การผลิตสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติ

PROTEIN DYE PRODUCTION FROM NATURAL MATERIALS

กันต์สินี แก้วเกตุ

ธนภัทร จารุพัฒนเดช

ธัญธร กลัดบุบผา

ไปรยา ณ น่าน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PROTEIN DYE PRODUCTION FROM NATURAL MATERIALS

KANSINEE KAEWKATE

THANAPAT JARUPATANADECH

THANYATHORN KLADBUBPA

PAIRAYA NA NAN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN MICROBIOLOGY DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ACADEMIC YEAR 2018

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติ

Protein Dye Production from Natural Materials

ชื่อนักศึกษา นางสาวกันต์สินี แก้วเกตุ รหัสนักศึกษา 58050858

นางสาวธนภัทร จารุพัฒนเดช รหัสนักศึกษา 58050894

นางสาวธัญธร กลัดบุบผา รหัสนักศึกษา 58050899

นางสาวไปรยา ณ น่าน รหัสนักศึกษา 58050932

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ประธานกรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติ
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกันต์สินี แก้วเกตุ รหัสนักศึกษา 58050858
	นางสาวธนภัทร จารุพัฒนเดช รหัสนักศึกษา 58050894
	นางสาวธัญธร กลัดบุบผา รหัสนักศึกษา 58050899
	นางสาวไปรยา ณ น่าน รหัสนักศึกษา 58050932
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์

บทคัดย่อ

ในทางการค้าสิ่งที่สำคัญของการผลิตสีย้อมโปรตีน คือ ต้องมีคุณสมบัติในการยึดติดโปรตีน ซึ่งสีย้อมที่นิยมใช้คือ Coomassie brilliant blue ซึ่งเป็นสีย้อมสังเคราะห์ที่มีราคาสูง ในงานวิจัยจึงได้คัดเลือกสีจากวัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ผงขมิ้นสด ผงขมิ้นสำเร็จรูป ลูกหม่อน เปลือกมังคุด ข้าวโพดม่วง ทับทิม บีทรูทและอัญชัน เพื่อนำมาทดแทนสีย้อมสังเคราะห์ดังกล่าว จากนั้นวิเคราะห์โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel doc) ผลที่ได้พบว่าแถบโปรตีนติดสีโดยผงขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อนเวลาการย้อมที่ข้ามคืนและ 90 นาที ตามลำดับ จากนั้นพบว่าความเข้มข้นน้ำย้อมของทั้งผงขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อน คือ 20 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของน้ำล้างที่ใช้ล้างสีย้อมส่วนเกิน พบว่าการใช้น้ำดีที่สุด และยังพบอีกว่าความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนของผงขมิ้นสำเร็จรูป คิดเป็น 25 ไมโครกรัม ในขณะที่ลูกหม่อนคิดเป็น 5 ไมโครกรัม

คำสำคัญ : ข้าวโพดม่วง, ขมิ้นสด, ขมิ้นสำเร็จรูป, เครื่องถ่ายภาพเจล, ทับทิม, บีทรูท, เปลือกมังคุด, ลูกหม่อน, อัญชัน, Coomassie brilliant blue, SDS-PAGE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Protein Dye Production from Natural Materials		
Students	Miss Kansinee	Kaewkate	Student ID 58050858
	Miss Thanapat	Jarupatnadech	Student ID 58050894
	Miss Thanyathorn	Kladbubpa	Student ID 58050899
	Miss Pairaya	Na Nan	Student ID 58050932
Degree	Bachelor of Science (Microbiology)		
Department	Biology		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2018		
Advisor	Asst.Prof. Dr. Cherdsak Maneeruttanarungroj		

Abstract

In commerce, production of protein dye is focused on the property of dye that can attach to protein. Coomassie brilliant blue is widely use but expensive. In this study, we random selected dye from natural materials; turmeric powder (natural), commercial turmeric powder, mulberry, mangosteen shell, purple corn, pomegranate, beetroot and butterfly pea for using instead of Coomassie brilliant blue. Then we observed the protein bands with the naked eyes and using Gel doc instrument. The result showed that commercial turmeric powder and mulberry were best dye when compared with other dyes 20% of concentration of dye was used to stain for overnight and 60 minutes respectively, with which destaining by water is the most effective eluent with the protein sensitivity of 25 microgram and 5 micrograms respectively.

Keywords : beetroot, butterfly pea, commercial turmeric powder, Coomassie brilliant blue, Gel-doc, mangosteen shell, mulberry, natural materials, pomegranate, purple corn, SDS-PAGE, turmeric powder (natural)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยความกรุณา ความช่วยเหลือและการสนับสนุนจากหลายๆท่านจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่สละเวลาให้คำปรึกษา ให้ข้อมูลความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างมาก รวมถึงชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆตลอดจนการแก้ปัญหาที่เกิดจากการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา และ ดร.กานต์ วงศาริยะ ที่ให้ความอนุเคราะห์มาเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบโครงงานพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ ให้คำแนะนำตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาที่ให้คำแนะนำ รวมถึงอำนวยความสะดวกในสถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆที่ใช้ตลอดการศึกษาและการทำโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้อบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษา ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนเสมอมา สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆและผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามที่มีส่วนร่วมในการให้ความร่วมมือ ความช่วยเหลือรวมถึงความคิดเห็นในด้านต่างๆที่มีส่วนช่วยให้การจัดทำโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

กันต์สินี แก้วเกตุ
ธนภัทร จารุพัฒนเดช
ธัญธร กลัดบุบผา
ไปรยา ณ น่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญรูป..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย..... 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 โปรตีน..... 4
2.1.1 หน่วยย่อยของโปรตีน..... 4
2.1.2 โครงสร้างของโปรตีน..... 7
2.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE..... 9
2.3 สีย้อมโปรตีน..... 14
2.3.1 Coomassie Brilliant Blue..... 14
2.3.2 Silver nitrate..... 15
2.3.3 Sypro-Ruby..... 16
2.3.4 Deep Purple..... 17
2.4 สีย้อมธรรมชาติและการย้อมติดสีโปรตีน..... 18
2.4.1 ขมิ้น..... 18
2.4.2 ลูกหม่อน..... 19
2.4.3 บีทรูท..... 20
2.4.4 ทับทิม..... 21
2.4.5 อัญชัน..... 22
2.4.6 ข้าวโพดม่วง..... 23
2.4.7 เปลือกมังคุด..... 24
2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น การอ้างอิงถึงเอกสารนี้ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย **31**
3.1 การเตรียมน้ำย้อม 33
3.2 การเตรียมเจล 33
3.3 การเตรียมสารเคมีที่เกี่ยวข้อง 34
3.4 การแยกโปรตีน 35
3.5 การย้อมและการล้างสีย้อมโปรตีน 36
3.6 การปรับสภาวะการย้อมสีโปรตีน 36
3.6.1 อิทธิพลของเวลาในการย้อม 36
3.6.2 อิทธิพลของความเข้มข้นน้ำย้อม 36
3.6.3 อิทธิพลของน้ำที่ใช้ล้าง 36
3.6.4 ความว่องไวในการตรวจติดตามปริมาณโปรตีน 36
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปราย **38**
4.1 ผลการละลายของสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติ 38
4.2 ผลการย้อมติดสีของโปรตีนใน SDS-PAGE 39
4.3 ผลของเวลาต่อการติดสีของโปรตีน 40
4.4 ผลของความเข้มข้นต่อการติดสีของโปรตีน 42
4.5 ผลของชนิดน้ำที่ใช้ล้าง 44
4.6 ผลของความเข้มข้นโปรตีนต่อการติดสีของโปรตีน 46
4.7 สรุปวิธีการย้อมโปรตีนจากลูกหม่อนและขมิ้นในน้ำ 47
4.8 การเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ย้อมโปรตีน 49
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ **50**
5.1 สรุปผลการวิจัย 50
5.2 ข้อเสนอแนะ 50
บรรณานุกรม 51
ภาคผนวก ก ส่วนประกอบของอุปกรณ์ SDS-PAGE 55
การเตรียมเจล 55
ภาคผนวก ข การแยกโปรตีน 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของ Carmoisine-Red-3 และ Coomassie Brilliant Blue R- 250..... 25

2.2 การเปรียบเทียบระหว่าง Carmoisine-Red-3 และ Coomassie Brilliant Blue R-250 26

3.1 ปริมาณสารที่ใช้เตรียม Separating gel และ Stacking gel..... 34

3.2 ปริมาณสารที่ใช้เตรียม 10x Running buffer..... 35

3.3 ปริมาณสารที่ใช้เตรียม 6x Loading dye..... 35

4.1 การเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ย้อมโปรตีนกับความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีน..... 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของกรดอะมิโน.... 4
2.2 Hydroxyl amino acid.... 4
2.3 Amide amino acid, Cysteine และ Glycine.... 5
2.4 หมู่ R ที่มีประจุบวก (positively charge).... 5
2.5 หมู่ R ที่มีประจุลบ (negatively charge).... 6
2.6 หมู่ R เป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (nonpolar).... 6
2.7 โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure).... 7
2.8 โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure).... 8
2.9 โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure).... 8
2.10 โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure).... 9
2.11 ส่วนประกอบต่างๆที่ใช้การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE.... 10
2.12 แผนภาพการเสียสภาพของโปรตีนในเทคนิค SDS-PAGE.... 10
2.13 เจลในส่วน stacking gel และ separating gel ในเทคนิค SDS-PAGE.... 11
2.14 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แบบ discontinuous gel.... 12
2.15 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation).... 13
2.16 โครงสร้างทางเคมีของ Coomassie Brilliant Blue R-250 และ G-250.... 14
2.17 ผลการย้อมโปรตีนโดยย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue.... 15
2.18 ผลการย้อมโปรตีนโดยย้อมด้วย Silver nitrate.... 16
2.19 ผลการย้อมโปรตีนโดยย้อมด้วย Sypro-Ruby.... 16
2.20 ผลการย้อมโปรตีนโดยย้อมด้วย Deep Purple.... 17
2.21 ขมิ้น.... 18
2.22 ลูกหม่อน.... 19
2.23 บีทรูท.... 20
2.24 ทับทิม.... 21
2.25 อัญชัน.... 22
2.26 ข้าวโพดม่วง.... 23
2.27 มังคุด.... 24
2.28 โปรตีนที่ถูกย้อมด้วย Carmoisine-Red-3 และ Coomassie Brilliant Blue R-250.... 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.29 ประสิทธิภาพของสีย้อมธรรมชาติ HB มาจาก hennaและ beetroot : HCT มาจาก Henna, Coffee และ Tea อุณหภูมิในการย้อม (1) RT (2) 37° C (3) 120 ° C (4) ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue..... 27
2.30 ประสิทธิภาพของสีย้อมธรรมชาติ HB มาจาก henna และ beetroot : HCT มาจาก Henna, Coffee และ Tea ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue..... 27
2.31 ผลโครมาโทแกรมที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร..... 28
2.32 อัตราการจับกันและตัวเลขแอนโทไซยานินที่จับกับโปรตีนต่อมิลลิกรัม..... 29
2.33 ไดอะแกรมการพิจารณาเทคนิค Mass spectrometry ของแอนโทไซยานิน..... 30
4.1 ผลการละลายของสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติที่ละลายในน้ำและเอทานอล..... 38
4.2 ผลการทดสอบการย้อมติดสีของโปรตีนใน SDS-PAGE..... 39
4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูป ที่เวลา 30, 60, 90 นาทีและข้ามคืน..... 40
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมลูกหม่อน ที่เวลา 30, 60, 90 นาทีและข้ามคืน..... 41
4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปในน้ำ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30..... 42
4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมลูกหม่อนในน้ำ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30..... 43
4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูป ที่ล้างด้วย 5% Acetic acid, น้ำ และ Destain..... 44
4.7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมลูกหม่อน ที่ล้างด้วย 5% Acetic acid, น้ำ และ Destain..... 45
4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูป โดยปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนคือ 5 ไมโครกรัม ถึง 50 ไมโครกรัม..... 46
4.9 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมลูกหม่อน โดยปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนคือ 5 ไมโครกรัม ถึง 50 ไมโครกรัม..... 47
ก-1 ส่วนประกอบต่างๆของอุปกรณ์ SDS-PAGE..... 55
ก-2 การประกอบกระจกวางบน Casting stand..... 56
ก-3 การเติม Separating gel ลงใน gel sandwich..... 56
ก-4 การนำ comb มาใส่ช่องว่างของกระจก..... 57
ก-5 การประกอบเข้าหากันของกระจกที่ Clamping frames..... 57
ข-6 การใช้ Sample loading guides..... 58
ข-7 การต่อเข้ากับแหล่งกำเนิดไฟฟ้า..... 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-8 การตัดส่วน Stacking gel ส่วน Separating gel ใส่กล่องพลาสติก..... 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

สีธรรมชาติ เป็นสีที่สกัดได้จากวัตถุดิบตามแหล่งธรรมชาติ เช่น สัตว์ พืช หรือแร่ธาตุต่างๆ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับวิถีการดำรงชีวิตของมนุษย์มาตั้งแต่สมัยโบราณ มนุษย์ได้เรียนรู้ที่จะนำสีจากวัสดุธรรมชาติมาใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น ทาสีตามร่างกาย การย้อมเสื้อผ้าสิ่งทอ เครื่องใช้ เครื่องนุ่งห่ม หรือสีของภาชนะเครื่องปั้นดินเผา กิจกรรมภาพวาดฝาผนัง และเป็นส่วนประกอบในพิธีกรรมต่างๆ ตามความเชื่อของแต่ละท้องถิ่น ซึ่งมีพัฒนาการสืบทอดมาจนถึงปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น การใช้สีในการประกอบอาหารและขนม การย้อมเสื้อผ้าสิ่งทอ เครื่องนุ่งห่ม การย้อมเครื่องมือเครื่องใช้ในครัวเรือน เช่น เครื่องมือดักจับสัตว์น้ำ และการวาดภาพเขียน ในปัจจุบันมีการกลับมาให้ความสนใจในการใช้สีจากวัสดุธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างพืชที่ให้สี เช่น อัญชันให้สีน้ำเงิน ขมิ้นให้สีเหลือง ใบเตยให้สีเขียว ลูกหม่อนให้สีม่วงแดง เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้มองเห็นถึงประโยชน์ของสีย้อมจากธรรมชาติ จึงนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านสารชีวโมเลกุล นั้นคือ โปรตีน ในปัจจุบันการตรวจสอบโปรตีนที่ผ่านการทำอิเลคโตรโฟรีซิสจะใช้สารสีสังเคราะห์ คือ Coomassie Brilliant Blue ในการย้อมซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและใช้กันแพร่หลายโดยทั่วไป Coomassie Brilliant Blue จับกับโปรตีนด้วยแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกและแรงยึดเหนี่ยวไอออนิกรวมกัน ประจุบวกที่แขนงข้างของกรดอะมิโนโดยเฉพาะส่วนที่เหลือของอาร์จีนีนมีบทบาทสำคัญในการจับกับโมเลกุลของสี Coomassie Brilliant Blue ซึ่งมีประจุลบ แต่เนื่องด้วย Coomassie Brilliant Blue มีราคาสูง

