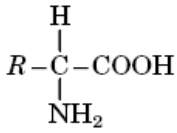
การทดลองที่ 4	กรดอะมิโนและโปรตีน 1

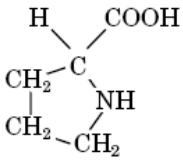
อ. ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์

วัตถุประสงค์ 1. เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีบางประการของกรดอะมิโนและโปรตีน
2. เพื่อให้รู้จักวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

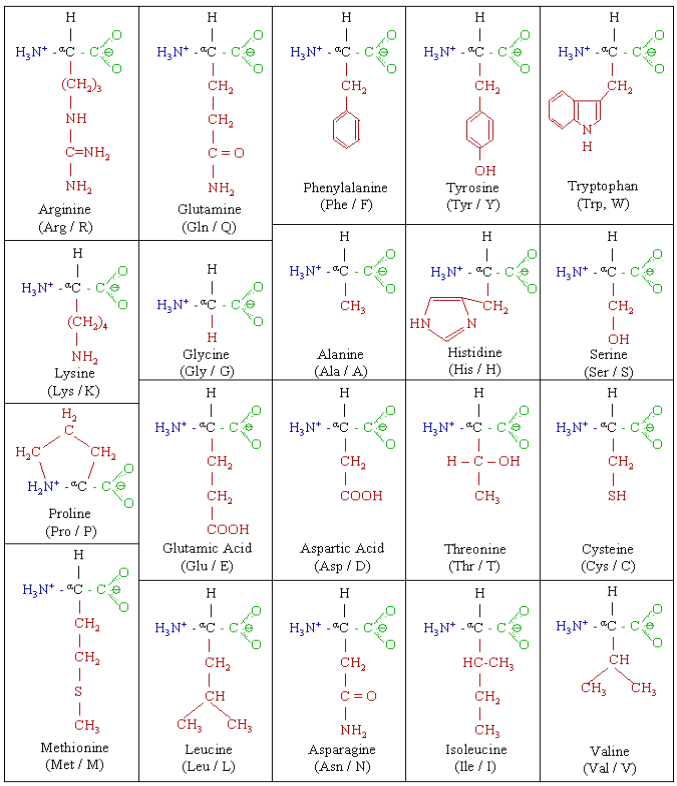
โปรตีนเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบขึ้นจากมอโนเมอร์ที่เรียกว่า **กรดอะมิโน** ซึ่งมีอยู่ 20 ชนิดด้วยกันในจำนวนนี้มี 19 ชนิดที่มีโครงสร้างทั่วไปเป็นดังนี้



แต่ละชนิดมีความแตกต่างที่หมู่ R ดังรูปที่ 1 ยกเว้นกรดอะมิโนโพรลีน ซึ่งหมู่ R เกิดพันธะกับไนโตรเจนอะตอม เกิดเป็นกรดอิมิโน ดังมีโครงสร้างต่อไปนี้



โครงสร้างของกรดอะมิโนในธรรมชาติเป็น แอล-ไอโซเมอร์ ยกเว้นกรดอะมิโนไกลซีน



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของกรดอะมิโนแต่ละชนิด อะตอมที่มีสีแดงแสดงถึงหมู่ R ของกรดอะมิโน
ที่มา : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amino_acids_2.png

โครงสร้างหมู่ R ของกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด แสดงไว้ในรูปที่ 1 ตำแหน่งคาร์บอนอะตอมที่เป็นศูนย์กลางเรียกว่า ตำแหน่ง α คาร์บอนที่อยู่ถัดไปทางหมู่ R เรียก β, γ, δ (อ่านว่า เดลต้า) ε (อ่านว่า เอปซิลอน) และ ξ (อ่านว่า เซต้า) ตามลำดับ กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีชื่อย่อที่แทนด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ภาษาอังกฤษ 1 ตัวหรืออักษรภาษาอังกฤษ 3 ตัวโดยที่อักษรตัวแรกต้องเป็นตัวพิมพ์ใหญ่เสมอ ดังแสดงในรูปที่ 1

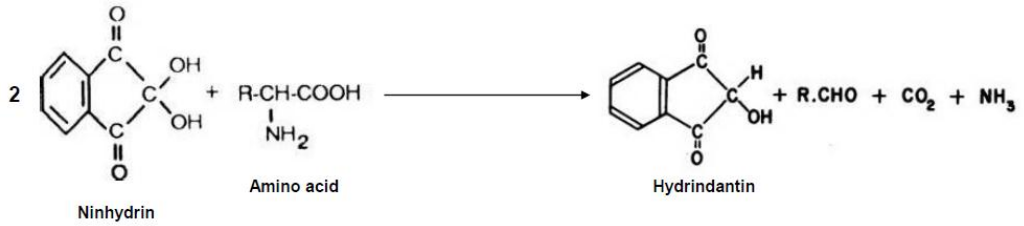
โปรตีนเป็นมหโมเลกุลเกิดจากการเชื่อมต่อของกรดอะมิโนโดยพันธะเพปไทด์ กรดอะมิโนแต่ละหน่วยในโปรตีนเรียกว่า **กรดอะมิโนส่วนที่เหลือ (amino acid residue)** โปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกันที่จำนวนกรดอะมิโนที่ต่อเชื่อมกันและลำดับของกรดอะมิโน

