การทดลองที่ 5	โปรตีน II

อ.ชัยวัฒน์ วามวรรัตน์

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาวิธีการแยกโปรตีน โดยอาศัยสมบัติการตกตะกอนของโปรตีน

โปรตีนเป็นแมโครโมเลกุล ที่ประกอบขึ้นจากพอลิเพปไทด์ตั้งแต่หนึ่งสายขึ้นไป ซึ่งพอลิเพปไทด์ก็คือสายของกรดอะมิโนที่แต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์นั่นเอง โปรตีนแต่ละชนิดมีขนาดและลำดับของกรดอะมิโนในโครงสร้างแตกต่างกัน โดยทั่วไปมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,000 ดาลตันขึ้นไป และอาจมากเป็นล้านดาลตัน รูปร่างแบ่งเป็น 2 ลักษณะใหญ่คือ รูปเส้นใย (fibrous) และรูปก้อนกลม (globular) ลักษณะรูปร่างเหล่านี้ถูกกำหนดโดยโครงสร้างระดับปฐมภูมิ และแรงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลในการกำหนดโครงสร้างระดับทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ ซึ่งได้แก่ พันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิก พันธะไดซัลไฟด์ แรงไฮโดรโฟบิก และแรงแวนเดอร์วาลส์

โปรตีนมีบทบาทหน้าที่สำคัญมากมายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ตั้งแต่การเป็นตัวเร่งทางชีวภาพที่เรียกว่าเอนไซม์ เป็นฮอร์โมน เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างเนื้อเยื่อต่าง ๆ เกี่ยวข้องกับการทำงานในการเคลื่อนไหว การขนส่งสาร และยังแหล่งพลังงานสำรองในยามที่ร่างกายขาดแคลนแหล่งพลังงานสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรต

การแบ่งกลุ่มโปรตีน

โปรตีนแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ โปรตีนสามัญ (simple protein) โปรตีนสังยุค (conjugated protein) และโปรตีนอนุพัทธ์ (derived protein)

1. โปรตีนสามัญ เป็นโปรตีนที่ถูกไฮโดรไลซ์แล้วได้องค์ประกอบส่วนใหญ่ทั้งหมดเป็นกรดอะมิโน ตัวอย่างโปรตีนในกลุ่มนี้ เช่น

1.1 อัลบูมิน (albumin) เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้และจับตัวกันเป็นก้อนลิ่มได้(coagulate) เมื่อถูกความร้อน สามารถตกตะกอนจากสารละลายโดยการทำให้สารละลายนั้นอิ่มตัวด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตัวอย่างโปรตีนชนิดนี้ เช่น อัลบูมินไข่ขาว ซีรั่มอัลบูมิน แลคตัลบูมินในน้ำนม อัลบูมินจากถั่วเหลือง

1.2 โกลบูลิน (globulin) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือเจือจางและจับตัวเป็นก้อนลิ่มได้เมื่อถูกความร้อน ตกตะกอนได้ที่ประมาณร้อยละ 34-50 ของระดับความอิ่มตัวเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนชนิดนี้มักพบร่วมกับอัลบูมินในแหล่งเดียวกัน เช่น นม ไข่ และซีรั่ม

1.3 กลูเทลิน (glutelin) เป็นโปรตีนที่ละลายในสารละลายกรดหรือด่างเจือจาง แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นกลาง ตัวอย่าง เช่น โปรตีนที่พบในข้าวสาลี และธัญพืชอื่น ๆ

1.4 โปรลามีน (prolamine) เป็นโปรตีนที่ละลายใน 70% แอลกอฮอล์ มีกรดอะมิโนโพรลีนเป็นองค์ประกอบอยู่มาก มักพบในธัญพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์

1.5 สเคอโรโปรตีน (scleroprotein) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในทุกตัวทำละลายที่กล่าวไว้ในข้อต้น ๆ มักมีกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ในโมเลกุลเป็นองค์ประกอบ ตัวอย่าง เช่น โปรตีนจากสัตว์ที่อยู่ในผม

เขา เล็บ กีบ กระดูกอ่อน และกระดูก คอลลาเจน (collagen) ในกระดูก เคราติน (keratin) ในผม ไฟโบรอิน (fibroin) ในไหม

2. โปรตีนสังยุค คือ โปรตีนที่มีการรวมตัวกับกลุ่มสารอื่นที่มิใช่โปรตีน ตัวอย่างเช่น

2.1 นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) เช่น ฮีสโทน (histone) ที่จับรวมตัวกับกรดนิวคลีอิก

2.2 โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) คือ โปรตีนที่มีการรวมตัวกับส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น hyaluronic acid chondroitin sulphate

2.3 โครโมโปรตีน (chromoprotein) คือ โปรตีนที่รวมตัวกับหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) เป็นสารประกอบที่มีสี เช่น เฮโมโกลบิน (hemoglobin) ฟลาโวโปรตีน (flavoprotein)

2.4 ฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) โปรตีนชนิดนี้มีหมู่ฟอสเฟตเชื่อมเข้ากับหมู่ไฮดรอกซีของกรดอะมิโนเซรีน (serine) หรือเทรโอนีน (threonine) เช่น เคซีน (casein) ในน้ำนม ไวเทลลิน (vitellin) ในไข่แดง

2.5 ไลโปโปรตีน (lipoprotein) เป็นโปรตีนที่มีการรวมตัวกับฟอสโฟลิพิด คอเลสเทอรอล ไตรเอซิลกลีเซอรอล และกรดไขมันในสัดส่วนที่แตกต่างกันออกไปแล้วแต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น แอลดีแอล (LDL) เอชดีแอล (HDL)