โครงงานพิเศษนี้จึงได้จัดขึ้นเพื่อหาสารสีจากพืชธรรมชาติมาทดแทน โดยพืชธรรมชาติที่เลือกมาเป็นพืชที่ให้สีสันต่างๆ และเมื่อไปสัมผัสก็มีสีติดที่มือ และมีโครงสร้างที่คล้ายกับ Coomassie Brilliant Blue จึงทำให้มั่นใจได้ว่าสามารถที่จะติดกับโปรตีนได้เช่นเดียวกัน รวมถึงงานวิจัยของ JayaPrada Rao Chunduri และ Harsha Mota (2015) ศึกษาที่ประเทศอินเดีย ทำการทดลองเกี่ยวกับการพัฒนาสีย้อมโปรตีนใหม่โดยใช้วัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ชา, กาแฟ, เฮนนา และบีทรูท งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้วัสดุธรรมชาติสามารถที่จะย้อมสีโปรตีนได้ เพราะฉะนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงเลือกใช้พืชธรรมชาติอันได้แก่ ลูกหม่อน, ผงขมิ้นสำเร็จรูป, ขมิ้นสด, ทับทิม, บีทรูท,ข้าวโพดม่วง, อัญชัน และเปลือกมังคุด ซึ่งล้วนเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย ราคาถูก และมีสีที่เห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้เพื่อให้การย้อมสีโปรตีนมีประสิทธิภาพมากขึ้นจะทำการศึกษาสภาวะต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการย้อมสีโปรตีนอีกด้วย ดังนั้นหากเราสามารถพัฒนาสีย้อมจากวัสดุธรรมชาติให้นำมาใช้ได้จริงก็จะเป็นประโยชน์ในการประหยัดค่าใช้จ่าย ลดการใช้สารเคมี และสามารถทำการค้าได้อีกในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อผลิตสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติ
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย้อมติดสีของโปรตีน
3. เพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือและเครื่องถ่ายภาพเจล

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือ ลูกหม่อน, ผงขมิ้นสำเร็จรูป, ขมิ้นสด, อัญชัน, ข้าวโพดม่วง, บีทรูท, ทับทิม และเปลือกมังคุด
2. การศึกษาครั้งนี้ มุ่งศึกษาเฉพาะการติดสีย้อมของโปรตีนภายใต้อิทธิพลต่างๆ คือ เวลาในการย้อม, ความเข้มข้นของน้ำย้อม, น้ำที่ใช้ล้างและปริมาณโปรตีน
3. การบันทึกผลจะเปรียบเทียบระหว่างการใช้โทรศัพท์มือถือและเครื่องถ่ายภาพเจล
4. ระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2561 – เดือนเมษายน 2562

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้เรียนรู้วิธีการย้อมสีโปรตีน การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน
1.4.2 ได้เรียนรู้การแยกสีออกจากพืชธรรมชาติ
1.4.3 ได้เรียนรู้สภาวะต่างๆที่ทำให้การย้อมสีโปรตีนมีประสิทธิภาพสูงที่สุด
1.4.4 ได้เรียนรู้วิธีการทำให้ได้ภาพเจลที่ชัดเจน ง่ายต่อการสังเกต
1.4.5 ได้สีย้อมโปรตีนจากพืชธรรมชาติเพื่อทดแทนสีสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการย้อมโปรตีนโดยใช้สีย้อมจากวัสดุธรรมชาติ ซึ่งกลุ่มผู้ศึกษาได้ค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

2.1 โปรตีน

2.1.1 หน่วยย่อยของโปรตีน

2.1.2 โครงสร้างของโปรตีน

2.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

2.3 สีย้อมโปรตีน

2.3.1 Coomassie Brilliant Blue

2.3.2 Silver nitrate

2.3.3 Sypro-Ruby

2.3.4 Deep Purple

2.4 สีย้อมธรรมชาติและการย้อมติดสีโปรตีน

2.4.1 ขมิ้น

2.4.2 ลูกหม่อน

2.4.3 บีทรูท

2.4.4 ทับทิม

2.4.5 อัญชัน

2.4.6 ข้าวโพดม่วง

2.4.7 เปลือกมังคุด

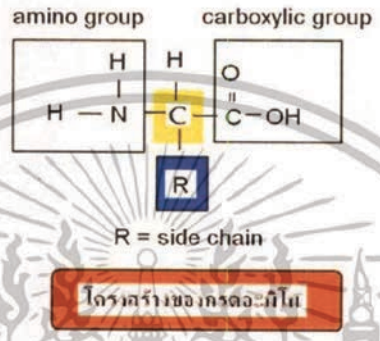
2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1 โปรตีน

2.1.1 หน่วยย่อยของโปรตีน

หน่วยย่อยของโปรตีน คือ กรดแอมิโน (Amino acid) เป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของโปรตีน (protein) โครงสร้างโมเลกุลของกรดแอมิโน ประกอบด้วยหมู่แอมิโน (amino group, NH2) หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group, COOH) และ หมู่ - R (side chain) กรดแอมิโนส่วนใหญ่ได้จากการไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) โปรตีนอย่างสมบูรณ์ มีทั้งหมด 20 ชนิด

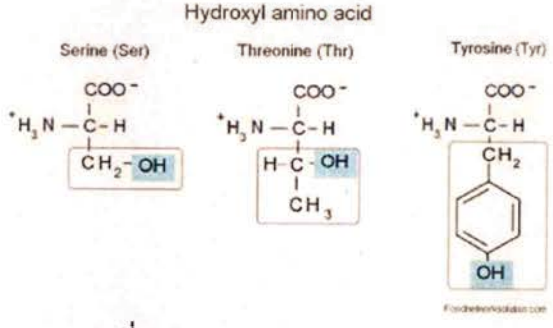


รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดอะมิโน
(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/krd-xa-mi-no)

กรดแอมิโนแต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่ หมู่ R มีผลให้สมบัติของกรดแอมิโน เช่น การชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำแตกต่างกัน โดยหมู่ R ของกรดแอมิโนแบ่งออกได้เป็นกลุ่มต่างๆ ได้ดังนี้

1. หมู่ R ที่โมเลกุล มีขั้วและไม่มีประจุ (polar, uncharged) จะเป็นกรดแอมิโนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ เช่น

- Hydroxyl amino acid กรดแอมิโนที่มี หมู่ R มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, OH) ได้แก่ Serine, Threonine และ Tyrosine



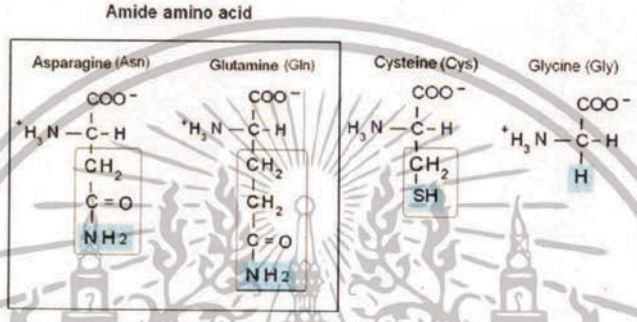
รูปที่ 2.2 Hydroxyl amino acid
(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/krd-xa-mi-no)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Amide amino acid หมู่ R มีหมู่เอไมด์ (amide group, -CO-NH2) ได้แก่ Asparagine และ Glutamine (Asparagine ถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายในสภาวะที่เป็นกรดได้เป็นกรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) ส่วน glutamine ถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายในสภาวะที่เป็นด่างได้เป็นกรดกลูตามิก (glutamic acid)

- Thiol amino acid หมู่ R มีหมู่ไทออล (thiol group, -SH) ได้แก่ ซิสเตอีน (Cysteine)

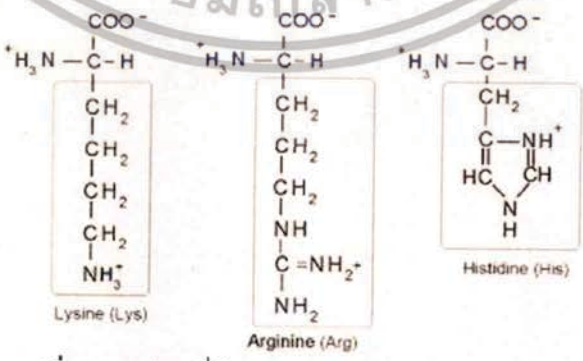
- กรดแอมิโน Glycine มีหมู่ R เป็นไฮโดรเจน เป็นกรดแอมิโนที่มีขนาดเล็กและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุด (ไกลซีนไม่มีขั้วแต่ชอบน้ำ มักจัดรวมอยู่ในกลุ่มแอมิโนที่ชอบน้ำ)



รูปที่ 2.3 Amide amino acid, Cysteine และ Glycine
(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/krd-xa-mi-no)

2. หมู่ R มีประจุมีทั้งที่เป็นประจุบวกและประจุลบ เป็นกรดแอมิโนที่ชอบน้ำมาก (highly hydrophilic)

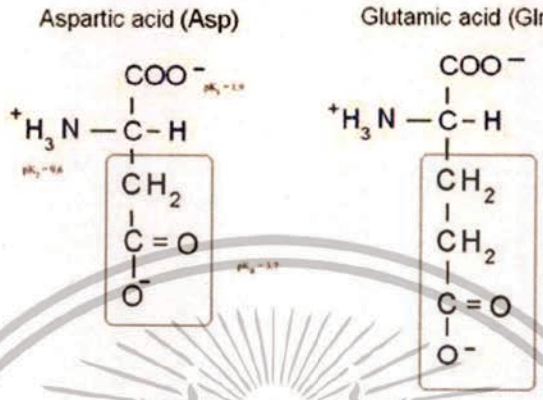
2.1 หมู่ R ที่มีประจุบวก (positively charge) ซึ่งเป็นกรดแอมิโนที่มีสมบัติเป็นด่างหรือเบส ในหมู่ R มีหมู่ เอมีน (amine) ได้แก่ ไลซีน (Lysine) อาร์จินีน (Arginine) และฮิสทิดีน (Histidine)



รูปที่ 2.4 หมู่ R ที่มีประจุบวก (positively charge)
(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/krd-xa-mi-no)

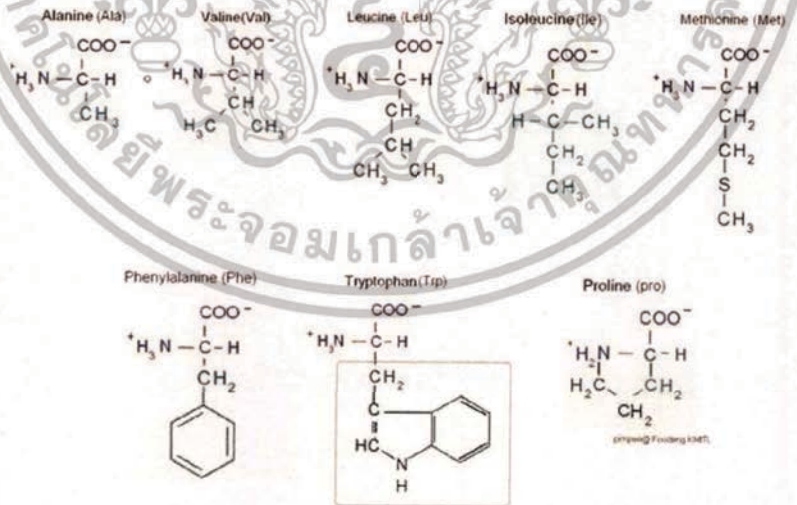
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 หมู่ R ที่มีประจุลบ (negatively charge) ซึ่งเป็นกรดแอมิโนที่มีสมบัติเป็นกรด ที่หมู่ R มีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group,COOH) ได้แก่ กรดแอสพาร์ติก (Aspartic acid) และ กรดกลูตามิก (Glutamic acid)



รูปที่ 2.5 หมู่ R ที่มีประจุลบ (negatively charge)
(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/krd-xa-mi-no)

3. หมู่ R เป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) จะเป็นกรดแอมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เช่น แอลานีน (Alanine) วาลีน (Valine) ลูซีน (Leucine) ไอโซลูซีน (Isoleucine) ฟีนิลแอลานีน (Phenylalanine) เมไทโอนีน (Methionine) ทริพโตแฟน (Tryptophan) และ โพรลีน (Proline)

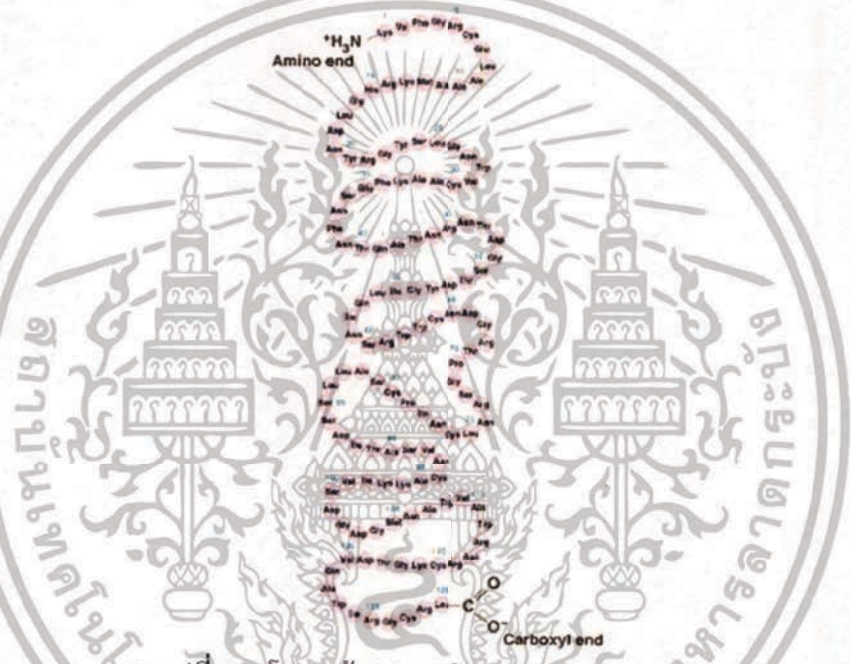


รูปที่ 2.6 หมู่ R เป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (nonpolar)
(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/krd-xa-mi-no)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 โครงสร้างของโปรตีน

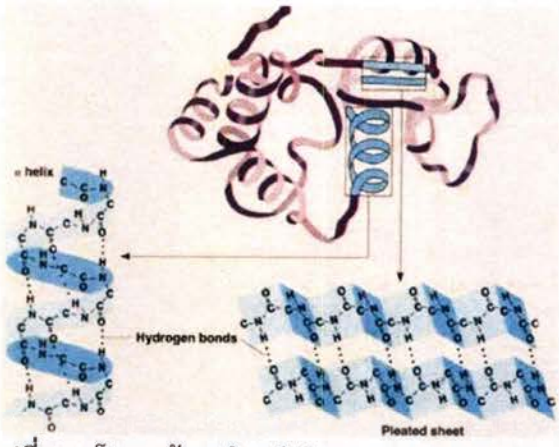
1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary sturcture) เป็นโครงสร้างหลักพื้นฐานของโปรตีน เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโน (amino acid) เป็นสายยาว ระหว่างกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide) เกิดเป็นโพลีเปปไทด์ โดยมีปลายด้านหนึ่งของสาย เป็นปลายอะมิโน (amino end) และปลายอีกด้านหนึ่งเป็น ปลายคาร์บอกซิล (carboxyl end) ชนิด และ การเรียงลำดับของ กรดอะมิโนในสายของโพลีเปปไทด์มีความเฉพาะเจาะจง ทำให้เกิดเป็นโปรตีนชนิดต่างๆมากมาย การย่อยสลายโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีนทำให้ได้กรดอะมิโน (amino acid) และโปรตีนสายสั้น เช่น dipeptide แต่ความร้อนระดับการหุงต้ม ไม่สามารถทำลายโครงสร้างปฐมภูมิได้