ปฏิกิริยาต่าง ๆ ของกรดอะมิโน

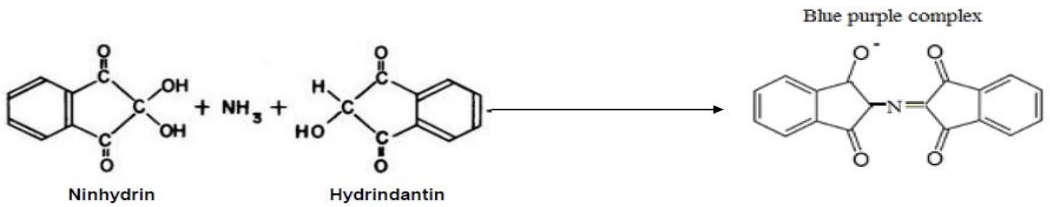
ปฏิกิริยาเคมีของกรดอะมิโน เกิดขึ้นจากหมู่แอลฟาอะมิโน หรือ แอลฟาคาร์บอกซิลิก หรือจากหมู่ R ของกรดอะมิโนบางชนิด ปฏิกิริยาที่ศึกษาในการทดลองนี้มีดังนี้

ปฏิกิริยานินไฮดริน (Ninhydrin reaction)

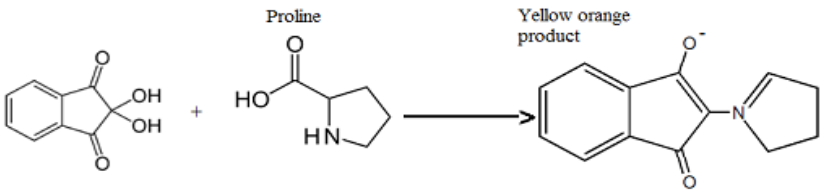
นินไฮดริน (triketohydrindene hydrate) ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่แอลฟาอะมิโนของกรดอะมิโนที่พีเอช 4-8 ให้สารที่มีสีน้ำเงินม่วงเกิดขึ้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีอยู่ 2 ขั้นตอนด้วยกัน ขั้นแรกเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและนินไฮดรินเกิดสารประกอบไฮดรินแดนติน (hydrindantin) อัลดีไฮด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแอมโมเนียขึ้นดังสมการ



ในขั้นที่ 2 แอมโมเนียที่เกิดขึ้นจากขั้นแรกเข้าทำปฏิกิริยากับไฮดรินแดนตินและนินไฮดรินอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดสารประกอบที่ให้สีน้ำเงินม่วง ที่เรียกว่า Ruhemann purple color (diketohydrindamine-diketo-hydrindylidene) ดังสมการ



กรดอิมิโน ได้แก่ โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนเมื่อเกิดปฏิกิริยากับนินไฮดรินจะให้สารประกอบที่มีสีเหลืองแทน ดังสมการ



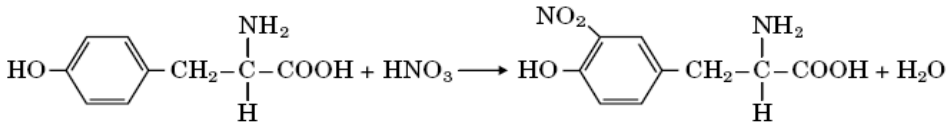
นอกจากนี้สารประกอบพวกเอมีนปฐมภูมิ (primary amine)และแอมโมเนียก็สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกัน แต่ไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น

ปฏิกิริยานี้มีความไวสูงจึงมีประโยชน์ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ตัวอย่างของการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เช่น การระบุตำแหน่งของกรดอะมิโนที่แยกได้หลังการทำโครมาโทกราฟีแบบกระ-

ดาษ (จะได้ปฏิบัติในการทดลองเรื่อง โครมาโตกราฟีหลักการแบ่งส่วน) ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณ เช่น การหาปริมาณกรดอะมิโนในสารละลาย โดยการวัดความเข้มของสีน้ำเงินม่วงและสีเหลืองที่เกิดขึ้นจากปฏิ-กิริยา ซึ่งวัดค่าการดูดแสงได้ที่ 570 และ 440 นาโนเมตรตามลำดับ ความเข้มของสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่