2.6 เมตัลโลโปรตีน (metalloprotein) คือโปรตีนที่มีการจับตัวกับไอออนของโลหะ เช่น ทองแดง เหล็ก โคบอลต์ แมงกานีส และแมกนีเซียม โดยทั่วไปมักเป็นโปรตีนพวกเอนไซม์ ซึ่งต้องการไอออนเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นแอกติเวเตอร์ (activator)

3. โปรตีนอนุพัทธ์ เป็นโปรตีนที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายหรือทำให้เสียสภาพธรรมชาติด้วยกรด ด่าง หรือเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น โปรตีนในเส้นผมหลังผ่านการดัดแต่งให้หยิก เพปโทน (peptone) ซึ่งใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเตรียมจากการย่อยสลายโปรตีน มีสมบัติละลายน้ำแต่ไม่จับตัวเป็นก้อนลิ่มเมื่อถูกความร้อน และตกตะกอนด้วยการใช้กรดฟอสโฟทังสติก (phosphotungstic acid)

การตกตะกอนโปรตีน

ในเซลล์หนึ่ง ๆ มีจำนวนชนิดโปรตีนมากมายนับพันในสัดส่วนที่แตกต่างกันและอยู่ร่วมกับสารอื่น ๆ การตกตะกอนจึงเป็นกลวิธีขั้นตอนแรก ๆ ของงานแยกโปรตีนเพื่อการศึกษาและการใช้งาน และงานกำจัดโปรตีนออกจากสารอื่น ๆ การเลือกวิธีตกตะกอนโปรตีนเพื่อการศึกษาและการใช้งานต้องเป็นวิธีที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ หากทราบสมบัติของโปรตีนนั้น เช่น จุดไอโซอิเล็กทริก จะช่วยให้เลือกวิธีได้รวดเร็วและได้ปริมาณโปรตีนในระดับที่ใกล้เคียงที่มีอยู่ในตัวอย่าง ส่วนงานกำจัดโปรตีนมักไม่ต้องคำนึงถึงสภาพธรรมชาติของโปรตีน เพียงแต่วิธีที่ใช้นั้นต้องกำจัดโปรตีนออกมากที่สุด และคงสารที่ต้องการไว้โดยที่สารเคมีหรือกระบวนการที่ใช้ต้องไม่มีผลรบกวนต่อการทำงานในขั้นต่อ ๆ ไป

การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การเสียสภาพธรรมชาติ คือ ปรากฏการณ์การเปลี่ยนรูปร่างโครงสร้างจากที่มีการจัดตัวอย่างเป็นระเบียบภายใต้สภาวะทางสรีรวิทยาไปสู่สภาพที่มีการจัดตัวไม่เป็นระเบียบภายใต้สภาวะต่างจากทางสรีรวิทยา ซึ่งสามารถตรวจสอบติดตามการเปลี่ยนแปลงนี้ได้จากสมบัติทางฟิสิกส์ ทางเคมีและทางชีวเคมี เช่น

การเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสง การละลายน้ำได้น้อยลง ความไวปฏิกิริยาของหมู่ซัลไฮดริล และกิจกรรมของเอนไซม์ การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับทุติยภูมิ ตติยภูมิและจตุรภูมิ โดยไม่มีการทำลายพันธะเพปไทด์ แต่เกี่ยวข้องกับการทำลายพันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาทางไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) โดยทั่วไปโปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติไปแล้ว มักไม่ผันกลับคืน แต่บางชนิดอาจคืนสภาพธรรมชาติได้เมื่อกำจัดสารที่ทำให้เสียสภาพธรรมชาติออกจากสารละลายและปรับสภาวะของสารละลายให้พอเหมาะกับการคืนสภาพธรรมชาติ เช่น การปรับพีเอช ความแรงไอออน และความเข้มข้นของโปรตีน การคืนสภาพของโปรตีนหลายชนิดเกิดขึ้นที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ทำให้มีโอกาสเกิดอันตรกิริยาระหว่างต่างโมเลกุลมากกว่าที่จะเกิดภายในโมเลกุลเดียวกันแล้วกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติ

ตัวกระทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติ

1. ตัวกระทำทางกายภาพ (physical agent)

1.1 อุณหภูมิ กลไกการทำให้เสียสภาพธรรมชาติเกี่ยวข้องกับการลดเสถียรภาพของอันตรกิริยาที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนท์เป็นหลัก เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงทางไฟฟ้าสถิตย์ และแรงแวนเดอร์วาลล์ ซึ่งเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูง โดยทั่วไปการลดอุณหภูมิให้ต่ำเป็นการรักษาเสถียรภาพของโปรตีนไว้ได้ดียิ่งขึ้น แต่ไม่เป็นจริงเสมอไป โปรตีนบางชนิดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 $^{\circ}$ซ จะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ การเติมเกลือ กลีเซอรอล และน้ำตาล เช่น ซูโครส กลูโคส เป็นต้น ลงในสารละลายโปรตีนก็สามารถช่วยให้โปรตีนมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิได้ดีขึ้น

2. ตัวกระทำทางเคมี (chemical agent)