รูปที่ 2.7 โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure)
(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/khorngsrang-khxng-portin)

2. โครงสร้างลำดับที่สอง หรือ โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เป็นโครงสร้างที่เกิดจากกรดอะมิโน (amino acid) ที่อยู่ภายในสายโพลีเปปไทด์เดียวกัน ทำปฏิกิริยากันด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดขึ้นในตำแหน่งที่เว้นระยะห่างสม่ำเสมอทำให้เกิดโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่ มี 2 รูปแบบหลักคือ แบบเกลียวอัลฟา (alpha helix) ซึ่งมีลักษณะเป็นเป็นเกลียวขดคล้ายสปริงเกลียวแอลฟาเป็นโครงสร้างพื้นฐานทั้งในโปรตีนเส้นใย (fibrous protein) และในโปรตีนก้อนกลม (globular protein) แบบ beta sheets หรือ pleated sheet ซึ่งเป็นแผ่นพับซ้อนกันไปมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

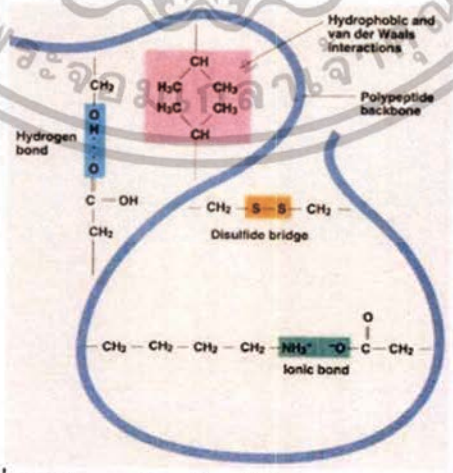


รูปที่ 2.8 โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)

(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/khorngsrang-khxng-portin)

3. โครงสร้างลำดับที่สาม (tertiary structure) เป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นหลัง เกิดโครงสร้างลำดับสองแล้ว เป็นโครงสร้างที่เกิดเนื่องจาก พันธะต่างๆ ระหว่าง หมู่ R (side chain) ต่างๆของกรดอะมิโนสายของเดียวกัน เช่น

- พันธะอิออนิคเกิดระหว่างหมู่ R ของกรดอะมิโนที่มีประจุบวกและประจุลบ
- พันธะไฮโดรเจน
- พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) เป็นพันธะโควาเลนท์ที่เกิดจากหมู่ไธออล (thiol group) ของ กรดอะมิโน ซีสเทอีน (cysteine) 2 โมเลกุล
- แรงดึงดูดระหว่างหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ และแรงวัลเดอร์วาล (hydrophobic and Van der Waals interaction) ทำให้โพลีเปปไตน์พับไปมา มีรูปร่างเปลี่ยนไป ตามชนิด และแรงดึงดูดของพันธะ

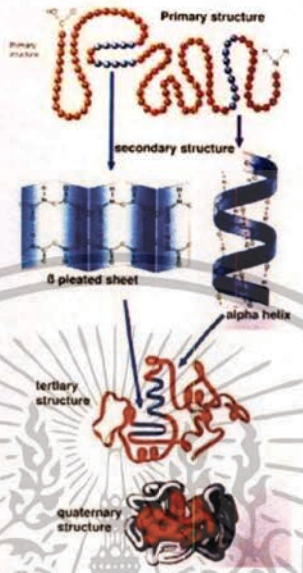


รูปที่ 2.9 โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure)

(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/khorngsrang-khxng-portin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. โครงสร้างลำดับ 4 (quaternary structure) เกิดจากการรวมกันของสายโพลีเปปไทด์มากกว่า 1 สาย ด้วยแรงดึงดูดอย่างอ่อน ระหว่างหมู่ R ระหว่างสายโพลีเปปไทด์ที่ยังไม่เกิดพันธะ ซึ่งอยู่บริเวณผิวนอกของโครงสร้างโครงสร้างลำดับ 4 นี้พบในเอนไซม์ (enzyme)



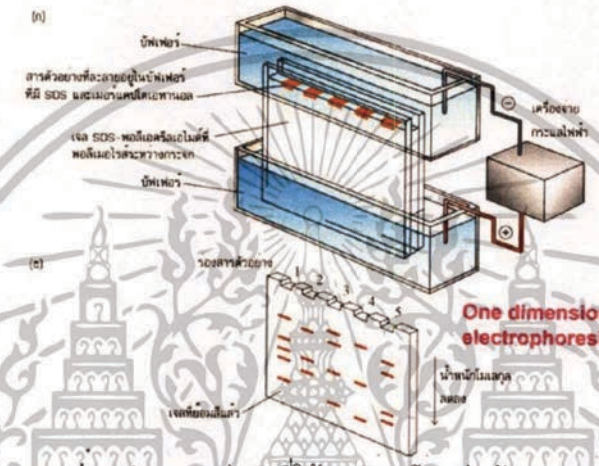
รูปที่ 2.10 โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure)
(https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/khorngsrang-khxng-portin)

2.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

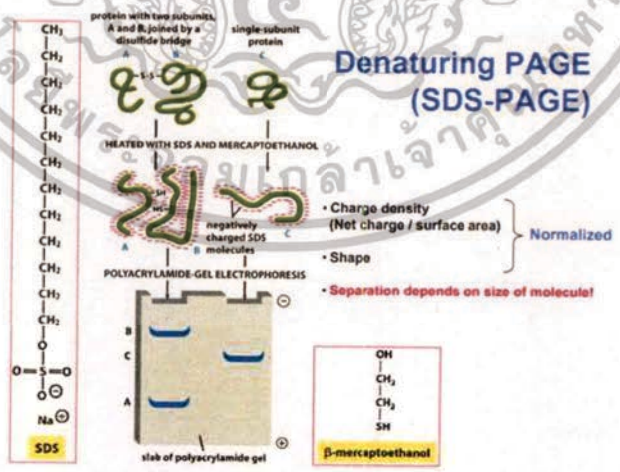
เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยโปรตีนจะมีการเคลื่อนที่บนแผ่นเจลที่เป็น cross-linked polymer ซึ่งเกิดจากการสร้างโพลีเมอร์ระหว่าง Acrylamide และ N,N'-methylene-bis-acrylamide โดยมี Ammonium persulfate (APS) และ N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) เป็นสารเริ่มปฏิกิริยาและสารช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างโพลิเมอร์ ตามลำดับ เทคนิค SDS-PAGE มีหลักการพื้นฐานที่สำคัญคือ การเตรียมโปรตีนตัวอย่างให้อยู่ในโครงสร้างที่เสียสภาพธรรมชาติ (denatured form) และทำให้เป็นโมเลกุลโปรตีนที่มีประจุไฟฟ้า โดยเมื่อมีการให้สนามไฟฟ้า โปรตีนที่มีประจุจะมีการเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงกันข้ามด้วยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ ซึ่งอัตราเร็วจะขึ้นอยู่กับประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่าง รูปร่าง ขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างนั้นๆ และกระแสไฟฟ้า ดังนั้นโปรตีนตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จะถูกทำให้อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นด่างในสภาวะที่มีสารชนิดหนึ่งคือ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ซึ่งเป็นสารชะล้างที่มีประจุลบ (-) (anionic detergent) เมื่อโปรตีนถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน ความร้อนจะมีผลทำให้โครงสร้างของโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงจากโครงสร้างที่มีการม้วนขด (folding) เป็นโครงสร้างที่มี

เอกสารนี้ใช้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคลายตัวและเป็นเส้นตรง โดยมีสาร Dithiothreitol (DTT) เช่น 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) ซึ่งเป็น reducing agent ช่วยในการทำลายพันธะ disulfide bond (S-S) ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และเติมหมู่ –SH เพื่อป้องกันไม่ให้กรดอะมิโนซิสเทอีนกลับมาสร้างพันธะระหว่างกันได้อีก ส่งผลให้โปรตีนคงอยู่ในโครงสร้างที่เป็นเส้นตรง นอกจากนี้โมเลกุล SDS ซึ่งมีประจุลบ จะเข้ากับกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีน ทำให้อัตราส่วนระหว่างขนาดและประจุ (mass/charge ratio) ของโปรตีนมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนแต่ละโมเลกุลบนสนามไฟฟ้าจึงขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างขนาดและประจุโดยตรง



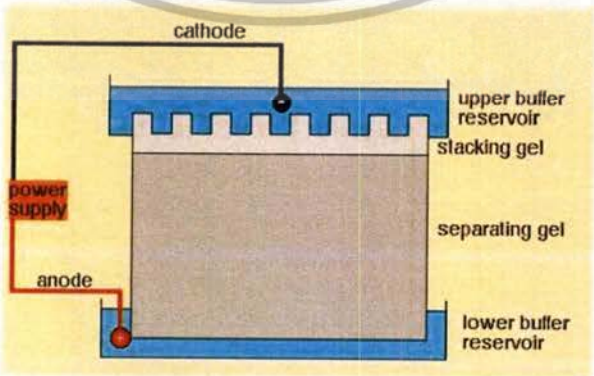
รูปที่ 2.11 ส่วนประกอบต่างๆที่ใช้การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (http://biochem.md.chula.ac.th/Data/PDF%20files/Basic%20Biochemical%20Techniques%20in%20Cell%20Biology-2012.pdf)



รูปที่ 2.12 แผนภาพการเสียสภาพของโปรตีนในเทคนิค SDS-PAGE (http://biochem.md.chula.ac.th/Data/PDF%20files/Basic%20Biochemical%20Techniques%20in%20Cell%20Biology-2012.pdf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

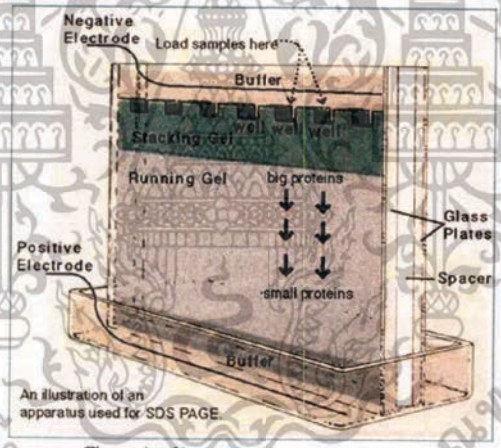
การใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยทั่วไปมักทำในระบบที่มีลักษณะเป็น “discontinuous buffer system” ซึ่งหมายถึงความไม่สม่ำเสมอกันของ pH และ ionic strength ของระบบบัฟเฟอร์สำหรับเตรียมตัวอย่างโปรตีน (sample buffer) บัฟเฟอร์สำหรับเตรียมเจลโพลิอะคริลาไมด์สำหรับใช้ในเทคนิค SDS-PAGE โดยทั่วไปจะประกอบด้วยเจล 2 ส่วนที่มีค่า pH แตกต่างกัน คือ stacking gel และ separating gel ซึ่งมีสารละลาย Tris-Cl เป็นองค์ประกอบ ที่มีค่า pH ของสารละลายเท่ากับ 6.8 และ 8.8 ตามลำดับ โดยบัฟเฟอร์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างโปรตีนจะมีสารละลาย Tris-Cl เป็นองค์ประกอบเช่นกัน และมีค่า pH เท่ากับ 6.8 เช่นเดียวกับเจลในส่วน separating gel ในขณะที่บัฟเฟอร์สำหรับใช้ในระบบการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนจะมีสารละลาย Tris-glycine เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีค่า pH ของสารละลายเท่ากับ 8.3 โดยเมื่อมีการให้สนามไฟฟ้า ไอออนของโมเลกุลคลอไรด์ในบัฟเฟอร์สำหรับตัวอย่างโปรตีนและที่เป็นองค์ประกอบของเจลในส่วน stacking gel จะเริ่มมีการจัดเรียงขอบเขตของการเคลื่อนที่จากส่วนบนสุด (leading edges) ในขณะที่บริเวณขอบเขตส่วนล่าง (trailing edges) จะประกอบไปด้วยโมเลกุลของไกลซีน (glycine) การเกิดขอบเขตของการเคลื่อนที่ดังกล่าวจะทำให้เกิดบริเวณที่มีต้านทานกระแสไฟฟ้าสูงซึ่งจะส่งผลให้พื้นที่บริเวณนั้นมีระดับแรงดันไฟฟ้าที่สูงขึ้น ปรากฏการณ์ดังกล่าวมีผลทำให้โมเลกุลของโปรตีนถูกพาไปยังบริเวณผิวหน้าของ separating gel เกิดเป็นชั้นของโมเลกุลโปรตีนที่ทับซ้อนกัน (stack) หลังจากนั้นบริเวณพื้นที่ของ separating gel ซึ่งเป็นบริเวณที่มีค่า pH สูง จะสนับสนุนให้มีการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเป็นไอออนของโมเลกุลไกลซีน ไอออนของโมเลกุลไกลซีนที่เกิดขึ้นดังกล่าวรวมทั้งไอออนของคลอไรด์จะมีการเคลื่อนที่ผ่านชั้นของโมเลกุลโปรตีนและผ่านไปยังบริเวณของ separating gel จากนั้นโมเลกุลของโปรตีนแต่ละโมเลกุลจะเคลื่อนผ่านโครงสร้างตาข่ายที่เกิดจากการสร้างโพลิเมอร์ระหว่างระหว่าง Acrylamide และ N,N’-methylene-bis-acrylamide ในบริเวณ separating gel โดยอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนแต่ละโมเลกุลจะขึ้นอยู่กับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งจะทำให้สามารถวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการได้



รูปที่ 2.13 เจลในส่วน stacking gel และ separating gel ในเทคนิค SDS-PAGE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
(http://thesis.swu.ac.th/swuthesis/Chem(M.S.)/Pinpinat_M.pdf)

วิธีการทำ SDS-PAGE มีความแตกต่างกันบ้างในแต่ละวิธี เช่น วิธีของ Weber และ Osborne เป็นแบบ continuous polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ phosphate buffer ส่วนวิธีของ Laemmmli ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากและทำในรูปของ slab gel เป็นแบบ discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ 0.5 M Tris-HCl, pH6.8 สำหรับ concentrate stacking gel buffer, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 สำหรับ concentrated resolving gel buffer หรือ concentrated separating gel buffer และ 0.025 M Tris, 0.192 M Glycine, 0.1% w/v SDS, pH8.3 สำหรับ electrode buffer วิธีของ discontinuous gel electrophoresis เป็นวิธีที่ gel buffer และ electrode buffer จะเกิดการรวมตัวกันและช่วยในการทำให้ตัวอย่างที่แยกในระหว่างการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้ารวมตัวอัดแน่นและเข้มข้น นอกจากนี้ stacking gel ที่ %T ต่ำจะช่วยในการรวมตัวอัดแน่นกันของตัวอย่าง ส่วน separating gel สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงค่า %T ตามความต้องการขึ้นอยู่กับการแยกขนาดของโปรตีน และยังสามารถใช้แบบ gradient ได้จาก %T ต่ำ (ด้านบน) ไปสู่ %T สูง (ด้านล่าง) ของเจลได้ เพื่อให้การแยกตัวอย่างที่มีความแตกต่างของขนาดได้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 2.14 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แบบ discontinuous gel (https://www.gibthai.com/service/note_detail/20)