ปฏิกิริยาแซนโธโพรทีอิก (Xanthoproteic reaction)

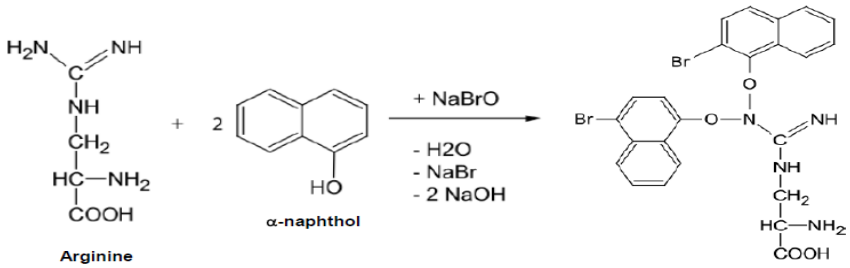
ปฏิกิริยานี้ทดสอบกรดอะมิโนที่มีวงแหวนแอโรแมติก (aromatic ring) ที่แขนงข้าง ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโนไทโรซีน ทริพโตเฟน และเฟนิลอะลานีน โดยเกิด nitration ที่วงแหวนแอโรแมติกเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไนตริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ได้สารละลายสีเหลืองใส สารละลายนี้เมื่อทำให้เป็นด่างจะได้เกลือที่มีสีส้ม ซึ่งเป็นผลบวกของปฏิกิริยา โปรตีนที่มีกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นองค์ประกอบอยู่ก็สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เช่นเดียวกัน



Tyrosine Colored compound

ปฏิกิริยาซากากูชิ (Sakaguchi reaction)

ปฏิกิริยานี้ทดสอบกรดอะมิโนที่มีหมู่กัวนิดีน (guanidine) ที่แขนงข้าง ซึ่งมีอยู่เพียงชนิดเดียว คือ กรดอะมิโนอาร์จินีน โดยให้สารละลายสีแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับแอลฟาแนพธอลและโซเดียมไฮโปโบรไมต์ โปรตีนที่มีกรดอะมิโนอาร์จินีนเป็นองค์ประกอบก็สามารถให้ผลบวกได้เช่นเดียวกัน



ปฏิกิริยาตะกั่วซัลไฟด์ (Lead sulphide reaction)

ปฏิกิริยานี้ทดสอบกรดอะมิโนที่มีธาตุซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบและธาตุซัลเฟอร์ที่อยู่ในโมเลกุลนั้นถูกทำลายได้ง่ายในสารละลายที่เป็นด่าง ได้แก่ กรดอะมิโนซิสเทอีน(cysteine) และซีสทีน(cystine) ยกเว้นกรดอะมิโนเมทไธโอนีน เมื่อต้มกรดอะมิโนดังกล่าวในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นจะให้โซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) ซึ่งตกตะกอนลงมาเป็นตะกอนสีดำของตะกั่วซัลไฟด์ (lead sulphide) เมื่อเติมตะกั่วแอซี-เตท (lead acetate) ดังสมการ

$$Na_2S + (CH_3COO)_2Pb \longrightarrow PbS + 2\ CH_3COONa$$

โปรตีนที่มีกรดอะมิโนดังกล่าวเป็นองค์ประกอบจะเกิดปฏิกิริยาได้เช่นกัน

ปฏิกิริยาฮอฟกินส์-โคล (Hopkins-Cole's reaction)

ปฏิกิริยานี้ใช้ทดสอบกรดอะมิโนที่มีวงแหวนอินโดล(indole ring)ที่แขนงข้าง ซึ่งได้แก่ กรดอะมิโนทริพโตเฟน โดยเกิดปฏิกิริยากับกรดไกลออกซิลิก (glyoxalic acid) ในกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้วให้วงแหวนสีม่วงขึ้นที่รอยต่อระหว่างชั้นสารละลายกับชั้นกรดซัลฟิวริก โปรตีนที่มีกรดอะมิโนทริพโตเฟนเป็นองค์ประกอบให้ผลบวกกับปฏิกิริยานี้ได้