2.1 พีเอช โปรตีนมีความเสถียร ต้านทานการเสียสภาพธรรมชาติได้ดีที่พีเอชเท่ากับจุดไอโซอิเล็กทริก เนื่องจากพลังงานสุทธิจากแรงผลักดันทางไฟฟ้าสถิตย์มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับอันตรกิริยาอื่น ๆ โปรตีนส่วนใหญ่จึงมีความเสถียรที่พีเอชเป็นกลาง แต่ที่พีเอชสูงหรือต่ำมาก ๆ การผลักกันของประจุที่เกิดขึ้นมากมายภายในโมเลกุล ทำให้โมเลกุลของโปรตีนพองตัวและมีรูปร่างไร้ระเบียบมากขึ้น ความรุนแรงของความไร้ระเบียบเกิดขึ้นที่พีเอชสูง ๆ มากกว่าพีเอชต่ำ ๆ อันเนื่องมาจากการแตกตัวเป็นไอออนของหมู่คาร์บอกซิล หมู่ฟีนอลิกและหมู่ซัลไฮดริล ซึ่งมีบางส่วนของหมู่เหล่านี้ฝังตัวอยู่ภายในโครงสร้าง จึงทำให้สายพอลิเพปไทด์คลี่ตัวออกเมื่อหมู่ที่แตกตัวเหล่านั้นพยายามสัมผัสกับน้ำในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น การเสียสภาพธรรมชาติโดยพีเอชส่วนใหญ่จะผันกลับคืนได้ หากเกิดการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ การสูญเสียหมู่อะมิโนของส่วนที่เหลือของกรดอะมิโนแอสพาราจีนและกลูตามีน การทำลายหมู่ซัลไฮดริลไปบางส่วนที่พีเอชสูง ๆ หรือเกิดการรวมกลุ่ม (aggregation) จะทำให้การเสียสภาพธรรมชาตินั้นเป็นไปโดยถาวร

2.2 ตัวทำละลายอินทรีย์ การเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นเนื่องจากอันตรกิริยาทางไม่ชอบน้ำในโปรตีนลดน้อยลงอันเป็นผลจากการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ของแขนงข้างที่ไม่มีขั้วของกรดอะมิโนส่วนที่เหลือ

2.3 ตัวถูกละลายอินทรีย์ ยูเรีย (urea) และกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ (guanidine hydrochloride) เป็นสารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติได้ กัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 6 โมลาร์

สามารถทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติได้ทั้งหมด ขณะที่ยูเรียในความเข้มข้น 8 โมลาร์ ยังมีโปรตีนบางส่วนที่ไม่เสียสภาพ สารทั้งสองชนิดนี้ต่างสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ ที่ความเข้มข้นสูง ๆ สารเหล่านี้จึงทำลายพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่างโมเลกุลของน้ำด้วยกัน และมีบทบาทเป็นตัวทำละลายที่ดีต่อกรดอะมิโนส่วนที่เหลือที่ไม่มีขั้วที่อยู่บริเวณภายในโมเลกุลโปรตีน เป็นผลให้ไม่สามารถรักษาโครงรูปไว้ได้ การแยกเอาสารที่ทำให้เสียสภาพธรรมชาติเหล่านี้ออกจะทำให้โปรตีนกลับคืนสู่สภาพธรรมชาติได้

2.4 สารซักฟอก (detergent) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, : SDS) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้สมดุลการผันกลับไปมาระหว่างสภาพธรรมชาติและสภาพเสียธรรมชาติของโปรตีนเสียไป โดย SDS เข้าจับกับโปรตีนที่เสียสภาพธรรมชาติอย่างแข็งแรง ด้วยความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำเพียง 3-8 โมลาร์เมื่อเปรียบเทียบกับยูเรียและกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ ก็สามารถทำให้โปรตีนรูปก้อนกลมเสียสภาพธรรมชาติได้ทั้งหมดและเป็นการเสียสภาพที่ผันกลับคืนไม่ได้

นอกจากนี้การเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนยังเกิดขึ้นได้จากการกวนสารละลายโปรตีนจนเกิดฟอง การเกิดฟองส่งเสริมการเกิดออกซิเดชันโดยอากาศต่อโปรตีน เช่น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับหมู่ซัลไฮดริล เป็นต้น และการเสียสภาพธรรมชาติที่ผิวโปรตีน ดังนั้นระหว่างการทดลองต้องให้เกิดฟองขึ้นในสารละลายน้อยที่สุด

วิธีการตกตะกอนโปรตีน

โมเลกุลของโปรตีนที่ละลายอยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำจะซ่อนโครงสร้างส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งเป็นกรดอะมิโนส่วนที่เหลือที่ไม่ชอบน้ำไว้ภายในโมเลกุลให้ห่างจากการสัมผัสกับน้ำ ส่วนผิวภายนอกของโมเลกุลจะเป็นส่วนโครงสร้างที่มีอันตรกิริยากับน้ำผ่านแขนงข้างของกรดอะมิโนส่วนที่เหลือที่มีสมบัติมีขั้วและเกิดพันธะเชิงไอออนได้ แขนงข้างเหล่านี้ซึ่งอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรืออยู่กระจายตามสายพอลิเพปไทด์ อาจมีพื้นที่บางบริเวณบนผิวโมเลกุลที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ อย่างไรก็ตามพื้นที่ผิวโมเลกุลส่วนใหญ่ถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของน้ำผ่านอันตรกิริยาทางไอออนกับขั้วคู่และทางขั้วคู่ (ion–dipole and dipole interaction) รวมไปถึงอันตรกิริยากับส่วนของแกนโครงสายพอลิเพปไทด์ด้วย ดังนั้นแม้ว่าจะเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่มีแขนงข้างไม่ชอบน้ำเป็นองค์ประกอบหลักก็ตาม โปรตีนนั้นก็สามารถละลายน้ำได้ดี นอกจากนี้การที่สภาวะของตัวกลางมีพีเอชที่คงที่ จึงทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีประจุไฟฟ้าสุทธิ โดยมีประจุที่เหมือนกันมากเกินก่อให้เกิดแรงผลักกันทางไฟฟ้าสถิตย์มีผลให้โมเลกุลของโปรตีนอยู่แยกห่างจากกัน ไม่สามารถมีอันตรกิริยาต่อกันและกันให้เกิดการรวมตัวกันได้