ภายหลังจากการวิเคราะห์ตัวอย่างโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แบบ discontinuous gel ตรวจสอบผลการวิเคราะห์โดยการนำแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ไปทำการย้อมด้วยสีที่มีคุณสมบัติในการจับโมเลกุลของโปรตีน ตัวอย่างเช่น Coomassie Brilliant Blue stain (CBB) และ Silver stain เป็นต้น สีย้อมดังกล่าวมีความสามารถในการจับกับโปรตีนโดยจะไม่เกิดปฏิกิริยากับแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ ซึ่งจะทำให้สามารถมองเห็นแถบของโปรตีนบนแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ได้ โดยสามารถวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่ต้องการได้โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (molecular marker) ซึ่งทราบขนาดที่แน่นอนแล้ว อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE อาจไม่สามารถใช้ได้กับโปรตีนบางชนิด เช่น โปรตีนที่มีการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้าง (protein modification) เพื่อการทำหน้าที่ที่จำเพาะ ตัวอย่างเช่น โปรตีนที่มีการเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต (N-linked glycosylation หรือ linked glycosylation) ซึ่งจะมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ทำให้น้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนดังกล่าวไม่ใช่น้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริง

ในส่วนของการบันทึกภาพถ่ายแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์สามารถบันทึกโดยใช้กล้องโทรศัพท์มือถือหรือเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้บันทึกภาพและตำแหน่งของ DNA, RNA และ single stand protein จากการทำ blot หรือ gel electrophoresis แถบของ DNA ที่แยกได้นี้ต้องติดฉลากด้วยสีย้อม โดยจะเป็นสารประกอบฟลูออเรสเซนส์ที่เรืองแสงซึ่งสามารถดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลตหรือแสงในช่วงที่มองเห็น เพื่อสังเกตการปรากฏของแถบของ DNA ที่แยกได้บนแผ่นเจล และสามารถควบคุมการทำงาน การประมวลผลผ่านคอมพิวเตอร์โดยตรง

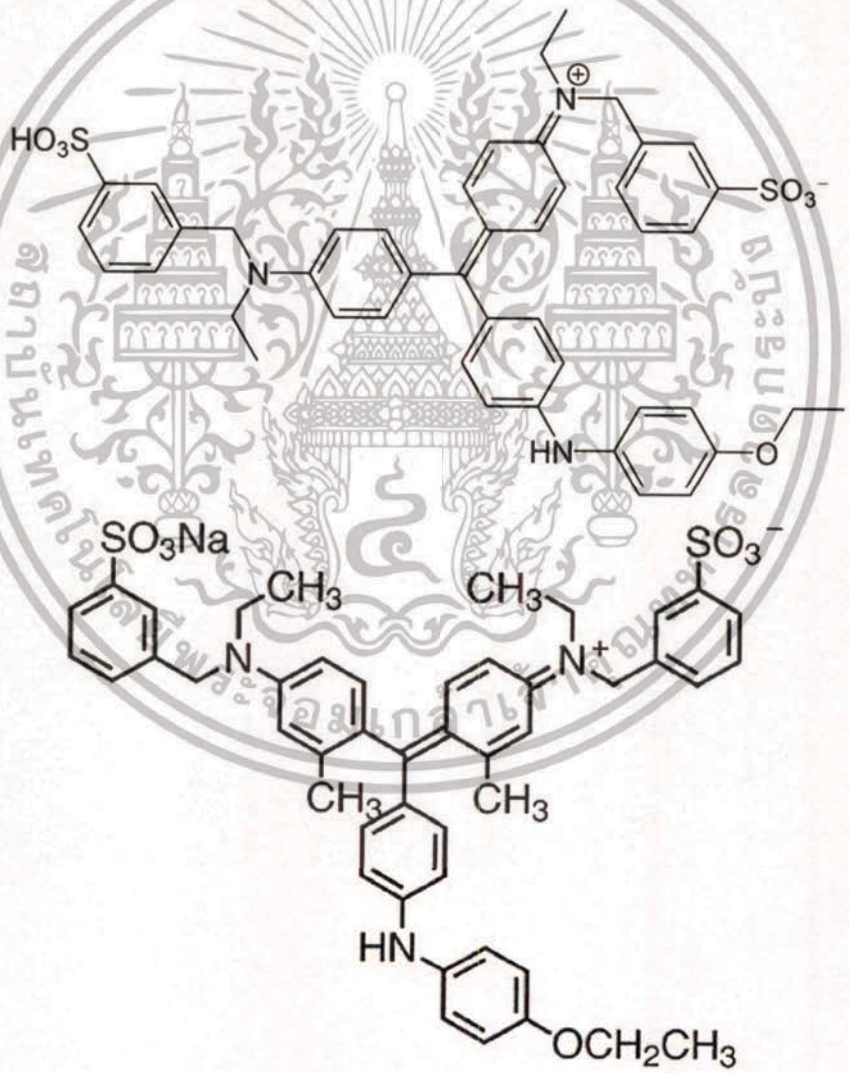
รูปที่ 2.15 เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation)
(http://www.bio-rad.com/en-us/product/gel-doc-ez-gel-documentation-system?ID=O4950KKG4&source_wt=geldocez_surl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สีย้อมโปรตีน

2.3.1 Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Brilliant Blue เป็นสีย้อมที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (visible dyes) ซึ่งมีอยู่ 2 รูปแบบคือ Coomassie Brilliant Blue R-250 และ G-250 ซึ่งรูปแบบ R หมายถึงสีค่อนข้างแดง ส่วนรูปแบบ G หมายถึงสีค่อนข้างเขียว ตัวเลข 250 หมายถึงตัวเลขของอินดิเคเตอร์ลำดับที่ 250 สำหรับความเข้มของสีย้อม โดยทั่วไป R-250 ใช้ในงานเทคนิค SDS-PAGE และ G-250 ใช้ในงานวัดความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง (Bradford assay) ซึ่งจะให้ผลการย้อมที่ชัดเจนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ R-250 แต่ทั้งนี้การเลือกรูปแบบใดขึ้นอยู่กับงานที่ศึกษา โครงสร้างทางเคมีของ Coomassie Brilliant Blue R-250 และ G-250 แสดงดังรูป



รูปที่ 2.16 โครงสร้างทางเคมีของ Coomassie Brilliant Blue R-250 (บน) และ G-250 (ล่าง)
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445784/pdf/materials-03-04784.pdf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Coomassie Brilliant Blue R และ G ใช้กับโปรตีนที่แตกต่างกัน กลไกการจับกันระหว่างสีย้อมกับโปรตีนไม่ได้เขียนไว้อย่างชัดเจน แต่คาดการณ์ได้ว่าประจุของสีย้อมเป็นประจุลบและไม่มีขั้ว โดยทั่วไปสีย้อมจะจับกับอาร์จินีนมากกว่ากลุ่มกรดอะมิโนเบื้องต้น เช่นกรดอะมิโนพื้นฐาน (ฮิสทิดีน, ไลซีน) และกรดอะมิโนที่มีหมู่อะโรมาติก (ไทโรซีน, ไทมีน, ฟีนิลอะลานีน) การจับกันระหว่างสีย้อมกับกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีนจะยึดกันด้วยแรงแวนเดอร์วาลว์และแรงระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ เป็นต้น (Diezel, 1972)

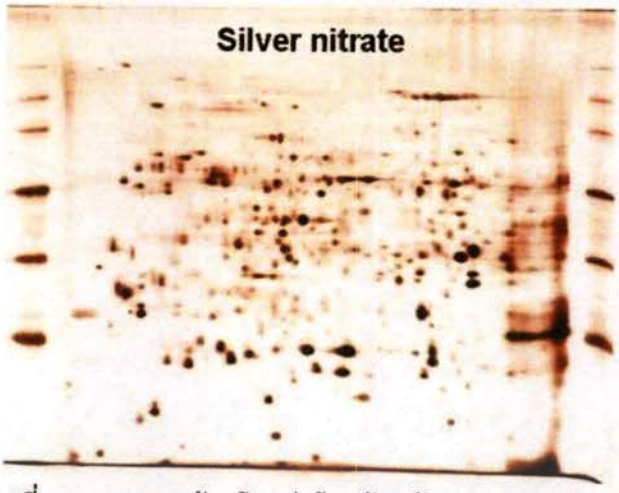
Coomassie Brilliant Blue เป็นสีย้อมที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีนในระดับที่ใหญ่ สามารถจำแนกชนิดโปรตีนได้ดีโดยไม่คำนึงถึงลักษณะทางชีวเคมี แต่มีความว่องไวในการติดโปรตีนต่ำ และงานวิจัยของ Githin J. Mathew และคณะ (2008) ได้ให้ข้อมูลว่าสีย้อมนี้เป็นอันตรายและอาจจะก่อให้เกิดอาการแพ้ได้

รูปที่ 2.17 ผลการย้อมโปรตีนโดยย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445784/pdf/materials-03-04784.pdf)

2.3.2 Silver nitrate

Silver nitrate เป็นสีย้อมที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (visible dyes) อยู่กลุ่มเดียวกับ Coomassie Brilliant Blue ใช้ในวิธีย้อมซิลเวอร์ (Silver staining) เพื่อให้เห็นภาพโปรตีนในเจล การย้อมเจลด้วย Silver nitrate มีประโยชน์ในการทำเทคนิควิเคราะห์สัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ของอนุภาคที่มีประจุ ซึ่งใช้เพื่อระบุมวลของอนุภาค ส่วนประกอบของธาตุในสารประกอบตัวอย่างหรือในโมเลกุล และเพื่อแสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล เช่น เพปไทด์ และสารประกอบทางเคมีอื่นๆ (Mass spectrometry หรือ MS) ได้ผลอย่างรวดเร็วและค่าใช้จ่ายในการย้อมต่ำ แต่ในเรื่องการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนภาพที่ได้ไม่ค่อยเที่ยงตรงมากนัก ในการเลือกโปรตีนมาย้อมด้วย Silver nitrate พิจารณาจาก peptide mass fingerprint แต่ต้องไม่ใช้ปริมาณโปรตีนที่แบ่งจากสองไปเป็นสี่ส่วนเพราะคุณสมบัติจะลดลง (Rabilloud, 1992)

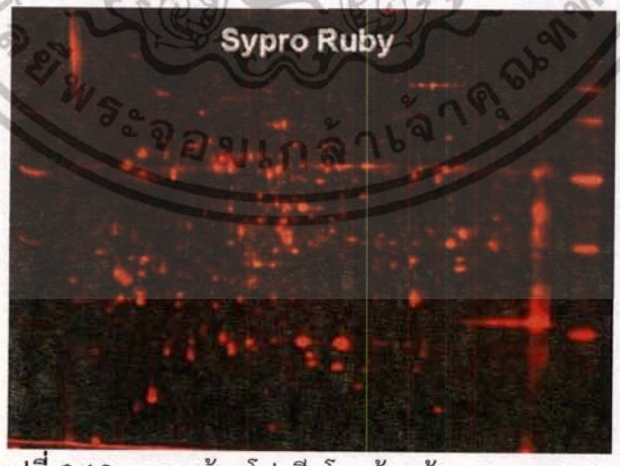
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.18 ผลการย้อมโปรตีนโดยย้อมด้วย Silver nitrate
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445784/pdf/materials-03-04784.pdf)

2.3.3 Sypro-Ruby

Sypro-Ruby เป็นสีย้อมเรืองแสง (fluorescent dyes) มีคุณสมบัติที่ดีกว่าสีย้อมทั่วไป เช่น Coomassie Brilliant Blue คือเป็นสีที่ได้จากการรวมกันระหว่างลูมิเนสเซนส์และรูทีเนียมจับกับโปรตีนด้วยพันธะนอนโควาเลนต์ ซึ่งมีกลไกในการจับกับโปรตีนคล้ายกับกลไกการจับกับโปรตีนของ Coomassie Brilliant Blue การระบุชนิดโปรตีนขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีน มีความว่องไวในการย้อมติดโปรตีนสูงกว่า Silver nitrate ซึ่งเหมาะกับการวิเคราะห์โปรตีนในระดับที่ใหญ่ ซึ่งการย้อมด้วย Sypro-Ruby มีข้อจำกัดคือ จำเป็นต้องมี fluorescent scanner มีค่าใช้จ่ายสูง (Berggren, K.N., 2002)



รูปที่ 2.19 ผลการย้อมโปรตีนโดยย้อมด้วย Sypro-Ruby
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445784/pdf/materials-03-04784.pdf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 Deep Purple

Deep Purple เป็นสีย้อมเรืองแสง (fluorescent dyes) อยู่กลุ่มเดียวกับ Sypro-Ruby เป็นสีย้อมที่มีส่วนประกอบมาจากธรรมชาติคือ เป็นสีย้อมที่สกัดมาจากเชื้อรา *Epicoccum nigrum* ซึ่งสารประกอบพอลิคีไทด์ เป็นกลุ่มของสารประกอบเคมีที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติทำหน้าที่จับกับโปรตีนบริเวณปลาย lysyl ในกระบวนการปลดปล่อยแสง (fluorescent emission) มีความว่องไวในการติดโปรตีนสูงกว่า Sypro-Ruby และให้ผลดีกว่าสีย้อมอื่นๆ เหมาะกับการย้อมเจลแบบ Two-dimensional electrophoresis (2-DE) ในการวิเคราะห์ Mass spectrometry ของโปรตีน (Shaw, J., 2003)

รูปที่ 2.20 ผลการย้อมโปรตีนโดยย้อมด้วย Deep Purple
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5445784/pdf/materials-03-04784.pdf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สีย้อมธรรมชาติและการย้อมติดสีโปรตีน

2.4.1 ขมิ้น

รูปที่ 2.21 ขมิ้น

(https://nouvelleresearch.com/index.php/articles/6261-understanding-curcumin-and-impact-for-your-horse)

ขมิ้น (turmeric) หรือขมิ้นชัน ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma longa L.* (Curcuma domestica Valeton) เป็นพืชวงศ์ขิงที่ใช้เพื่อเป็นทั้งเครื่องเทศและพืชสมุนไพรที่คนไทยรู้จักกันมาแต่โบราณ จัดเป็นพืชล้มลุกที่อยู่ในวงศ์ขิงข่า มีอายุหลายปี ลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นที่เกิดจากการอัดตัวกันของกาบใบ ลำต้นจริงอยู่ใต้ดิน เรียกว่า เหง้าขมิ้น ประกอบด้วย เหง้าหลักใต้ดินที่เรียกว่า หัวแม่ ซึ่งมีรูปไข่และแตกแขนงทรงกระบอกออกด้านข้างทั้ง 2 ด้าน เรียกว่า แง่ง เนื้อในเหง้ามีสีเหลือง มีกลิ่นเฉพาะ ส่วนที่ใช้บริโภคคือลำต้นใต้ดินที่ใช้สะสมอาหาร ขมิ้นมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักทางเคมีคือ curcumin มีสีเหลือง ส้ม (orange-yellow)