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

1. วิธีวัดการดูดแสงที่ช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลต

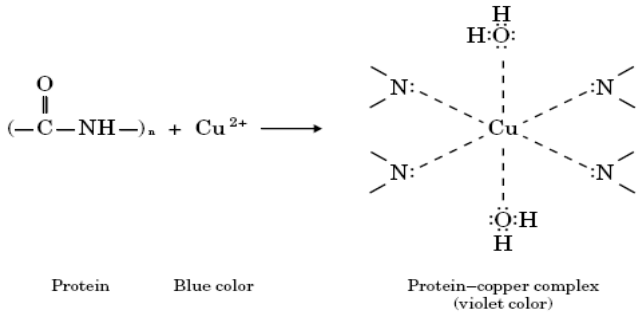
โปรตีนสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงคลื่นอัลตราไวโอเลตที่ 200 และ 280 นาโนเมตร การดูดแสงที่ความยาวคลื่นหลังเป็นผลจากการดูดแสงของกรดอะมิโนที่มีหมู่ R เป็นวงแหวนแอโรแมติก ได้แก่ ทริพโตเฟน ไทโรซีน เฟนิลอะลานีน และฮีสทิดีน ส่วนการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแรกเป็นผลจากการดูดแสงของพันธะเพปไทด์ซึ่งมีอยู่มากมายในโปรตีน โดยทั่วไปเรานิยมวัดปริมาณโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร เนื่องจากมีสารประกอบอื่น ๆ ที่ดูดกลืนแสงความยาวคลื่นนี้น้อยกว่าความยาวคลื่นที่สั้นกว่านี้

กรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 280 นาโนเมตรได้เช่นกัน ดังนั้นโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ซึ่งยังมีดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอปะปนอยู่จะรบกวนการวิเคราะห์ การหาปริมาณโปรตีนจึงต้องหักปริมาณกรดนิวคลีอิกซึ่งหาได้จากการวัดการดูดแสงที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดแสงสูงสุดของกรดนิวคลีอิกที่ 260 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)} = 1.55\ A_{280} - 0.76\ A_{260}$$

2. วิธีไบยูเรท (Biuret assay)

ปฏิกิริยานี้ใช้ทดสอบสารที่ประกอบด้วยพันธะเพปไทด์ตั้งแต่ 2 พันธะขึ้นไป โดยให้ทำปฏิกิริยากับทองแดงซัลเฟตในสารละลายที่มีสภาวะเป็นด่าง คิวปริกไอออน (Cu^{2+}) ในน้ำยาจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไนโตรเจนอะตอมที่พันธะเพปไทด์ (รูปที่ 1) สารประกอบที่มีกรดอะมิโนอย่างน้อย 3 หน่วย (tripeptide) และโปรตีนให้ผลบวกกับปฏิกิริยานี้โดยให้สารละลายที่มีสีม่วง ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนพันธะเพปไทด์ที่มีอยู่และคงตัวอยู่ได้หลายวันถ้าเก็บไว้ในที่มืด ปฏิกิริยานี้จึงมีประโยชน์ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลาย โดยวัดค่าการดูดแสงของสีม่วงที่เกิดขึ้นหลังจากปฏิกิริยาผ่านไป 30 นาที ที่ 540 นาโนเมตร แล้วเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 2 การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Cu^{2+} กับพันธะเพปไทด์

วิธีนี้มีสารรบกวนปฏิกิริยาหลายชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมไอออนที่ความเข้มข้นสูง ๆ ซึ่งจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับคิวปริกไอออน ตัวรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลรีดิวซิ่ง ซึ่งจะรีดิวซ์คิวปริกไอออนเป็นคิวปรัสไอออนให้เห็นเป็นตะกอนสีส้ม

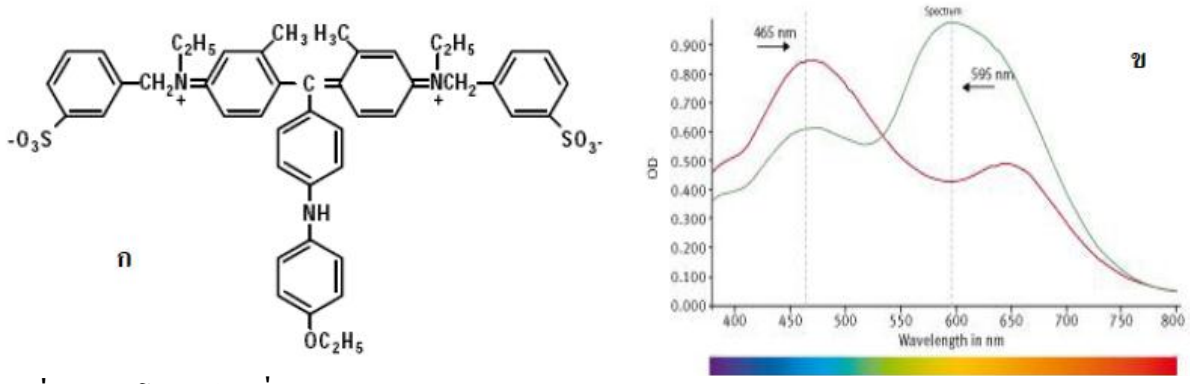
3. วิธีลอรี (Lowry assay)