การทำให้โปรตีนตกตะกอนได้นั้นจึงต้องดำเนินไปในแนวทางลดอันตรกิริยาที่โมเลกุลของน้ำมีต่อโมเลกุลของโปรตีน และเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนด้วยกันให้มากขึ้น การตกตะกอนโปรตีนทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีหลักการ ข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกันออกไป โดยทั่วไปการเลือกวิธีใดมักคำนึงถึงสภาพธรรมชาติของโปรตีนหลังผ่านกรรมวิธีเป็นหลัก บางวิธีทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ สูญเสียการละลายกลับและการทำงานทางชีวกิจกรรม เช่น การตกตะกอนโดยใช้ความร้อน การใช้กรดหรือด่างเข้มข้น เป็นต้น บางวิธีไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ เช่น การตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริกของ

โปรตีน การตกตะกอนด้วยเกลือ หรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นต้น วิธีตกตะกอนโปรตีนบางวิธีมีประโยชน์ในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ มีความจำเพาะพอควรที่สามารถแยกโปรตีนออกเป็นชนิดหรือเป็นกลุ่มย่อยออกจากโปรตีนผสม แต่บางวิธีก็ขาดความจำเพาะเพียงแต่แยกโปรตีนออกจากสารอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนเท่านั้น วิธีการตกตะกอนโปรตีนที่พบได้บ่อยมีดังนี้ คือ

1. การตกตะกอนด้วยความร้อน การละลายของโปรตีนลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โปรตีนส่วนใหญ่มักเริ่มเสียสภาพธรรมชาติเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 50 °ซ บางชนิดมีการจับตัวเป็นก้อนลิ่ม (coagulation) ได้ เช่น อัลบูมินของไข่ขาว แต่บางชนิด เช่น เคซีนไม่เกิดการจับตัวเป็นก้อนลิ่ม การทราบเสถียรภาพต่ออุณหภูมิ (temperature stability) อาจมีประโยชน์ในการแยกโปรตีนที่ต้องการออกจากโปรตีนชนิดอื่น ๆ โดยใช้ความร้อนทำให้โปรตีนที่มีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิไม่ดีเสียสภาพธรรมชาติแล้วปั่นแยกออกก็จะเหลือแต่โปรตีนที่มีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิดีกว่า คงสภาพธรรมชาติและสามารถละลายอยู่ในสารละลาย

2. การตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีน (isoelectric point precipitation) โปรตีนแต่ละชนิดมีจุดไอโซอิเล็กทริก (p*I*) เฉพาะ เมื่อพีเอชของสารละลายมีค่าเท่ากับค่าจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนนั้น ๆ โปรตีนนั้นจะมีการละลายน้อยที่สุดโดยที่ไม่มีการเสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ จึงไม่เกิดแรงผลักดันกันทางไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างโมเลกุลโปรตีนด้วยกันและส่งเสริมให้เกิดอันตรกิริยาต่อกันได้ง่ายและมากขึ้น เป็นผลให้โปรตีนเกิดการรวมกัน (aggregate) และตกตะกอนออกมา วิธีนี้จึงสามารถแยกโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งที่ทราบจุดไอโซอิเล็กทริกออกมาได้ ส่วนโปรตีนชนิดอื่นที่มีค่านี้สูงหรือต่ำกว่า ยังคงละลายอยู่ อย่างไรก็ตามการแยกโปรตีนไม่ได้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ทุกกรณี หากโปรตีนผสมนั้นมีหลายชนิดที่มีจุดไอโซอิเล็กทริกไม่แตกต่างกันชัดเจน ตะกอนโปรตีนที่ต้องการนั้นจะมีการปนของโปรตีนชนิดอื่นที่มีค่านี้ใกล้เคียงกันรวมอยู่ด้วย

3. การตกตะกอนด้วยเกลือ เกลือมีผลต่อการละลายของโปรตีน 2 ลักษณะ คือ ที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำและเป็นสารละลายที่มีความแรงไอออน (ionic strength) ต่ำ โปรตีนสามารถละลายได้ดีขึ้นเมื่อเทียบกับการละลายในน้ำธรรมดา เนื่องจากไอออนในสารละลายมีอันตรกิริยาทางไอออนิกกับประจุบนผิวของโปรตีน ทำให้อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันลดลง โปรตีนจึงละลายได้มากขึ้น ปรากฏการณ์ลักษณะนี้เรียกว่า **"salting in"** แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มความแรงไอออนของสารละลายให้สูงตามไปด้วยนั้น จะทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน ซึ่งเรียกปรากฏการณ์ลักษณะนี้ว่า **"salting out"** โดยเกิดขึ้นจากการทำให้ประจุบนผิวโปรตีนเป็นกลางด้วยไอออนของเกลือและการลดความเข้มข้นยังผล (effective concentration) ของน้ำต่อการละลายของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับไอออนของเกลือ โดยทั่วไปเกลือที่ใช้มีสมบัติละลายน้ำได้ดีมาก ไอออนของเกลือจึงแย่งโมเลกุลของน้ำออกจากโปรตีน เมื่ออันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับน้ำเหลือน้อยกว่าอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนจึงจับตัวกันตกตะกอนออกมา