การใช้ประโยชน์หลากหลาย เช่น ใช้รับประทานสด เป็นส่วนผสมของเครื่องแกง (curry) โดยนำมาใช้แต่งสี แต่งกลิ่น และรสของอาหาร เช่น แกงเหลือง แกงไตปลา ขมิ้นอาจนำมาแปรรูปด้วยการทำแห้ง (dehydration) แล้วบดเป็นผง ใช้เป็นเครื่องเทศ (spice) และใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) เพื่อเป็นสารให้สี (coloring agent) และวัตถุปรุงแต่งรสอาหาร (flavoring agent) ที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งให้ความปลอดภัยมากกว่าสีสังเคราะห์เป็นวัตถุดิบเพื่อการสกัด (extraction) เป็น curcumin, oleoresin สารสำคัญที่พบในรากและเหง้ามีน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ได้แก่ ทูมีโรน (tumerone), zingerene bissboline, zingiberence, (+) - sabinene, alpha-phellandrene, curcumone, สารประกอบเคอร์คูมิน (curcumin) มีสมบัติเป็นสารแอนติออซิแดนต์ หรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) สรรพคุณใช้เป็นยาภายใน คือแก้ท้องอืด แก้ท้องร่วง แก้โรคกระเพาะอาหาร ขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการขับลม ผลจากน้ำมันหอมระเหย มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร บรรเทาอาการปวดท้อง ท้องอืด แน่นจุดเสียดโดยกระตุ้นการหลั่ง mucin มาเคลือบกระเพาะอาหาร และยับยั้งการหลั่งน้ำย่อยชนิดต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการลดการอักเสบ โดยสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

curcumin ที่มีสมบัติเป็นสารแอนติออซิแดนต์ (antioxidant) (Cousin *et.al.*, 2007) ขมิ้นชันจะไปออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ในการลดการบีบตัวของลำไส้ ฤทธิ์ในการคลายกล้ามเนื้อเรียบโดยออกฤทธิ์ต้าน acetylcholin, barium chloride และ serotonin ซึ่งช่วยบรรเทาอาการปวดเกร็งในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร ส่วนที่เป็นยาภายนอก ได้แก่ ทาแก้ผื่นคัน โรคผิวหนังพุพอง ยารักษาซันนะตุ และหนังศีรษะเป็นเม็ดผื่นคัน เหง้าของขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย คือจะไปยับยั้งสาเหตุการเกิดกรดเนื่องจาก *Lactobacillu acidophilus* และ *L. planturum* ฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา สามารถยับยั้งสาเหตุการเกิดโรคกลากเกลื้อน และมีฤทธิ์ในการขับน้ำดี โดยสาร curcumin และ p-tolylmethylcarbinol สามารถขับน้ำดีและกระตุ้นการสร้างน้ำดี นอกจากนี้ยังสามารถออกฤทธิ์แก้ปวดกระดูก ป้องกันกระดูกผุ แก้ตาลาย อาการหน้ามืด ป้องกันโรคไต เบาหวาน ลดคอเลสเตอรอล และมีฤทธิ์เป็นยานอนหลับ (Anwarul *et.al.*, 2005)

2.4.2 ลูกหม่อน

รูปที่ 2.22 ลูกหม่อน
(https://jiji.ng/alimosho/supplements/mulberry-extract-powder-50g-13288684.html)

มัลเบอร์รี่ (Mulberry) หรือลูกหม่อน (ภาคอีสานเรียกว่า "มอน") มีอยู่ 2 ชนิด คือ หม่อนชนิดที่ปลูกไว้เพื่อรับประทานผลเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีชื่อสามัญว่า Black Mulberry และมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Morus nigra L.* จัดอยู่ในวงศ์ MORACEAE ผลสุกจะเป็นสีดำมีรสเปรี้ยวอมหวาน นิยมนำมารับประทานและนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ส่วนอีกชนิดคือ หม่อนที่ปลูกไว้เพื่อการเลี้ยงไหมเป็นหลัก มีชื่อสามัญว่า White Mulberry และมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Morus alba L.* ชนิดนี้ใบจะมีขนาดใหญ่กว่าและออกใบมากกว่า ใช้เป็นอาหารเลี้ยงไหมได้ดี แต่ผลจะมีขนาดเล็กกว่า เมื่อสุกจะมีรสเปรี้ยว ใช้รับประทานได้เช่นกัน แต่ไม่เป็นที่นิยมเท่าชนิดแรกและยังมีชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดครับ เช่น Red Mulberry ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus rubra L.* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มัลเบอร์รี่มีสาร Anthocyanins ในปริมาณมาก โดยสารชนิดนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์หลายอย่าง เช่น ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ต่อต้านอาการขาดเลือดในสมอง ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีสาร Deoxynojirimycin ที่เป็นตัวช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้, มีกาบา (GABA) ที่เป็นตัวช่วยลดความโลหิต, มีสาร Phytosterol ที่สามารถช่วยลระดับคอเลสเตอรอลได้, มีสาร Polyphenols ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์กับร่างกาย, สารประกอบฟีนอลในมีอยู่ในผลมัลเบอร์รี่ สามารถช่วยต้านอนุมูลอิสระ ต้านอาการอักเสบ อาการเส้นเลือดโป่งพอง และยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสได้, สาร Quercetin และสาร Kaempferol ที่มีอยู่ในผลมัลเบอร์รี่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่สามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ โรคความดันโลหิต ช่วยทำให้หลอดเลือดแข็งแรง เลือดหมุนเวียนดี ป้องกันการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือด ป้องกันการดูดซึมของน้ำตาลในลำไส้เล็ก ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็งเม็ดเลือด มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ ช่วยยืดอายุเม็ดเลือดขาว และลดอาการแพ้ต่าง ๆ, มีวิตามินเอที่ช่วยในด้านการบำรุงสายตา ป้องกันการเกิดต้อกระจก ช่วยบำรุงเหงือกและฟัน บำรุงผิวพรรณ และลดการอักเสบของสิว, มีวิตามินบี6 ในผลมัลเบอร์รี่ มีประโยชน์ในด้านการบำรุงเลือด ตับ และไต ช่วยลดอาการปวดประจำเดือน และลดการเกิดสิว, มีวิตามินซีสูง ที่เป็นตัวช่วยป้องกันหวัด ภูมิแพ้ วัณโรค โรคปอด เชื้อไวรัส และช่วยเสริมสร้างภูมิต้านทานให้แก่ร่างกาย, มีกรดโฟลิกสูง ซึ่งกรดโฟลิกนั้นสามารถช่วยทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเจริญได้เต็มที่ ทำให้เซลล์ประสาทไขสันหลังและเซลล์สมองเจริญเป็นปกติ และช่วยป้องกันโรคโลหิตจาง นอกจากนี้ยังกรดอะมิโน วิตามินและแร่ธาตุอีกหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น วิตามินเอ วิตามินบี แคลเซียม ธาตุเหล็ก โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม สังกะสี เป็นต้น

2.4.3 บีทรูท

รูปที่ 2.23 บีทรูท
(http://sunshinemarket.co.th/wp/index.php/product/organic-beetroot-powder-100g/)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บีทรูท (อ่านว่า บีท-รูท) มีชื่อเรียกอื่นว่า ผักกาดฝรั่ง ผักกาดแดง มีชื่อสามัญ Garden beet, Common beet และชื่อวิทยาศาสตร์ *Beta vulgaris L.* จัดอยู่ในวงศ์บานไม่รู้โรย (Amaranthaceae) เป็นผักเพื่อสุขภาพประจำเมืองหนาวที่ปลูกกันมากทางภาคเหนือ โดยมีต้นกำเนิดในแถบเมดิเตอร์เรเนียน แถบยุโรป โดยมีรากหรือหัวพืชที่สะสมอาหารอยู่ใต้ดิน มีลักษณะทรงกลมป้อม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-5 เซนติเมตร เนื้อด้านในอวบน้ำ มีสีแดงเลือดหมู ม่วงแดง และเหลือง

หัวบีทรูทมีสารสีแดงที่มีชื่อว่า บีทานิน (Betanin) ซึ่งเป็นกรดอะมิโน เป็นตัวช่วยยับยั้งการเกิดโรคมะเร็ง ช่วยลดการเติบโตของเนื้องอกได้ แถมยังทำให้เลือดลมและระบบการไหลเวียนของเลือดทำงานได้ดีมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีสารสีม่วงที่มีชื่อว่า แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดสารก่อมะเร็ง และช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและอัมพาตได้

2.4.4 ทับทิม

รูปที่ 2.24 ทับทิม

(https://www.indiamart.com/proddetail/pomegranate-powder-17249187333.html)

ทับทิม ชื่อสามัญ Pomegranate และชื่อวิทยาศาสตร์ *Punica granatum L.* จัดอยู่ในวงศ์ตะแบก (Lythraceae) เป็นผลไม้ที่มีต้นกำเนิดมาจากประเทศอิหร่านทางตอนใต้ของอัฟกานิสถาน เจริญได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิต่ำและยังเป็นผลไม้มงคลของคนจีนอีกด้วย ทับทิมยังถือว่าเป็นผลไม้เพื่อสุขภาพ โดยประโยชน์ของทับทิมและสรรพคุณของทับทิมนั้นมีมากมาย คือ มีวิตามินซีสูงและยังประกอบด้วยเกลือแร่ต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายจึงช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี และนอกจากนี้ยังมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคได้อีกด้วย อย่างเช่น บรรเทาอาการของโรคหัวใจ รักษาความดันโลหิตสูง ช่วยลดสภาวะการแข็งตัวของเลือด รักษาโรคท้องเดิน โรคบิด เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 อัญชัน

รูปที่ 2.25 อัญชัน

(https://www.etsy.com/listing/542284823/organic-blue-butterfly-pea-flower-powder)

อัญชัน ชื่อสามัญ Butterfly pea, Blue pea และมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Clitoria ternatea L.* จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Fabaceae หรือ Leguminosae) และอยู่ในวงศ์ย่อยถั่ว Faboideae (Papilionieae หรือ Papilionaceae) ซึ่งอัญชันมีชื่อท้องถิ่นอื่นๆว่า แดงชัน (เชียงใหม่), เอื้องชัน (ภาคเหนือ) เป็นต้น เป็นพืชที่มีต้นกำเนิดในแถบอเมริกาใต้ ปลูกทั่วไปในเขตร้อน ลักษณะของดอกอัญชันจะมีสีขาว สีฟ้า สีม่วง ส่วนตรงกลางดอกจะมีสีเหลืองและมีรูปร่างคล้ายหอยเชลล์ มีสารที่ชื่อว่า "แอนโทไซยานิน" (Anthocyanin) ทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต เช่น โลหิตส่วนที่ไปเลี้ยงบริเวณรากผม จะช่วยทำให้ผมดกดำ เงางาม หรือโลหิตส่วนที่ไปเลี้ยงดวงตาจะช่วยบำรุงสายตา นอกจากนั้นโลหิตส่วนที่ไปเลี้ยงบริเวณปลายนิ้วมือจะช่วยแก้อาการเหน็บชาได้ เนื่องจากดอกอัญชันนั้นมีฤทธิ์ในการละลายลิ่มโลหิต ซึ่งผู้มีภาวะโลหิตจางห้ามรับประทานดอกอัญชันและอาหารหรือเครื่องดื่มที่ย้อมสีด้วยอัญชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.6 ข้าวโพดม่วง

รูปที่ 2.26 ข้าวโพดม่วง
(https://ecoandino.com/products/purple-corn/)

ข้าวโพด ชื่อสามัญ Corn, Indian corn, Maize และมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Zea mays Linn.* จัดอยู่ในวงศ์หญ้า (Poaceae หรือ Gramineae) มีชื่อท้องถิ่นอื่นๆ ว่า ข้าวแซ่ (แม่ฮ่องสอน), ข้าวสาลี เข้าสาลี สาลี (ภาคเหนือ), โพด (ภาคใต้), บือเคส่ะ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), เข้าโพด (ไทย), เป๊าก๋อ (ม้ง), แผละลี (ลั้วะ), ข้าวแข่ (เงี้ยว, ฉาน, แม่ฮ่องสอน), เง็กบี้ เง็กจกซู่ (จีน), ยวี่หมี่ ยวี่สู่สู่ (จีนกลาง) เป็นต้น สารสำคัญที่พบ ได้แก่ aconitic acid, aniline, allantoin, astragalin, β glucopyranoside, glucoside, quercetin, squalene, stigmastrol, tocopherol, rhamnetin, vanillin, zeamatin, zeanin, zeanoside A, zeanoside B, zeanoside C เป็นต้น สีม่วงเข้มของเมล็ดข้าวโพดพันธุ์นี้จะมีสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) อยู่มาก สารชนิดนี้ที่มีคุณสมบัติในการช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี ช่วยเสริมความคุ้มกันให้กับร่างกายในการต่อต้านเชื้อโรค เพิ่มการทำงานของเม็ดเลือดแดง ช่วยลดโอกาสของการเกิดโรคมะเร็งชนิดเนื้องอก ชะลอการเกิดไขมันอุดตันในหลอดเลือด ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ ช่วยควบคุมระดับน้ำตาล ชะลอความแก่และความเสื่อมของดวงตา ช่วยสมานแผล เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.7 เปลือกมังคุด

รูปที่ 2.27 มังคุด
(https://www.ebay.com/itm/Pure-Organic-Mangosteen-Pericarp-Powder-Xanthones-for-Immune-system-health-/252980019925)

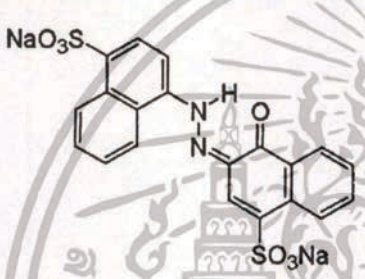
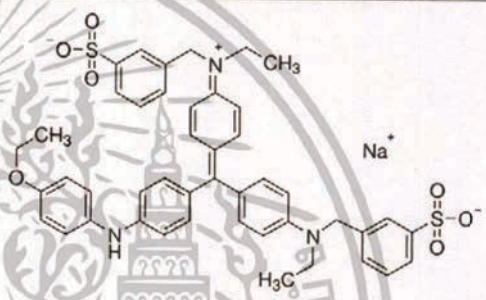
มังคุดมีชื่อสามัญ Mangosteen และชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia mangostana* เป็นไม้ยืนต้น สูง 10-25 เมตร มีใบเดี่ยวรูปไข่ เนื้อใบหนาและเหนียว สีเขียวเข้มเป็นมัน ออกดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกคู่ มีกลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง และกลีบดอกสีแดง ผลมังคุดเป็นทรงกลม มีเปลือกหนาสีม่วงอมแดงห่อหุ้มเมล็ด 6-8 เมล็ดภายในที่มีสีขาวนวล เนื้อนุ่มฉ่ำน้ำ รสหวานอมเปรี้ยว มังคุดเป็นผลไม้ที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ มีสารในกลุ่ม Xanthones ไม่ต่ำกว่า 40 ชนิด โดยเฉพาะบริเวณเปลือกของมังคุด และสารที่มีฤทธิ์มากที่สุดคือ GM-1 สารกลุ่มแซนโทนส์นั้นมีคุณสมบัติ ฆ่าแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ฆ่าเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตามปัจจุบันสาร GM-1 ยังไม่ได้จดทะเบียนเป็นยา ควรศึกษาแพทย์ก่อนรับประทาน ถิ่นกำเนิดของมังคุดอยู่ที่หมู่เกาะซุนดาและโมลุกกะ ประเทศอินโดนีเซีย หลังจากได้รับสายพันธุ์มาก็มีการเพาะปลูกกระจายออกไปหลายท้องที่ จังหวัดที่นิยมปลูกมังคุดทางภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ระนอง พังงา และนราธิวาส แต่ที่สายพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้ชื่อว่ารสชาติดี ชื่อเสียงโด่งดังไปทั่วโลกและมีราคาสูงที่สุดในประเทศไทยคือ อำเภอคีรีวง จังหวัดนครศรีธรรมราช เนื่องจากเป็นที่ราบอยู่ในหุบเขา มีลำธารน้ำไหลผ่าน ทำให้มีสภาพอากาศเหมาะสมแก่การเพาะปลูกมังคุด ซึ่งจะมีทั้งทั้งมังคุดสวนและมังคุดเขา ที่มีลูกใหญ่ หูเขียว ผิวสวย เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยของ S.M.GHUFRAN SAEED และคณะ (2010) ได้ศึกษาสีในอาหารเพื่อมาเปรียบเทียบกับสีสังเคราะห์ในการประยุกต์กับการวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งสี Carmoisine-Red-3 เป็นสีในอาหารไม่ที่เป็นพิษและดูดซึมเข้าเนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว มีผลกับระบบขับถ่ายแต่ไม่ทำให้เกิดเนื้องอกหรือเสียชีวิต และสีสังเคราะห์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ Coomassie Brilliant Blue R-250 ซึ่งโครงสร้างของ Carmoisine-Red-3 และ Coomassie Brilliant Blue เป็นดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างของ Carmoisine-Red-3 (ซ้าย) และ Coomassie Brilliant Blue R- 250 (ขวา)