ในสภาวะที่เป็นด่างคิวปริกไอออนเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับพันธะเพปไทด์ของโปรตีน พร้อมกันนั้นก็ถูกรีดิวซ์เป็นคิวปรัสไอออน ปฏิกิริยาขั้นแรกนี้มีความคล้ายคลึงกับวิธีไบยูเรท เมื่อเติมน้ำยาโฟลิน-ซีออคาลโท (Folin-Ciocalteau) ซึ่งเป็นเกลือฟอสโฟโมลิบเดตฟอสโฟทังสเทตในสารละลายกรด หมู่ R ของส่วนที่เหลือของไทโรซีน ทริพโตเฟน และซีสเตอีนในโปรตีนรวมถึงคิวปรัสไอออนจะเกิดปฏิกิริยากับสารในน้ำยาซึ่งถูกรีดิวซ์เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำเงิน โปรตีนแต่ละชนิดให้ความเข้มของสีแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปริมาณไทโรซีน และทริปโตเฟนที่มีอยู่

วิธีนี้มีสารรบกวนปฏิกิริยามากมาย ตัวอย่าง เช่น สารรีดิวซ์ เช่น 2-mercaptoethanol เป็นต้น บัฟเฟอร์หลายชนิด เช่น HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N′-2 ethanesulfonic acid) EDTA แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณสูง

4. วิธีแบรดฟอร์ด (Bradford assay หรือ dye-binding assay)

โปรตีนจับกับสี Coomassie Brilliant blue G-250 ด้วยแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกและแรงยึดเหนี่ยวไอออนิกร่วมกัน ประจุบวกที่แขนงข้างของกรดอะมิโนโดยเฉพาะส่วนที่เหลือของอาร์จีนีนมีบทบาทสำคัญในการจับกับโมเลกุลของสีซึ่งมีประจุลบ (รูปที่ 3) โมเลกุลของสีในสภาพที่มีประจุลบให้สีน้ำเงิน แต่เมื่อรับโปรตอนแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีแดงส้มอ่อน ๆ การจับของสีกับโปรตีนในสภาวะที่เป็นกรดจึงช่วยคงสภาพโครงสร้างประจุลบของสีไว้และให้สีน้ำเงินที่เข้มขึ้นตามปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ นอกจากนี้ยังเปลี่ยนสมบัติการดูดแสงของสีจากเดิมที่มีค่า λ_{max} เป็น 465 นาโนเมตร ไปเป็น 595 นาโนเมตร



รูปที่ 3 ก. โครงสร้างที่มีประจุลบของสี Coomassie brilliant Blue G-250

ข. สเปคตรัมของสี Coomassie brilliant Blue G-250 เมื่อไม่ได้จับกับโปรตีน (สีแดง) และสเปคตรัมของสี Coomassie brilliant Blue G-250 เมื่อจับกับโปรตีน (สีเขียว)

ที่มา : http://www.bmglabtech.com/application-notes/absorbance/bradford-omega-158.cfm

การทดลองที่ 4.1 ปฏิกิริยานินไฮดริน (Ninhydrin reaction)

สารเคมีที่ใช้ 1. สารละลาย 0.1% กรดอะมิโนไกลซีน

2. สารละลาย 0.05% กรดอะมิโนโพรลีน

3. สารละลาย 1% แอลบูมินของไข่ขาว

4. สารละลายตัวอย่างหมายเลข PU.....

5. น้ำยานินไฮดริน (0.2 % นินไฮดรินในเอธานอล)

6. สารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์พีเอช 5.0

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายที่จะทดสอบ (ข้อ 1-4 ในหัวข้อสารเคมีที่ใช้) ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 ชนิด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลองอีกหลอดหนึ่งไว้เป็นหลอดเปรียบเทียบ

2. เติมสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ลงในแต่ละหลอด ๆ ละ 2 มิลลิลิตร

3. เติมน้ำยานินไฮดรินลงในแต่ละหลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

4. ผสมสารละลายที่เติมลงในแต่ละหลอดให้เข้ากันและนำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้น โดยเทียบกับหลอดที่ใส่น้ำกลั่น

การทดลองที่ 4.2 ปฏิกิริยาแซนโธโพรทีอิก (Xanthoproteic reaction)

สารเคมีที่ใช้ 1. สารละลาย 0.1% กรดอะมิโนไทโรซีน

2. สารละลาย 0.1% กรดอะมิโนไกลซีน

3. สารละลาย 1% แอลบูมินของไข่ขาว

4. สารละลาย 1% เจลาติน

5. สารละลายตัวอย่างหมายเลข PU.....

