละลายได้อีก และโปรตีนที่สามารถกลับมาละลายได้อีกนั้น สภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นอย่างไร เหตุใดจึงเป็นเช่นนั้น

ตอบ Na^+ ไปแย่งจับกับ anion และ OH^- ยังทำให้ค่า pH สูงขึ้น ทำให้โปรตีนไม่มี anion มาจับ และละลายได้อีก โดยโปรตีนยังไม่เสียสภาพธรรมชาติ

การทดลองที่ 6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเคลดาล์ล

แบบฝึกหัด

ในการหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของเลือดหมอบแห้ง ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างอย่างละเอียดแล้วใส่ลงในขวดเคลดาล์ล เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 4 มิลลิลิตร และโปตัสเซียมซัลเฟต 1.5 กรัม ต้มย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 40 ลงไป 15 มิลลิลิตร นำไปกลั่นและรองรับสิ่งที่กลั่นได้ลงในภาชนะที่มีสารละลายบอริกเข้มข้นร้อยละ 0.2 และอินดิเคเตอร์ผสมอยู่ รวมปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลายกรดมาตรฐานไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.0196 โมลาร์ การวิเคราะห์นี้ได้มีการทำสารละลายเปล่าควบคู่ไปด้วย โดยไม่มีการใส่ตัวอย่างลงไป บันทึกผลที่ได้ลงไว้ดังนี้

	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิกรัม) (ต)	100.1	100.2
ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ (มิลลิลิตร)		
(ก) ในขวดตัวอย่าง	10.2	10.4
(ข) ในขวดสารละลายเปล่า	0.2	0.2

ปริมาณของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจริง (มิลลิลิตร)		
(ค = ก-ข)	10.0	10.2
คิดเป็นมิลลิโมลของแอมโมเนียที่เกิด จากการย่อย เท่ากับ		
(ง = ค × 0.0196)	0.19600	0.19992
คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างได้ เท่ากับ (มิลลิกรัม)		
(จ = ง × 14)	2.74400	2.79888
คิดเป็นร้อยละไนโตรเจนในตัวอย่าง เท่ากับ (%N)		
(ฉ = จ / [(ต1 + ต2)]/2 × 100)	2.73989	2.79469
ร้อยละปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเท่ากับ (%) (ซ = ฉ × 6.25)	17.12	17.47
สรุป ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเลือดหมอบแห้ง เท่ากับ 2.77 มิลลิกรัม ร้อยละปริมาณโปรตีนในเลือดหมูแห้ง เท่ากับ 17.295		

คำถาม จงแสดงวิธีคิดให้เห็นว่าโปรตีนที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 16 มีตัวคูณเป็น 6.25 ในการหาร้อยละ
ปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

วิธีทำ โปรตีน 100 ส่วน มีไนโตรเจนอยู่ 16 ส่วน

ดังนั้นไนโตรเจน 16 ส่วน มีอยู่ในโปรตีน 100 ส่วน

ไนโตรเจน 1 ส่วน จึงมีอยู่ในโปรตีน $(100/16) \times 1 = 6.25$

นั่นคือ ถ้ารู้ปริมาณไนโตรเจน ก็รู้ปริมาณโปรตีนได้ โดยการคูณด้วย 6.25

ข้อสอบ Midterm เป็นแบบปรนัย กขคง 80 ข้อ

บทที่ 1 – 5 บทละ 14 ข้อ

บทที่ 6 จำนวน 2 ข้อ

คำถามท้ายบท 8 ข้อ