Carmoisine-Red-3	Coomassie Brilliant Blue-R-250
	
Red powder(stained red)	Blue powder(stained blue)
Carmoisine is not carcinogenic and that the no-untoward-effect level in this study was 400 mg carmoisine/kg body weight/day	Slightly hazardous in case of skin contact (irritant), of ingestion, of inhalation
Usually use as Food Color in confectionary, beverage, ice cream and in cosmetics etc.	Not suitable for edible use

จากตารางที่ 2.1 แสดงให้เห็นว่า เป็นอันตรายเล็กน้อยกับผิวหากสัมผัส การดูดซึมเข้าสู่ร่างกายหรือแม้แต่การสูดดม จึงจำเป็นต้องหาสีย้อมที่มาจากธรรมชาติเพื่อลดอันตรายดังกล่าว หลังจากการย้อมด้วยสารสีทั้งสองชนิด ผลปรากฏว่า Carmoisine-Red-3 ใช้เวลาในการล้างน้ำย้อมออกจากสีย้อมน้อยกว่าสีย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250 ในส่วนของความเข้มแถบโปรตีนของ Carmoisine-Red-3 ต่ำกว่า แต่ขอบของแถบโปรตีนชัดเจนกว่า Coomassie Brilliant Blue R-250 อีกทั้งความคงทนของแถบโปรตีนของ Carmoisine-Red-3 สูงกว่า Coomassie Brilliant Blue R-250 ข้อมูลเป็นดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การเปรียบเทียบระหว่าง Carmoisine-Red-3 และ Coomassie Brilliant Blue R-250

Methodology	Carmoisine-Red-3	Coomassie Brilliant Blue R-250
1. Concentration of dye used	0.2% solution	0.2% solution
2. Staining time	overnight	overnight
3. Destaining time	30 min	48 h
4. Intensity of bands	light but clear	distinct, dark
5. Stability of bands	more than 6 months	more than 3 months

Figure 1a. The samples of curry leave proteins (lane 3–9). BSA (lane 1, 2, 10), rice bran protein (lane 11–14) and mixture of BSA, nisin, casein and wheat gluten (lane 15) resolved and stained with Cammoisine

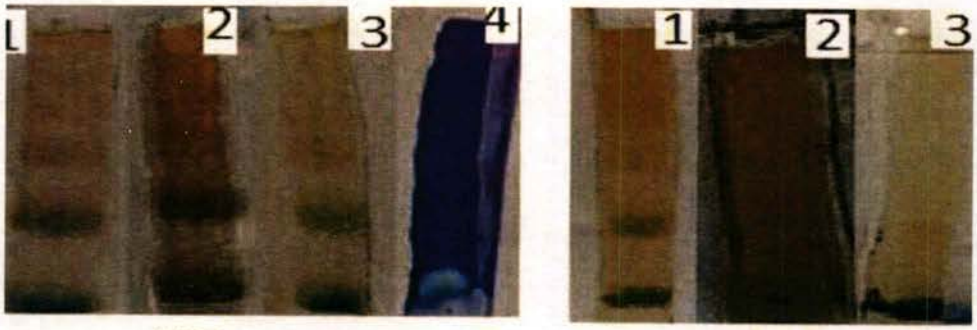
Figure 1b. The samples of curry leave proteins (lane 3–9). BSA (lane 1, 2, 10, 11). rice bran protein (lane 12–15) and mixture of BSA, nisin, casein and wheat gluten (lane 16) resolved and stained with Coomassie

รูปที่ 2.28 โปรตีนที่ถูกย้อมด้วย Carmoisine-Red-3 (ซ้าย) และ Coomassie Brilliant Blue R-250 (ขวา)
(https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/31816.pdf)

สรุปได้ว่า Carmoisine-Red-3 เป็นสีย้อมที่มีความคงทนที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารภายใต้อุณหภูมิต่ำหรือสูง มีคุณสมบัติในการย้อมโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งแถบโปรตีนมีสีชัดเจน อีกทั้งยังปลอดภัยต่อการใช้งาน

งานวิจัยของ JayaPrada Rao Chunduri และ Harsha Mota (2015) ได้ศึกษาสารสกัดจากพืชที่ละลายน้ำได้เพื่อมาใช้ในการทำสีย้อมโปรตีนโดยใช้เทคนิค PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) เป็นเทคนิคการแยกโปรตีนที่ดีที่สุด ซึ่งสีย้อมที่ใช้เป็นสีเคราะห์ เช่น Coomassie Brilliant Blue, Silver nitrate, fluorescent dyes เป็นต้น สีสังเคราะห์ที่ใช้ในวิธีการย้อมโปรตีนนั้นไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและไม่สามารถย่อยสลายได้ จึงมีแนวคิดใหม่ในการสกัดสารจากพืชธรรมชาติสำหรับการพัฒนาและการจำแนกแถบโปรตีนโดยใช้ส่วนผสมจากธรรมชาติ เช่น ชา กาแฟ เฮนน่า และบีทรูท ซึ่งหาได้ง่าย งานวิจัยนี้กำหนดการแปรผันของอุณหภูมิที่ 37 ผลปรากฏว่าการย้อมโปรตีนที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที พบว่า เพียงพอที่จะเห็นแถบสีที่ชัดเจนสำหรับสารสกัด phytal ทั้งชาและกาแฟ ดังภาพต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



HB HCT

รูปที่ 2.29 ประสิทธิภาพของสีย้อมธรรมชาติ HB มาจาก henna และ beetroot (ซ้าย) : HCT มาจาก Henna, Coffee และ Tea (ขวา) อุณหภูมิในการย้อม (1) RT (2) 37° C (3) 120 ° C (4) ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue

(https://pdfs.semanticscholar.org/4dfc/a51af577c91b143d63fe61b6f0c9f07c1be1.pdf)

นอกจากนั้นงานวิจัยนี้กำหนดการแปรผันของเวลาที่ 30, 60, และ 90 นาที พบว่าที่ 60 นาที สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยตาเปล่า เห็นแถบโปรตีนชัดเจน แสดงดังภาพต่อไปนี้

HB. HCT

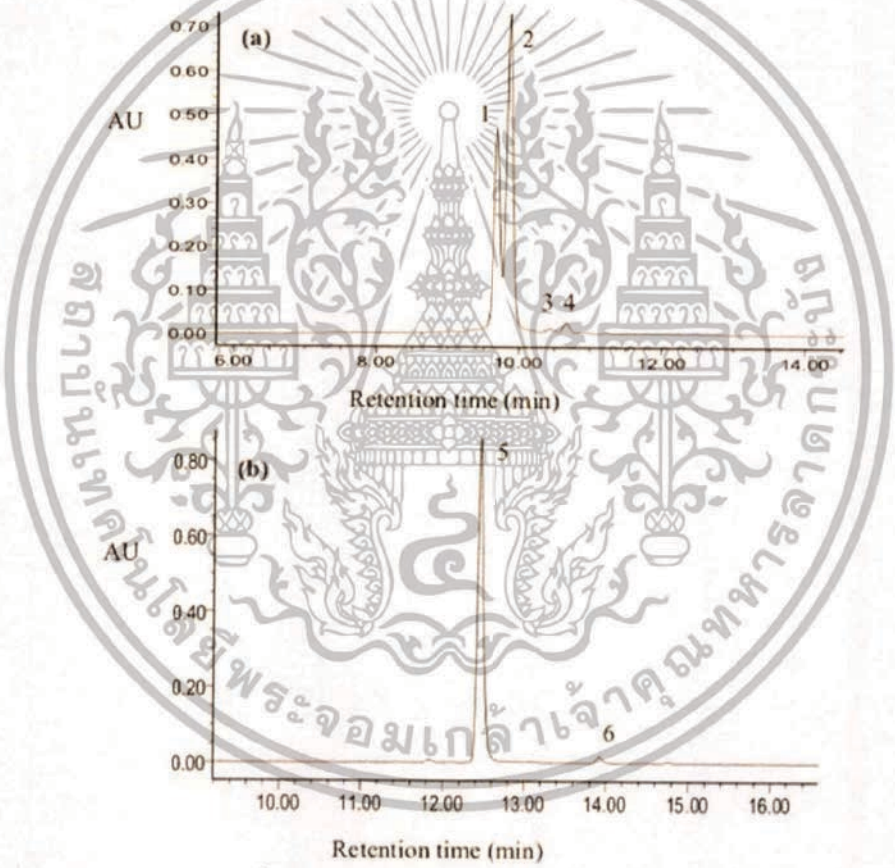
รูปที่ 2.30 ประสิทธิภาพของสีย้อมธรรมชาติ HB มาจาก henna และ beetroot (ซ้าย) : HCT มาจาก Henna, Coffee และ Tea (ขวา) เวลาในการย้อม (1) 30 นาที (2) 60 นาที (3) 90 นาที (4) ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue

(https://pdfs.semanticscholar.org/4dfc/a51af577c91b143d63fe61b6f0c9f07c1be1.pdf)

สรุปได้ว่าสีย้อมจากธรรมชาติ เช่น ชา กาแฟ เฮนน่า และบีทรูท เป็นอีกหนึ่งทางเลือกใหม่ในการใช้เป็นสีย้อมโปรตีน เนื่องจากต้นทุนต่ำและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งขั้นตอนการย้อมและขั้นตอนการล้างมีความรวดเร็ว และสีย้อมสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยของ Chuanguang Qin และคณะ (2010) ได้ศึกษาสารสีที่อยู่ในลูกหม่อน พบว่าเป็นสารสีแอนโทไซยานิน ซึ่งในขั้นตอนการสกัดสารสีออกจากลูกหม่อนทำได้โดยใช้ตัวทำละลายแอลกอฮอล์ 95% ต่อกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมงในที่มืด สารแอนโทไซยานินที่สกัดจากลูกหม่อนประกอบด้วย cyaniding 3-o-rutinoside มีอยู่ 60% , cyaniding 3-o-glucoside มีอยู่ 38% และสารอื่นๆ อีก 2% คือ pelargonidin 3-o glucoside กับ pelargonidin 3-o rutinoside ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสีแอนโทไซยานิน คือเทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Ultraviolet–visible spectroscopy, ทดสอบความคงตัว เป็นต้น

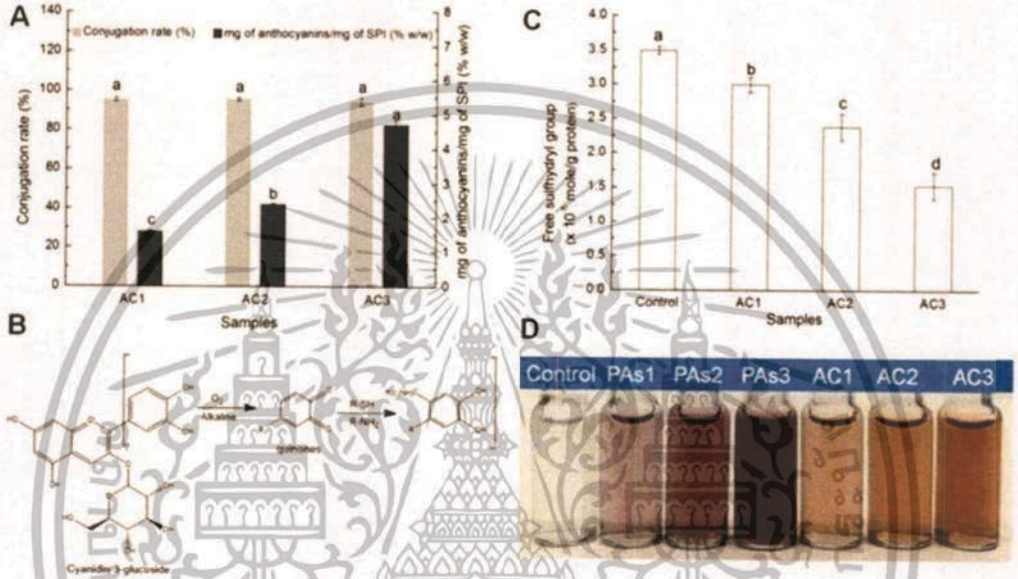


รูปที่ 2.31 ผลโครมาโทแกรมที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร สารสกัดจากลูกหม่อน (บน) และสารสกัดจากลูกหม่อนหลังจากผ่านการย่อยด้วยกรด (ล่าง) ซึ่งสารสี primary anthocyanins (เลข 1 และ 2) สาร aglycone 5 จาก cyaniding-3-*O*-rutinoside (เลข 5) สารสี minor anthocyanins (เลข 3 และ 4) สาร aglycone 6 จาก pelargonidin-3-*O*-rutinoside (เลข 6)

(https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/228_2008-CJFS.pdf)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