เกลือที่ละลายน้ำได้ดีมากและมีการนำไปใช้ตกตะกอนโปรตีน เช่น โซเดียมคลอไรด์ (การอิ่มตัวที่ 20 °ซ มีความเข้มข้นเป็น 5.33 โมลาร์) โซเดียมซัลเฟต(การอิ่มตัวที่ 20 °ซ มีความเข้มข้นเป็น 1.88 โมลาร์) แอมโมเนียมซัลเฟต (การอิ่มตัวที่อุณหภูมิระหว่าง 0-25 °ซ มีความเข้มข้นประมาณ 4 โมลาร์) แมกนีเซียมซัลเฟต โซเดียมฟอสเฟต เป็นต้น เกลือไอออนลบที่มีประจุลบมาก มีประสิทธิภาพในการตก

ตะกอนได้ดี ซึ่งเรียงลำดับจากมากสู่น้อยเป็นดังนี้ คือ ฟอสเฟต ซัลเฟต แอซีเตท และคลอไรด์ ส่วนประสิทธิภาพการตกตะกอนของไอออนบวกมีลำดับจากมากสู่น้อยเป็น แอมโมเนียม โปตัสเซียม และโซเดียมไอออน

เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเกลือที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ

1) ที่ระดับการอิ่มตัว ก็มีความเข้มข้นสูงพอที่จะตกตะกอนโปรตีนส่วนใหญ่ออกมาหมด
2) ไม่เกิดความร้อนมากนัก เมื่อเติมผลึกเกลือลงในสารละลาย ดังนั้นความร้อนที่เกิดขึ้นจึงหายไปได้ไว
3) ความหนาแน่นของสารละลายอิ่มตัว (4.04 โมลาร์ ที่ 20 °ซ) มีค่าประมาณ 1.235 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งไม่สูงมากจนมีผลต่อการปั่นเหวี่ยงให้ตะกอนโปรตีนตกตะกอนลงมา
4) ยับยั้งหรือจำกัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้
5) สามารถป้องกันโปรตีนส่วนใหญ่จากการสูญเสียสภาพธรรมชาติ

สารละลายผสมโปรตีนหลายชนิดสามารถนำมาตกตะกอนด้วยเกลือและแยกเป็นลำดับส่วนตามความเข้มข้นของเกลือที่มีการเพิ่มเป็นลำดับ วิธีนี้เรียกว่า **การตกตะกอนเป็นลำดับส่วนด้วยเกลือ (salt fractionation)** ความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนชนิดหนึ่ง ๆ จะสัมพันธ์ถึงจำนวนและการกระจายตัวของประจุและหมู่มีขั้วบนผิวของโมเลกุลโปรตีน และจำนวนและการกระจายตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่ปรากฏอยู่ผิวภายนอก ซึ่งมีความสำคัญมากขึ้นเมื่อประจุถูกทำให้เป็นกลาง รวมไปถึงขนาดและรูปร่างของโปรตีนที่เอื้อให้ง่ายต่อการตกตะกอน วิธีการนี้มีประโยชน์มากและใช้กันแพร่หลาย โดยใช้เป็นขั้นตอนแรกของการทำให้โปรตีนที่สกัดจากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตมีความบริสุทธิ์มากขึ้น อุณหภูมิที่ใช้มักเป็นอุณหภูมิต่ำ (4 °ซ) เพื่อรักษาสภาพธรรมชาติของโปรตีนโดยเฉพาะเอนไซม์

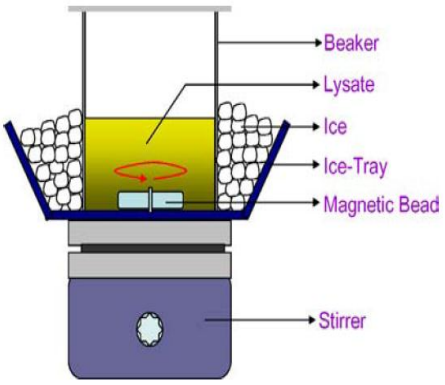
4. การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีน ได้แก่ อะซีโตน เอธานอล เมธานอล และบิวทานอล ทั้งหมดล้วนมีส่วนโครงสร้างที่ไม่ชอบน้ำและมีขั้วอยู่ในตัวโมเลกุล จึงละลายเข้ากับน้ำได้ น้ำซึ่งมีค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) สูง เมื่อมีตัวทำละลายอินทรีย์ผสมอยู่ด้วย จะทำให้ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกลดลง เป็นผลให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง และมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนด้วยกันจนจับตัวกันเป็นตะกอนตกลงมา

ปัญหาของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการตกตะกอนโปรตีนคือ ความร้อนที่เกิดขึ้นเมื่อเติมลงในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติได้ถ้ากระทำที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 °ซ โดยทั่วไปวิธีนี้ต้องทำที่อุณหภูมิต่ำมากในช่วง -20 °ซ ถึง 4 °ซ ภาชนะที่ใช้ควรทำจากเหล็กกล้าไร้สนิม(stainless steel) แก้ว และไม่ควรใช้ภาชนะที่ทำจากพลาสติก ทั้งนี้เพื่อให้การถ่ายเทความร้อนที่เกิดขึ้นเป็นไปอย่างรวดเร็ว อุณหภูมิต้องมีการควบคุมไว้เป็นอย่างดีระหว่างการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ โดยแช่ภาชนะไว้ในอ่างน้ำแข็ง และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่แช่เย็นจัด (-20 °ซ) การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ต้องเป็นไปช้า ๆ ทีละหยด พร้อม ๆ กับกวนสารละลายไปด้วยเครื่องกวน เมื่อการเติมเสร็จสิ้น ตั้งทิ้งไว้สักครู่ให้เกิดภาวะสมดุลก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำ (0 °ซ) ตะกอนโปรตีนตกลงมาได้ง่าย เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์มีความหนาแน่นต่ำกว่าตะกอนโปรตีน สามารถเก็บไว้ที่ -70 °ซ ก่อนนำไปใช้ต่อไป

5. การตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนที่เป็นแคตไอออน (cationic precipitant) การตกตะกอนวิธีนี้ต้องปรับพีเอชของสารละลายโปรตีนให้มีค่าสูงกว่าจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีน เพื่อให้โมเลกุลของ

โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ สารตกตะกอนที่เป็นแคตไอออนจึงสามารถเข้าจับตัวได้ดีกับหมู่ซัลไฮดริล (-SH) อิสระและหมู่คาร์บอกซีที่แตกตัว ($-COO^-$) ของโปรตีนแล้วเชื่อมโยงโมเลกุลของโปรตีนมารวมกันจนมีขนาดใหญ่และตกตะกอน โดยทั่วไปใช้สารละลายโปรตีนที่เป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย และแคต-ไอออนที่ใช้กัน เช่น ไอออนของปรอท ทองแดง สังกะสี แบเรียม เป็นต้น

6. การตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนที่เป็นแอนไอออน (anion precipitant) หรือแอนไอออนเชิงซ้อน (complex anion) เมื่อสารละลายโปรตีนมีพีเอชต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีน ทำให้โปร-ตีนมีประจุสุทธิเป็นบวก สามารถรวมตัวกับแอนไอออนของกรดซึ่งมีขนาดใหญ่และมีประจุลบโดยแรงดึง-ดูดทางไฟฟ้า เป็นผลให้โปรตีนรวมตัวกันและตกตะกอน สารตะกอนที่เป็นแอนไอออนที่นิยมใช้กัน ได้แก่ กรดไตรคลอโรแอซีติก (trichloroacetic acid, CCl_3COOH) กรดพิคริก (Picric acid, $C_6H_2(NO_2)_3OH$) กรดทังสติก (tungstic acid, H_2WO_4) กรดเปอร์คลอริก (perchloric acid, $HClO_4$) วิธีการนี้ มักใช้ในการแยกกำจัดโปรตีนออกจากสารละลายโดยไม่มีความจำเพาะ



ภาพที่ 5.1 วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ที่มา : Wenk และ Fernandis (2007)

การทดลองที่ 5.1 การตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริก

น้ำนมประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ที่พบมากคือ เคซีน การแยกเคซีนสามารถทำได้โดยวิธีการตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กทริก ซึ่งเคซีนมีจุดไอโซอิเล็กทริก เท่ากับ 4.8 ส่วนโปรตีนที่ยังคงเหลือของน้ำนม ซึ่งเรียกรวมกันว่า whey protein อันประกอบด้วยโปรตีนกลุ่มอัลบูมิน ที่เรียกว่าแล็กตัลบูมิน (lactal-bumin) และกลุ่มโกลบูลิน เรียกว่า แล็กโตโกลบูลิน (lactoglobulin) จะทำการตกตะกอนต่อไปในการทดลองที่ 5.2

สารเคมีที่ใช้ 1. นมสด

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์

วิธีทดลอง

1. ผสมนมสด 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ใส่แท่งแม่เหล็กขนาดเล็กลงในนมสด แล้วนำบีกเกอร์วางไว้บนเครื่องกวน (magnetic stirrer) ปรับให้อัตราเร็วของการกวนเกิดขึ้นอย่างพอเหมาะ แล้วจุ่มอิเล็กโทรดของเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่างลงในน้ำนมสดไว้ติดตามการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อเติมกรด

3. ค่อย ๆ เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ ลงไปช้า ๆ ทีละหยด เติมไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งค่าพีเอชเท่ากับ 4.8 พอดี ให้หยุดการเติมกรด แล้วกวนต่อไปอีกสักระยะ (ประมาณ 3 นาที) แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนอีกประมาณ 20-30 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ได้ออกด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทเก็บส่วนใสไว้สำหรับใช้ในการทดลองที่ 5.2 และ 5.3
5. สังเกตลักษณะตะกอนเคซีนที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง

ผลการทดลองและสรุปวิจารณ์ผลการทดลองที่ 5.1

พีเอชของน้ำนม ก่อนการเติมกรดปรับพีเอช มีค่าเท่ากับ .....
ตะกอนที่ตกลงมา ส่วนใหญ่คือ โปรตีน.....
โปรตีนที่ยังละลายอยู่ในส่วนใส เช่น .....