6. สารละลาย 0.5% ฟีนอล

7. กรดไนตริกเข้มข้น

8. สารละลาย 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายที่จะทดสอบ (ข้อ 1-5 ในหัวข้อสารเคมีที่ใช้) ลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 ชนิด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

2. เติมกรดไนตริกเข้มข้นลงในแต่ละหลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

3. นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงโดยใช้น้ำประปาหล่อ สังเกตสีของสารละลายและเปรียบเทียบสีระหว่างสารที่ใช้ทดสอบ

4. ค่อย ๆ หยด สารละลาย 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปเรื่อย ๆ (ให้ทำในตู้ควัน) เขย่าให้เข้ากันหลังเติมทุกครั้ง จนสังเกตเห็นสีที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างสมบูรณ์และเปรียบเทียบความเข้มของสีระหว่างสารที่ใช้ทดสอบโดยเทียบกับหลอดที่ใส่ฟีนอลซึ่งให้ผลบวกกับการทดสอบ

การทดลองที่ 4.3 ปฏิกิริยาซากากูชิ (Sakaguchi reaction)

สารเคมีที่ใช้ 1. สารละลาย 0.05 % กรดอะมิโนอาร์จินีน

2. สารละลาย 0.1 % กรดอะมิโนไกลซีน

3. สารละลาย 1% แอลบูมินของไข่ขาว

4. สารละลายตัวอย่างหมายเลข PU.....

5. สารละลาย 5% แอลฟา-แนพธอล (α-naphthol) ในเอธานอล

6. สารละลาย 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์

7. น้ำยาโซเดียมไฮโปโบรไมต์

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายที่จะทดสอบ (ข้อ 1-4 ในหัวข้อสารเคมีที่ใช้) ลงในหลอดทดลองหลอดละ 1 ชนิด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในแต่ละหลอด ๆ ละ 5 หยด

3. เติมสารละลายแอลฟา-แนพธอล ลงในแต่ละหลอด ๆ ละ 2 หยด แล้วเขย่าผสมให้เข้ากันนำทุกหลอดไปแช่ให้เย็นในน้ำแข็ง

4. เติมน้ำยาโซเดียมไฮโปโบรไมต์ลงในแต่ละหลอด ๆ ละ 3 หยด ผสมให้เข้ากัน แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น และเปรียบเทียบความเข้มของสีระหว่างสารที่ใช้ทดสอบ

การทดลองที่ 4.4 ปฏิกิริยาตะกั่วซัลไฟด์ (Lead Sulphide reaction)

สารเคมีที่ใช้ 1. สารละลาย 0.1% กรดอะมิโนซิสเตอีน

2. สารละลาย 0.1% กรดอะมิโนไกลซีน

3. สารละลาย 1% แอลบูมินไข่ขาว

4. สารละลายตัวอย่างหมายเลข PU.....

5. สารละลาย 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์

6. สารละลาย 5% ตะกั่วแอซีเตท

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายที่จะทดสอบ (ข้อ 1-4 ในหัวข้อสารเคมีที่ใช้) ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 ชนิด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในทุกหลอด หลอดละ 5 หยด

2. เติมสารละลายตะกั่วแอซีเตท 2 หยด และนำไปต้มในน้ำเดือด 2-3 นาที สังเกตผลที่เกิดขึ้น

การทดลองที่ 4.5 ปฏิกิริยาฮอฟกินส์-โคล (Hopkins-Cole's reaction)

สารเคมีที่ใช้ 1. สารละลาย 0.1% กรดอะมิโนทริพโตเฟน

2. สารละลาย 0.1% กรดอะมิโนไกลซีน

3. สารละลาย 1% แอลบูมินไข่ขาว

4. สารละลาย 1% เจลาติน

5. สารละลายตัวอย่างหมายเลข PU.....

6. น้ำยาฮอฟกินส์-โคล

7. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายที่จะทดสอบ (ข้อ 1-5 ในหัวข้อสารเคมีที่ใช้) ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 ชนิด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาฮอฟกินส์-โคลลงในทุกหลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร
2. เอียงหลอดแล้วค่อย ๆ ใช้หลอดหยด หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงข้าง ๆ หลอดทดลองแล้วสังเกตการเกิดวงแหวนสีม่วงที่รอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย ค่อย ๆทำทีละหลอด

การทดลองที่ 4.6 ปฏิกิริยาโมลิสซ์ (Molisch's test) เพื่อใช้ทดสอบโปรตีนที่เป็นไกลโคโปรตีน

สารเคมีที่ใช้ 1. สารละลาย 1% แอลบูมินไข่ขาว
2. สารละลาย 1% เจลาติน
3. สารละลาย 1% ซูโครส
4. สารละลายแอลฟา-แนพธอล (5% ในเอธานอล)
5. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายที่จะทดสอบ (ข้อ 1-3 ในหัวข้อสารเคมีที่ใช้) ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 ชนิด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอลฟา-แนพธอลลงในหลอดทดลองทุกหลอด หลอดละ 5 หยด
2. ค่อย ๆ ใช้หลอดหยดหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงข้าง ๆ หลอดทดลอง แล้วสังเกตการเกิดวงแหวนสีม่วงที่รอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย และเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นกับหลอดที่ให้ผลบวก ซึ่งใช้สารละลายซูโครสแทนสารละลายโปรตีน