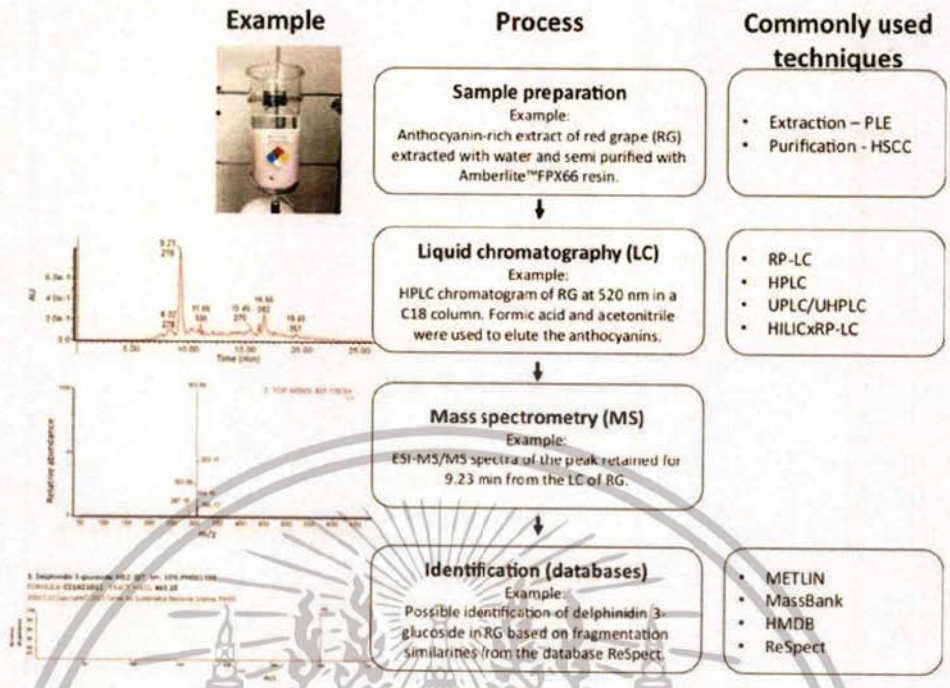
งานวิจัยของ Lianzhou Jiang และคณะ (2019) ได้ทำการศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองกับสารสีแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในผลไม้หลายชนิด หนึ่งในผลไม้เหล่านั้นคือ ลูกหม่อน ซึ่งพบว่าจับกับโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนต์ในสภาวะมีออกซิเจน โพลีฟีนอลสามารถถูกออกซิไดซ์เป็นควินโนนภายใต้สภาวะที่เป็นด่างและควินโนนซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาได้รับการเติมนิวคลีโอไทล์ที่หมู่อะมิโนและหมู่ไธออลของโปรตีนและได้เชื่อมเป็นแบบโควาเลนต์



รูปที่ 2.32 อัตราการจับกันและตัวเลขแอนโทไซยานินที่จับกับโปรตีนต่อมิลลิกรัม (A) ประสิทธิภาพการจับกันของ cyaniding-3-glucoside และ sulfhydryl/amino groups ของโปรตีน (B) sulfhydryl groups อิสระใน AC1, AC2, AC3 (C) สีของแอนโทไซยานินในส่วนผสมต่างกัน (D)
(https://www.researchgate.net/publication/328839432_Covalent_conjugates_of_anthocyanins_to_soy_protein_Unravelling_their_structure_features_and_in_vitro_gastrointestinal_digestion_fate)

งานวิจัยของ Paulina Ongkowijoyo และคณะ (2018) ได้ศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคการสกัดและการวิเคราะห์แอนโทไซยานินที่ได้มาจากอาหาร โมเลกุลแอนโทไซยานินมีขั้วจะถูกสกัดโดยตัวถูกละลายมีขั้ว ที่แตกต่างกัน เช่น อะซิโตน เมทานอล น้ำ และแอลกอฮอล์ สภาวะการสกัดที่ดีที่สุด คือ ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น acetonitrile, ethanol หรือ methanol และสารที่เป็นกรด เช่น กรดฟอร์มิก กรดฟอสฟอริก กรดซิตริก อย่างไรก็ตามการสกัดสารสีธรรมชาติกับการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากจะเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่อสุขภาพและความปลอดภัย ซึ่งผลที่ได้จากการสกัดแอนโทไซยานินด้วยน้ำให้ผลน้อยกว่าการใช้กรดฟอสฟอริกหรือเอทานอลเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.33 ไดอะแกรมการพิจารณาเทคนิค Mass spectrometry ของแอนโทไซยานิน (https://www.researchgate.net/publication/322296763_Extraction_techniques_and_analysis_of_anthocyanins_from_food_sources_by_mass_spectrometry_An_update)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัสดุธรรมชาติ : ขมิ้นสำเร็จรูป, ขมิ้นสด, ลูกหม่อน, ทับทิม, บีทรูท, ข้าวโพดม่วง, อัญชัน และเปลือกมังคุด

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ขนาดต่างๆ, กระบอกตวง, แท่งแก้วคนสาร, หลอดหยด (Pasteur Pipette)
2. หลอดทดลอง
3. ที่วางหลอดทดลอง
4. ช้อนตักสาร
5. ขวดดูแรน (Duran) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
6. มีด เขียง
7. ถาดสแตนเลส
8. กล่องพลาสติก
9. ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ เช่น 20-200 ไมโครลิตร, 100-1000 ไมโครลิตร
10. พลาสติกทิปขนาดต่างๆ
11. หลอด Eppendorf
12. หลอด Centrifuge
13. เครื่องรันโปรตีน (BIO-RAD, Mini-PROTEAN)
14. แหล่งกำเนิดกระแสไฟฟ้า
15. เครื่องปั่น
16. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
17. เครื่องเขย่า (shaker)
18. ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส
19. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
20. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel doc)
21. เครื่องวัด pH
22. Hotplate Stirrer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. Ethanol
3. Isopropanol
4. Methanol
5. Acetic acid
6. Brilliant blue
7. 40% Acrylamide/bis stock
8. Tris base
9. Ammonium persulfate (APS)
10. Tetramethylethylenediamine (TEMED)
11. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
12. Glycine
13. Glycerol
14. Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)
15. β-mercaptoethanol
16. Bromphenol blue

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการดำเนินงานในการผลิตสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติ โดยในที่นี้เลือกใช้วัสดุธรรมชาติ ได้แก่ ขมิ้นสำเร็จรูป, ขมิ้นสด, ลูกหม่อน, ทับทิม, บีทรูท, ข้าวโพดม่วง, อัญชัน และเปลือกมังคุด รวมทั้งสิ้นใช้วัสดุธรรมชาติ 8 ชนิด นำแต่ละชนิดมาเตรียมให้ได้ในลักษณะเป็นผงละเอียด เริ่มต้นใช้มีดหั่นวัสดุธรรมชาติแต่ละชนิดให้ได้เป็นชิ้นเล็กๆวางใส่ในถาดสแตนเลสแล้วนำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อบให้แห้ง หลังจากนั้นใช้เครื่องปั่นบดให้เป็นผงและแยกเก็บในถุงต่างกัน ต่อมานำผงทุกชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพการละลายโดยนำผงพืช 1 กรัม แช่ในน้ำและเอทานอลอย่างละ 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นทำการบันทึกและเปรียบเทียบการละลายทำเช่นเดียวกันจนครบทั้ง 8 ชนิด

เมื่อได้ชนิดของวัสดุธรรมชาติที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการละลาย ต่อมาจะถูกนำมาทดสอบเบื้องต้นในการย้อมติดสีโปรตีน หากวัสดุธรรมชาติชนิดใดสามารถย้อมแล้วเห็นแถบโปรตีนจะถูกเลือกเพื่อนำไปพัฒนาเป็นน้ำย้อมโปรตีนต่อไป ซึ่งการพัฒนาน้ำย้อมโปรตีนจะต้องผ่านขั้นตอนการดำเนินงาน ดังนี้

3.1 การเตรียมน้ำย้อม

น้ำย้อมโปรตีนที่ใช้เตรียมโดยใช้วัสดุธรรมชาติและน้ำย้อมที่เป็นมาตรฐานในการย้อมโปรตีนทั่วไป คือ Coomassie Brilliant Blue สามารถเตรียมได้ดังนี้

3.1.1 น้ำย้อมพืชเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

นำผงพืช 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มโดยใช้ Hotplate Stirrer จนเดือด ทิ้งไว้ให้เย็นจากนั้นเทใส่หลอด Centrifuge และนำมาชั่งน้ำหนักหลอดที่มีของเหลวให้มีความใกล้เคียงกัน จากนั้นนำมาใส่เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำด้านบน (supernatant) มาใช้เป็นน้ำย้อม

3.1.2 Coomassie Brilliant Blue R

ผสมเมทานอล 90 มิลลิลิตร, กรดอะซิติก 15 มิลลิลิตร, Brilliant blue 0.2 กรัม และปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียมเจล

เตรียมสารสำหรับ Separating gel และ Stacking gel โดยผสมสารดังแสดงในตารางที่ 3.1 หลังจากผสมสารแล้วทำการเตรียมประกอบอุปกรณ์ SDS-PAGE แล้วค่อยๆเติม Separating gel ลงใน gel sandwich เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ โดยใช้ไมโครปิเปตให้ได้ประมาณ ¾ ส่วนของกระจก จากนั้นเททับผิวหน้าเจลด้วย 50% Isopropanol เพื่อป้องกันแก๊สออกซิเจน ซึ่งการเตรียม 50% Isopropanol นั้นทำได้โดยใส่น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตรผสมกับ Isopropanol 25 มิลลิลิตร เมื่อเททับ

เอกสารนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเพื่อการศึกษาเท่านั้น ห้ามมิให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผิวหน้าเจลด้วย 50% Isopropanol แล้วรอประมาณ 30 นาที จนกระทั่งเจลแข็งแล้วเท 50% Isopropanol ออกพร้อมกับฉีดน้ำกลั่นล้าง Isopropanol ออกให้หมดและซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ จากนั้นใช้ไมโครปิเปตเติม Stacking gel ลงในพื้นที่ที่เหลือแล้วนำ comb มาใส่ช่องว่างของกระจก รอประมาณ 30 นาที เพื่อให้ Stacking gel แข็งตัว เมื่อ Stacking gel แข็งตัวแล้วนำ comb ออกจากช่องว่างของกระจกและถอดออกจาก Casting frames จากนั้นประกอบเข้ากันที่ Clamping frames เมื่อประกอบนำไปใส่ใน chamber เตรียมการรันโปรตีนเพื่อการแยกโปรตีน ซึ่งการเตรียมส่วนประกอบต่างๆและวิธีการใช้สำหรับอุปกรณ์ SDS-PAGE แสดงในภาคผนวก ก

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารที่ใช้เตรียม Separating gel และ Stacking gel

สารเคมี	ปริมาณ	
	Separating gel	Stacking gel
น้ำกลั่น	2.19 มิลลิลิตร	3.13 มิลลิลิตร
40% acrylamide/bis stock	1.56 มิลลิลิตร	0.62 มิลลิลิตร
1.5M Tris, pH 8.8	1.25 มิลลิลิตร	-
1.5M Tris, pH 6.8	-	1.25 มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate (APS)	50 ไมโครลิตร	50 ไมโครลิตร
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	5 ไมโครลิตร	5 ไมโครลิตร

3.3 การเตรียมสารเคมีที่เกี่ยวข้อง

หลังจากขั้นตอนการเตรียมเจล (ในข้อ 3.2) ต่อมาจะเป็นขั้นตอนการรันโปรตีนซึ่งขั้นตอนนี้จะมีสารเคมีที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ 10x Running buffer, 6x Loading dye ซึ่งสามารถเตรียมได้ดังแสดงในตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งในโครงงานพิเศษนี้ใช้โปรตีนเซลลูเลส (Cellulase) ทำการเตรียมโดยชั่งผงโปรตีนเซลลูเลส 0.05 กรัม เติมน้ำจนครบ 1 มิลลิลิตร ของหลอด Eppendorf จะได้น้ำโปรตีน จากนั้นดูดน้ำโปรตีนมา 0.5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 7 ไมโครลิตร และน้ำ 8 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และน้ำสำหรับล้างสีย้อม (Destaining solution) เตรียมโดยผสมเมทานอล 300 มิลลิลิตร กับกรดอะซิติก 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ปริมาณสารที่ใช้เตรียม 10x Running buffer

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม)
Tris Base	30.2
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	10
Glycine	144

*ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.3 ปริมาณสารที่ใช้เตรียม 6x Loading dye

สารเคมี	ปริมาณ
30% Glycerol	15 มิลลิลิตร
1.5M Tris, pH 6.8	28 มิลลิลิตร
6 mM Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)	600 ไมโครลิตร
10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)	5 กรัม
β-mercaptoethanol	104.8 ไมโครลิตร
Bromphenol blue	6 มิลลิกรัม

3.4 การแยกโปรตีน

หลังจากขั้นตอนการเตรียมเจลในข้อ 3.2 เมื่อใส่ใน chamber แล้วจึงเท Running buffer จากนั้นทำการโหลดน้ำโปรตีนมาตรฐานลงใน well 15 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 25 ไมโครกรัม) ด้วยไมโครปิเปต โดยระวังอย่าให้ตัวอย่างล้นออกมานอก well หลังจากโหลดเรียบร้อยให้ปิดฝา chamber ให้แน่น จากนั้นต่อเข้ากับแหล่งกำเนิดไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 150 โวลต์ นาน 60 ถึง 90 นาที เมื่อเริ่มทดสอบรันโปรตีนให้สังเกตการเคลื่อนที่ของโปรตีน

เมื่อโปรตีนเคลื่อนที่ลงมาจนสุดแผ่นเจลแล้วปิดเครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า จากนั้นจึงนำแผ่นเจลออกมา โดยใช้ Spacer เป็นตัวดันกระจกออกจากกัน ตัดส่วน Stacking gel ทิ้งแล้วค่อยๆลอกส่วน Separating gel ออกหลังจากนั้นนำเจลที่ได้ใส่ลงในกล่องพลาสติก เพื่อทำการย้อมโปรตีนต่อไป ซึ่งวิธีการทำแสดงในภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การย้อมและการล้างสีย้อมโปรตีน

นำแผ่นเจลที่ได้จากข้อ 3.4 ที่อยู่ในกล่องพลาสติกที่เตรียมไว้ เทน้ำย้อมทุกชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ท่วมแผ่นเจล นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ย้อมทิ้งไว้ข้ามคืน โดยมี Coomassie เป็นชุดควบคุม หลังจากทำการย้อมครบเวลาข้ามคืน เทน้ำย้อมออกจากกล่องพลาสติกที่ใส่แผ่นเจลแล้วเทน้ำสำหรับล้างสีย้อมให้ท่วมแผ่นเจลแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที จนกระทั่งแผ่นเจลมีสีพื้นหลังใส (ติดสีย้อมน้อยที่สุด) จึงทำการบันทึกภาพเจลด้วยโทรศัพท์มือถือและเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel doc) โดยเลือกวัสดุธรรมชาติที่ดีที่สุดเพื่อนำไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย้อมโปรตีนต่อไป

3.6 การปรับสภาวะการย้อมสีโปรตีน

เมื่อได้วัสดุธรรมชาติที่ดีที่สุด จากนั้นนำมาทำการปรับสภาวะในการย้อมสีโปรตีน ดังนี้

3.6.1 อิทธิพลของเวลาในการย้อม

แช่แผ่นเจลในน้ำย้อมที่ดีที่สุดเป็นเวลา 30, 60, 90 นาที และข้ามคืน จากนั้นทำการล้างน้ำย้อมจนกระทั่งแผ่นเจลมีสีพื้นหลังใส แล้วจึงทำการบันทึกภาพเจลในแต่ละช่วงเวลาที่กำหนด

3.6.2 อิทธิพลของความเข้มข้นน้ำย้อม

ทำการทดลองน้ำย้อมที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, และ 30 โดยแช่แผ่นเจลในน้ำย้อมที่ความเข้มข้นต่างกันดังกล่าว เป็นเวลาที่ดีที่สุดในข้อ 3.6.1 จากนั้นทำการล้างน้ำย้อมจนกระทั่งแผ่นเจลมีสีพื้นหลังใส แล้วจึงทำการบันทึกภาพเจลในแต่ละความเข้มข้นที่กำหนด