การทดลองที่ 5.2 การตกตะกอนด้วยเกลือ

สารเคมีที่ใช้ 1. ส่วนใสจากการทดลองที่ 5.1
2. ผลึกแอมโมเนียซัลเฟตที่บดเป็นผง
3. สารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติก (10% น้ำหนักโดยปริมาตร)

วิธีทดลอง

1. ตวงส่วนใสที่ได้จากการทดลองที่ 5.1 ลงในบีกเกอร์ 20 มิลลิลิตร ซึ่งตอนนี้มีระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 0 อ่านปริมาณน้ำหนักเกลือแอมโมเนียซัลเฟตที่ต้องเติมจากตารางข้างล่างนี้ ให้มีระดับความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 50 ซึ่งต้องใช้ 291 กรัมต่อปริมาตรสารละลาย 1 ลิตร คำนวณน้ำหนักเกลือแอมโมเนียซัลเฟตที่ต้องใช้ในการนี้

Table A.1 Amount of Ammonium sulfate required for protein precipitation.

Initial concentration of ammonium sulfate	Percentage saturation at 0°																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (grams) to be added to 1 liter of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

ที่มา : Wenk และ Fernandis (2007)

2. เมื่อละลายเกลือแอมโมเนียซัลเฟตที่ชั่งมาเติมใส่จนละลายหมดแล้ว เทใส่หลอดปั่นเหวี่ยง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ได้ออกด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
3. เทแยกส่วนใสออก สังเกตพบตะกอนที่หลอดปั่นเหวี่ยงหรือไม่ ถ้ามีตะกอนนี้ควรพบโปรตีนในน้ำนมชนิดใด
4. ตวงส่วนใสที่ได้ในข้อ 3 มาลงในบีกเกอร์ 20 มิลลิลิตร ซึ่งตอนนี้มีระดับความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 50 อ่านปริมาณน้ำหนักเกลือแอมโมเนียซัลเฟตที่ต้องเติมจากตารางข้างล่างนี้ ให้มีระดับความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 100 ซึ่งต้องใช้ 696 กรัมต่อปริมาตรสารละลาย 1 ลิตร คำนวณน้ำหนักเกลือแอมโมเนียซัลเฟตที่ต้องใช้ในการนี้
5. เมื่อละลายเกลือแอมโมเนียซัลเฟตที่ชั่งมาเติมใส่จนละลายหมดแล้ว เทใส่หลอดปั่นเหวี่ยง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ได้ออกด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
6. เทแยกส่วนใสออก สังเกตพบตะกอนที่หลอดปั่นเหวี่ยงหรือไม่ ถ้ามีตะกอนนี้ควรพบโปรตีนในน้ำนมชนิดใด
7. นำส่วนใสที่ได้ในข้อ 3 มาลงในหลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติก (10% น้ำหนักโดยปริมาตร) ทีละหยด สังเกตมีการเกิดตะกอนโปรตีนอีกหรือไม่

ผลการทดลองและสรุปวิจารณ์ผลการทดลองที่ 5.2

การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	น้ำหนักเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในบีกเกอร์ (กรัม)	ระดับความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ร้อยละ)	ชนิดของโปรตีนในน้ำนมที่จะพบในส่วนใสหลังการปั่นเหวี่ยง	ชนิดของโปรตีนในน้ำนมที่จะพบในส่วนตะกอนหลังการปั่นเหวี่ยง
ขั้นที่ 1				
ขั้นที่ 2				

การทดลองที่ 5.3 การตกตะกอนด้วยความร้อน

สารเคมีที่ใช้ 1. ส่วนใสที่แบ่งจากการทดลองที่ 5.1

วิธีทดลอง

1. นำหลอดส่วนใสที่แบ่งจากการทดลองที่ 5.1 มาใส่ลงในหลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร ไปแช่ในอ่างน้ำเดือด ต้มจนส่วนใสในหลอดเดือดเป็นเวลา 20 นาที
2. สังเกตพบตะกอนในหลอดทดลองหรือไม่ และสรุปว่าจะพบโปรตีนในน้ำนมชนิดใดที่จะอยู่ในตะกอนนั้น

ผลการทดลองและสรุปวิจารณ์ผลการทดลองที่ 5.3

ลักษณะที่พบในหลอดทดลอง คือ.....

ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้น โปรตีนในน้ำนมที่จะพบในตะกอน คือ .....

คำถาม

เมื่อนำตะกอนที่ได้จากการทดลองที่ 5.2 และ 5.3 ไปละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ตะกอนจะละลายทุกขั้นตอนหรือไม่ เพราะเหตุใด จงอธิบาย

การทดลองที่ 5.4 การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

สารเคมีที่ใช้
1. พลาสมาเลือดไก่ (แช่ในอ่างน้ำแข็ง)
2. เอธานอล ร้อยละ 95
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.3

วิธีทดลอง

1. เติมพลาสมาเลือดไก่ลงในหลอดทดลองเปล่าที่แช่ในน้ำแข็งเพื่อทำให้เย็น 2 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร
2. นำพลาสมาเลือดไก่หลอดหนึ่งที่แช่ให้เย็นในอ่างน้ำแข็งมาค่อย ๆ เติมเอธานอลร้อยละ 95 ที่แช่เย็นทีละหยดจนครบ 1 มิลลิลิตร แล้วแช่ทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที
3. นำพลาสมาเลือดไก่ที่เหลืออีกหลอดหนึ่งไปแช่ไว้ในอ่างน้ำอุ่น อุณหภูมิ 50°ซ แล้วค่อย ๆ เติมเอธานอล ร้อยละ 95 (ไม่ต้องแช่เย็น) ทีละหยดจนครบ 1 มิลลิลิตร แล้วแช่ทิ้งไว้ 5 นาที
4. นำทั้งสองหลอดมาเปรียบเทียบปริมาณตะกอน
5. เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.3 ลงในหลอดทั้งสอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเปรียบเทียบปริมาณตะกอนในหลอดทั้งสอง