สารละลายกรดอะมิโนหรือโปรตีนที่ต้องใช้ในการทดลองที่ 4.1-4.6 ได้สรุปไว้ในตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1 ผลการทดสอบของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ กับปฏิกิริยาการทดสอบกรดอะมิโน

ปฏิกิริยา		สารละลายกรดอะมิโนที่ใช้						สารละลายโปรตีนที่ใช้		สารละลายซูโครส	สารละลายฟีนอล	สารละลายตัวอย่างหมายเลข PU.....
		ไกลซีน	โพรลีน	ไทโรซีน	อาร์จินีน	ซิสเตอีน	ทริพโตเฟน	แอลบูมินไข่ขาว	เจลาติน			
นินไฮดริน	ผล(+)หรือ (-)											
	ลักษณะผลการทดสอบ											
แซนโธโพรทีอิก	ผล(+)หรือ (-)											
	ลักษณะผลการทดสอบ											
ซากากูชิ	ผล(+)หรือ (-)											
	ลักษณะผลการทดสอบ											
ตะกั่วซัลไฟด์	ผล(+)หรือ (-)											
	ลักษณะผลการทดสอบ											
ฮอฟกินส์-โคล	ผล(+)หรือ (-)											
	ลักษณะผลการทดสอบ											
โมลิสซ์	ผล(+)หรือ(-)											
	ลักษณะผลการทดสอบ											

สอบปฏิบัติการประจำบท

การทดลองที่ 4.7-4.8 เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ให้แต่ละกลุ่มเจือจางสารละลาย 1% แอลบูมินไข่ขาวด้วยน้ำกลั่นโดยการทำ ten-fold serial dilution ให้ได้อีก 3 ความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 ug/mL ทุกความเข้มข้นรวมถึงความเข้มข้นเริ่มต้น ทั้งหมดนำไปใช้ในการทดลองทั้งสอง ซึ่งในแต่ละการทดลองใช้แต่ละความเข้มข้นเป็นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ดังนั้นจงคำนวณว่า 0.5 มิลลิลิตรของแต่ละความเข้มข้นมีปริมาณโปรตีนเป็นน้ำหนักเท่าใด (ตอบเป็นมิลลิกรัม ไมโครกรัม หรือนาโนกรัม)

การทดลองวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนนี้ แต่ละกลุ่มจะได้รับสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่ไม่ทราบความเข้มข้น เป็นหมายเลข PC ..... ให้หาว่า

1. มีวิธีใดที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของสารละลายโปรตีนตัวอย่างนี้ได้**<u>โดยไม่ต้องเจือจางเลย</u>**
2. เมื่อเลือกวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนได้แล้ว จงหาความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบค่าการดูดแสงของสารละลายโปรตีนตัวอย่างกับค่าการดูดแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่งที่สามารถใช้เปรียบเทียบกันได้ ซึ่งค่าการดูดแสงทั้งสองควรมีค่าใกล้เคียงกัน

การที่จะเลือกวิธีสำหรับใช้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนตัวอย่างได้นั้น ต้องทราบถึงความไว (Sensitivity) ของแต่ละวิธีเสียก่อน ซึ่งก็คือระดับปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดที่วิธีนั้นจะสามารถวิเคราะห์ได้ โดยนำแต่ละความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมได้ ไปทำให้เกิดสีด้วยวิธีต่าง ๆ แล้วสรุปหาว่าปริมาณโปรตีนน้อยถึงระดับใดที่ยังสามารถเห็นสีที่เกิดขึ้น หรือตรวจสอบวัดค่าการดูดแสงของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ว่า ปริมาณโปรตีนน้อยถึงระดับใดที่ยังสามารถวัดค่าการดูดแสงได้ (ดูการทดลองเรื่องสเปกโทรโฟโตเมตรี ซึ่งได้ระบุไว้ว่าการวิเคราะห์เชิงปริมาณควรอ่าน ค่าการดูดแสงจากค่าใดถึงค่าใด จึงถือว่าเป็นค่าที่เชื่อถือได้)