ผลการทดลอง

	หลอดที่แช่อ่างน้ำแข็ง	หลอดที่แช่อ่างน้ำอุ่น
เมื่อเติมเอธานอล		
เมื่อเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ พีเอช 7.3		

สรุปวิจารณ์ผลการทดลองที่ 5.4

การทดลองที่ 5.5 การตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนที่เป็นแคตไอออน

สารเคมีที่ใช้
1. พลาสมาเลือดไก่
2. สารละลายสังกะสีแอซีเตท 5 มิลลิโมลาร์
3. สารละลายปรอทคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์
4. สารละลายกรดเอธิลีนไดเอมีนเตตราแอซีติก ในรูปเกลือโซเดียม (ethylene diamine tetraacetic acid (sodium salt), EDTA) 0.05 โมลาร์

วิธีทดลอง

1. เติมพลาสมาเลือดไก่ ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายสังกะสีแอซีเตต 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 และเติมสารละลายปรอทคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากันแล้วเปรียบเทียบผล หลังจากนั้น 10 นาที สังเกตผลและเปรียบเทียบปริมาณตะกอนอีกครั้งหนึ่ง
3. เติมสารละลายกรดเอธิลีนไดเอมีนเตตราแอซีติกในรูปเกลือโซเดียม ลงไปในทั้งสองหลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สังเกตผลที่เกิดขึ้น

ผลการทดลอง

	หลอดที่ 1 ที่เติมสารละลายสังกะสีแอซีเตต	หลอดที่ 2 ที่เติมสารละลายปรอทคลอไรด์
ลักษณะที่ปรากฏ		
ลักษณะที่เห็นหลังเติมสารละลายกรดเอธิลีนไดเอมีนเตตราแอซีติก		

สรุปวิจารณ์ผลการทดลองที่ 5.5

คำถาม

EDTA ทำหน้าที่อย่างไร จงอธิบาย

การทดลองที่ 5.6 การตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนที่เป็นแอนไอออน (แอนไอออนเชิงซ้อน)

สารเคมีที่ใช้

1. พลาสมาเลือดไก่
2. สารละลายอิ่มตัวของกรดพิคริก
3. สารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติก (10% น้ำหนักโดยปริมาตร)
4. สารละลายโซเดียมทังสเตท (10% น้ำหนักโดยปริมาตร)
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (10% น้ำหนักโดยปริมาตร)
6. น้ำยาไบยูเรท
7. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์

วิธีทดลอง

1. เติมพลาสมาลงในหลอดทดลอง 3 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร เขียนระบุบนหลอดไว้เป็นหลอดที่ 1-3
2. เติมสารละลายอิ่มตัวของกรดพิคริก 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 1 เติมสารละลายกรดไตรคลอโร-แอซีติก 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 2 และเติมสารละลายโซเดียมทังสเตท 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่ 3 ผสมเข้ากัน สังเกตการเกิดตะกอน
3. สำหรับหลอดที่มีตะกอนเกิดขึ้นในครั้งแรกนี้ ให้ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก แล้วเทส่วนใสเก็บไว้ในหลอดทดลองหลอดใหม่
4. นำหลอดส่วนใสที่ได้ในข้อ 3 ไปเติมน้ำยาไบยูเรท หลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที สังเกตผล
5. นำตะกอนที่ได้จากข้อ 3 มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทีละหยด สังเกตว่าตะกอนกลับไปละลายได้อีกและละลายได้หมดหรือไม่
6. สำหรับหลอดที่ไม่มีตะกอนเกิดขึ้นในครั้งแรก ให้เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ ลงไปเรื่อย ๆ ทีละหยด แล้วสังเกตว่าสามารถเกิดตะกอนได้หรือไม่

ผลการทดลอง

	หลอดที่ 1 ที่เติมสารละลายอิ่มตัวของกรดพิคริก	หลอดที่ 2 ที่เติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติก	หลอดที่ 3 ที่เติมสารละลายโซเดียมทังสเตท
การเกิดขึ้นของตะกอน (รายงาน พบ หรือ ไม่พบ)			
การเกิดขึ้นของตะกอนหลังการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 โมลาร์ (เฉพาะหลอดที่ไม่เกิดตะกอนในครั้งแรก)			
สีที่ปรากฏหลังทดสอบส่วนใสด้วยน้ำยาไบยูเรท			
การละลายของตะกอนเมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์			

หมายเหตุ ช่องใดไม่ได้ทำการทดลอง ให้ระบุว่า ไม่ได้ทดสอบ

สรุปวิจารณ์ผลการทดลองที่ 5.6

คำถาม

1. แอนไอออนที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนครั้งนี้คืออะไร (เขียนตอบในรูปโครงสร้างเคมีของแอนไอออนนั้น ๆ)

2. แอนไอออนที่ใช้ในครั้งนี้สามารถตกตะกอนได้สำเร็จทุกชนิดหรือไม่ เพราะเหตุใด จงสรุปสภาวะที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

3. เพราะเหตุใดการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จึงทำให้โปรตีนกลับมาละลายได้อีก และโปรตีนที่สามารถกลับมาละลายได้อีกนั้น สภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นอย่างไร เหตุใดจึงเป็นเช่นนั้น