การเตรียมสารละลายโปรตีนสำหรับการทดลองที่ 4.7-4.8

1. เตรียมหลอดทดลองไว้ 6 หลอด หลอดที่ 1-4 ให้ปิเปตสารละลายแอลบูมินไข่ขาวที่เตรียมไว้แล้ว (4 ความเข้มข้น) ลงในแต่ละหลอด ๆ ละ 1 ความเข้มข้น ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 5 และปิเปตน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 6
2. ทั้ง 6 หลอดที่เตรียมได้ในข้อ 1 ถือเป็น 1 ชุด ซึ่งใช้สำหรับ 1 การทดลอง ให้เตรียมเช่นนี้เพิ่มอีกชุด สำหรับอีกหนึ่งการทดลองที่เหลือ (การทดลองที่ 4.8)
3. นำแต่ละชุดที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อไปนี้

การทดลองที่ 4.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรท (Biuret assay)

สารเคมีที่ใช้
1. สารละลายแอลบูมินไข่ขาว 4 ความเข้มข้นจาก 10 mg/mL ถึง 10 μg/mL
2. สารละลายโปรตีนตัวอย่าง หมายเลข PC.....
3. น้ำยาไบยูเรท

วิธีทดลอง

1. เติมน้ำยาไบยูเรทลงในหลอดทุกหลอด ๆ ละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
2. วัดค่าการดูดแสงทุกหลอดที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 6 ในการตั้ง 100% T

3. สรุประดับปริมาณโปรตีนที่วัดได้โดยวิธีนี้
4. หาข้อสรุปว่าสารละลายโปรตีนตัวอย่างสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีนี้โดยไม่ต้องเจือจางเลยได้หรือไม่ ถ้าวิเคราะห์ได้จงหาว่าปริมาณโปรตีนเป็นเท่าใด

การทดลองที่ 4.8 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradford assay)

สารเคมีที่ใช้ 1. สารละลายแอลบูมินไข่ขาว 4 ความเข้มข้น จาก 10 mg/mL ถึง 10 μg/mL
2. สารละลายโปรตีนตัวอย่าง หมายเลข PC.....
3. น้ำยาแบรดฟอร์ด

วิธีทดลอง

1. เติมน้ำยาแบรดฟอร์ดลงในหลอดทดลองทุกหลอด ๆ ละ 5 มิลลิลิตร
2. ผสมเข้าด้วยกันและอ่านค่าการดูดแสงที่ 595 นาโนเมตรทันที

ข้อพึงระวัง

1. ให้รีบวัดค่าการดูดแสงให้เสร็จสิ้นภายใน 30 นาทีหลังการเติมน้ำยา หากทิ้งไว้นานอาจเกิดการตกตะกอนของสารประกอบเชิงซ้อนของสีและโปรตีน
2. เนื่องจากสีที่ใช้ติดกับผิวแก้วภายในหลอดคิวเวตได้ง่าย เมื่อวัดค่าการดูดแสงเรียบร้อยแล้วให้รีบเทสารละลายในคิวเวตออกและล้างสีที่ติดอยู่ออกอย่างระมัดระวังด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นหรือเมทธา-นอล

3. สรุประดับปริมาณโปรตีนที่วัดได้โดยวิธีนี้
4. หาข้อสรุปว่าสารละลายโปรตีนตัวอย่างสามารถวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีนี้โดยไม่ต้องเจือจางเลยได้หรือไม่ ถ้าวิเคราะห์ได้ จงหาว่าปริมาณโปรตีนเป็นเท่าใด

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 2 ค่าการดูดแสงและความเข้มข้นของโปรตีนชนิดต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนวิธีต่าง ๆ

วิธีวิเคราะห์/ความยาวคลื่นที่วัดการดูดแสง	**ค่าการดูดแสง (A) ที่อ่านได้ของ**				
	ความเข้มข้นของแอลบูมินไข่ขาว				**สารละลายโปรตีนตัวอย่าง หมายเลข PC.....**
	10 mg/mL (1%)	.....	.....	10 μg/mL	
ไบยูเรท/540 nm สีที่เห็น					
แบรดฟอร์ด/595 nm สีที่เห็น					
ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่ใช้ในการวิเคราะห์ มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ	.....mg	.....mg	.....mg	.....mg	.....mg
	..... μg	..... μg	.....μg	.....μg	.....μg
	.....ng	.....ng	.....ng	.....ng	(หาจากการทดลอง)

คำถาม

1. จากการทดสอบต่าง ๆ เจลาตินมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acids) เป็นอย่างไรเมื่อเปรียบเทียบกับแอลบูมินไข่ขาว

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเจลาตินด้วยวิธีวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรกระทำได้หรือไม่ จงให้เหตุผล

3. จงเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนวิธีต่าง ๆ ในหัวข้อต่อไปนี้

ก. ความไวของวิธีวิเคราะห์

ข. สภาพธรรมชาติของโปรตีนหลังการวิเคราะห์

ค. ข้อจำกัดของการวิเคราะห์

ง. ความสะดวกของการวิเคราะห์