3.6.3 อิทธิพลของน้ำที่ใช้ล้าง

เมื่อได้เวลาและความเข้มข้นของน้ำย้อมที่ดีที่สุดในการย้อมเจลในข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 ตามลำดับ จากนั้นนำมาทำการทดลองความแตกต่างของน้ำที่ใช้ล้างเจลโปรตีน ได้แก่ 5% Acetic acid, น้ำ และ Destaining solution ล้างน้ำย้อมจนกระทั่งแผ่นเจลมีสีพื้นหลังใสแล้วจึงทำการบันทึกภาพเจลในแต่ละชนิดของน้ำที่ใช้ล้างดังที่กำหนด

3.6.4 ความว่องไวในการตรวจติดตามปริมาณโปรตีน

ทำการทดลองปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันในช่วง 5 ถึง 50 ไมโครกรัม เพิ่มทีละ 5 ไมโครกรัม โดยโหลดปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันลงใน well หลังจากนั้นปิดฝาเครื่องรันโปรตีน ตั้งค่าความต่างศักย์เป็น 150 โวลต์ คอยสังเกตการเคลื่อนที่ของโปรตีนลงมาจนสุดแผ่นเจลแล้วจึงปิดเครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าแล้วนำแผ่นเจลออกมา นำเจลที่ได้ใส่ในกล่องพลาสติก เทน้ำย้อมในความเข้มข้นที่ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในข้อ 3.6.2 ให้ท่วมเจล ทิ้งไว้ตามเวลาที่ดีที่สุดในข้อ 3.6.1 จากนั้นใช้น้ำล้างที่ดีที่สุดในข้อ 3.6.3 ทำการล้างน้ำย้อมจนกระทั่งแผ่นเจลมีสีพื้นหลังใส จึงทำการบันทึกภาพเจลในแต่ละปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปราย

ในปัจจุบันการย้อมสีโปรตีนมีหลากหลายวิธี โดยการศึกษาครั้งนี้มุ่งหวังที่จะหาสีย้อมทดแทนสีเคมีเดิม คือ Coomassie โดยใช้วัสดุจากธรรมชาติที่มีสีต่างๆได้แก่ ขมิ้นสำเร็จรูป, ขมิ้นสด, ลูกหม่อน, ทับทิม, บีทรูท, ข้าวโพดม่วง, อัญชัน และเปลือกมังคุด ซึ่งจะมีการทดสอบการละลายของสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติ และการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนใน SDS-PAGE ดังต่อไปนี้

4.1 ผลการละลายของสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติ

การนำผงวัสดุธรรมชาติมาทดสอบการละลายโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการละลายในน้ำและเอทานอล ดังแสดงในรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 ผลการละลายของสีย้อมโปรตีนจากวัสดุธรรมชาติที่ละลายในน้ำและเอทานอล

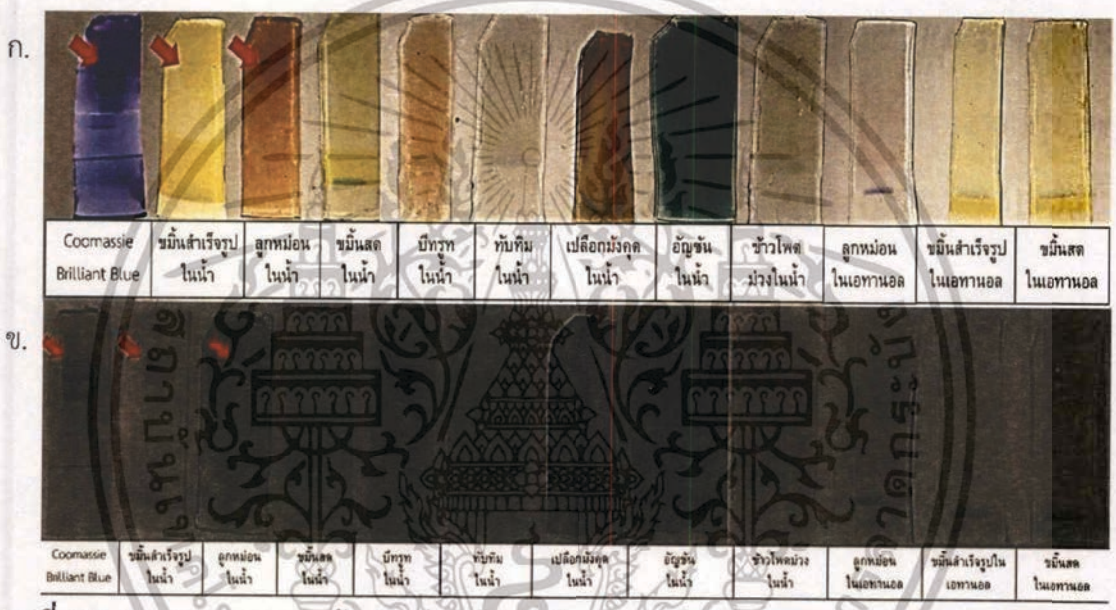
ผลการทดลองพบว่า วัสดุธรรมชาติทุกชนิดที่เลือกมามีประสิทธิภาพการละลายในน้ำได้ดี เช่น ลูกหม่อนและข้าวโพดม่วงมีสารแอนโทไซยานินซึ่งมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิกจึงสามารถละลายในน้ำได้ แต่วัสดุธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพการละลายในเอทานอลได้ดีมีเพียง 3 ชนิด คือ ขมิ้นสำเร็จรูป, ขมิ้นสด และลูกหม่อน ส่วนทับทิม, บีทรูท, ข้าวโพดม่วง, อัญชัน และเปลือกมังคุดละลายในเอทานอลได้น้อยมาก อาจเนื่องมาจากสภาพขั้วของสารสีมีค่าใกล้เคียงกับน้ำมากกว่าเอทานอลจึงทำให้ละลายในน้ำได้ดีกว่าในเอทานอล (like dissolves like) ในปริมาตรที่เท่ากัน แต่หากเพิ่มปริมาตรเอทานอลก็จะทำให้ละลายได้ดีมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงเลือกขมิ้นสำเร็จรูป, ขมิ้นสด, ลูกหม่อน, ทับทิม, บีทรูท, ข้าวโพดม่วง, อัญชัน, เปลือกมังคุดที่ละลายในน้ำและขมิ้นสำเร็จรูป, ขมิ้นสด, ลูกหม่อนที่ละลายในเอทานอลเพื่อไปทดสอบการย้อมติดสีของโปรตีนในขั้นตอนต่อไป

4.2 ผลการย้อมติดสีของโปรตีนใน SDS-PAGE

การทดสอบนี้จะทำการแยกโปรตีนผสมเซลลูเลสใน SDS-PAGE จากนั้นจะนำเจลมาย้อมกับน้ำย้อมที่ได้เลือกไว้เบื้องต้น โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือและถ่ายด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมมีการปรับแสงของรูปให้เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบการย้อมติดสีของโปรตีนใน SDS-PAGE รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.) โดยมีการปรับแสงของรูปให้เห็นแถบโปรตีนชัดเจนยิ่งขึ้น

ผลการทดลองพบว่า น้ำย้อมที่มีประสิทธิภาพในการติดแถบโปรตีนได้ชัดเจน คือ ขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อนที่ละลายในน้ำ ในขณะที่บีทรูท, ทับทิม, เปลือกมังคุด, อัญชัน และข้าวโพดม่วงที่ละลายในน้ำ มีประสิทธิภาพในการติดโปรตีนต่ำซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสภาพขั้วของสารสีมีความใกล้เคียงกับน้ำมากกว่าโปรตีน สารสีจึงละลายในน้ำไม่เกาะติดกับโปรตีนทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนได้ ในกรณีของขมิ้นสำเร็จรูปและขมิ้นสดเป็นสารชนิดเดียวกันละลายในน้ำเช่นเดียวกัน แต่ขมิ้นสดในน้ำไม่ติดแถบโปรตีนมีความเป็นไปได้ว่าความบริสุทธิ์ต่ำที่เกิดจากการไม่ปอกเปลือกและการปั่นที่ไม่ละเอียดก่อนการนำไปทดลองเมื่อเทียบกับขมิ้นสำเร็จรูปจากโรงงาน

ดังนั้นจึงเลือกขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อนที่ละลายในน้ำ เพื่อไปทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนโดยกำหนดเวลาในการย้อมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของเวลาต่อการติดสีของโปรตีน

การทดสอบนี้จะทำการแยกโปรตีนผสมเซลลูเลสใน SDS-PAGE จากนั้นจะนำเจลมาย้อมกับน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปและน้ำย้อมลูกหม่อน โดยกำหนดเวลาในการย้อม คือ 30, 60, 90 นาทีและข้ามคืน โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือและถ่ายด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล พร้อมมีการปรับแสงของรูปให้เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ

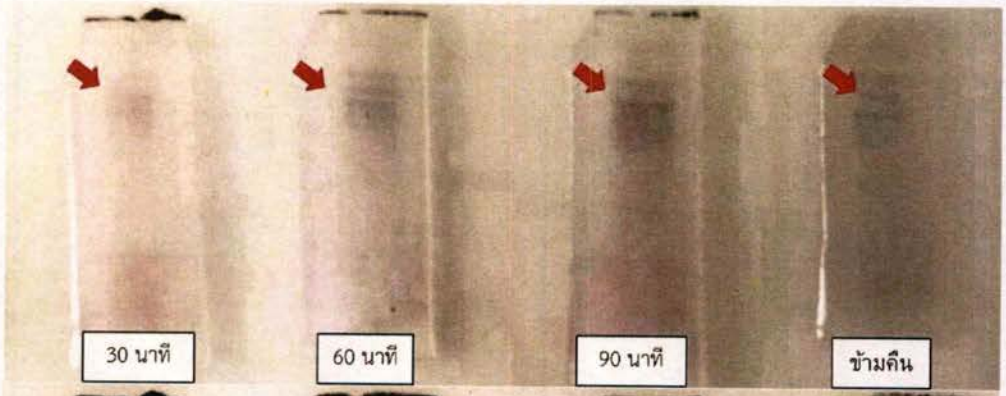
ก.

ข.

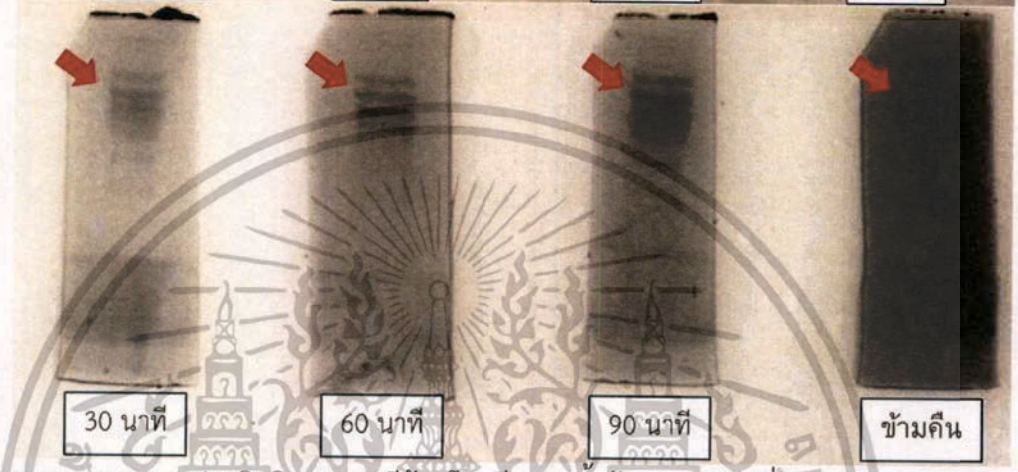
รูปที่ 4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปที่เวลา 30, 60, 90 นาทีและข้ามคืน ตามลำดับ รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.



ข.



รูปที่ 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมลูกหม่อนที่เวลา 30, 60, 90 นาที และข้ามคืน ตามลำดับ รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.)

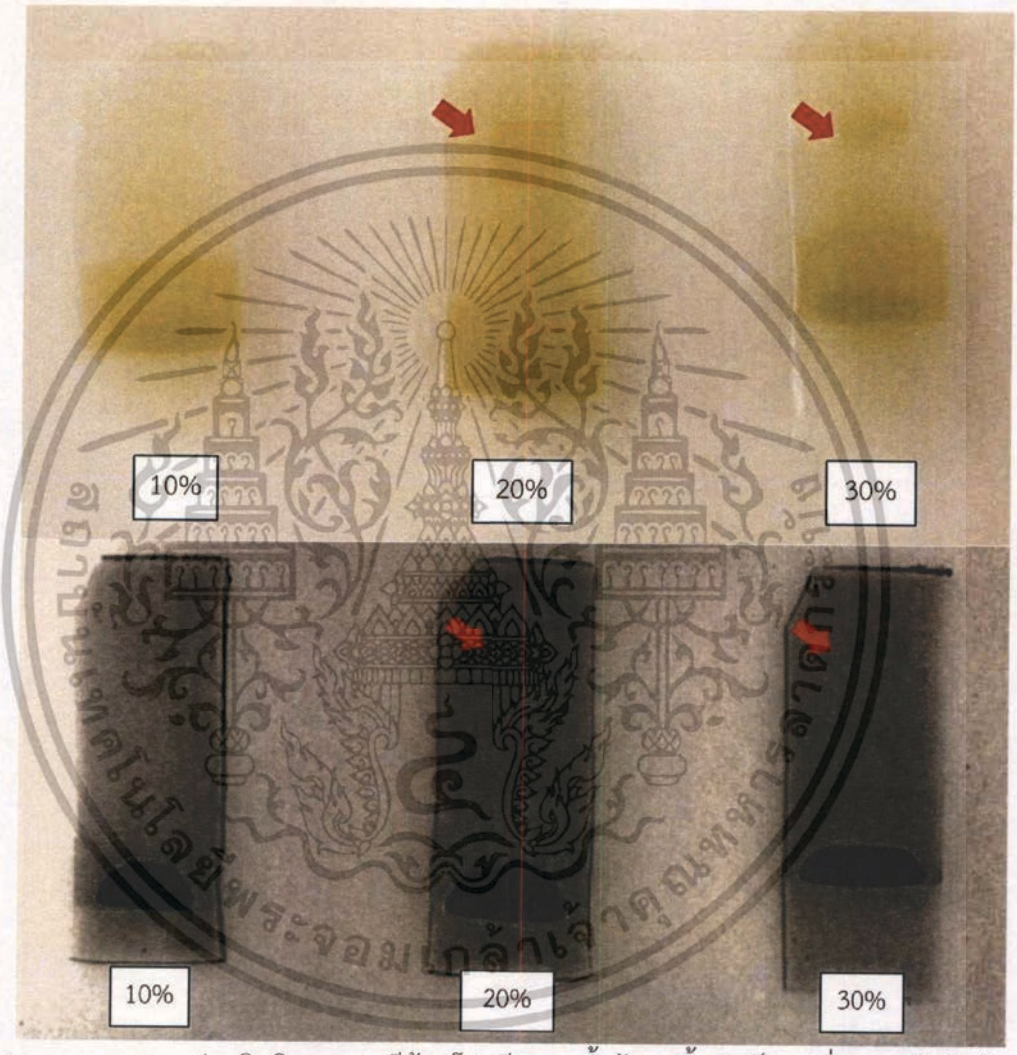
ผลการทดลองพบว่า การย้อมด้วยน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปติดแถบโปรตีนได้ดีที่สุดที่เวลาข้ามคืน ส่วนน้ำย้อมลูกหม่อนติดแถบโปรตีนได้ดีทุกช่วงเวลาในการย้อม มีความเป็นไปได้ว่าสารสีของลูกหม่อนเข้มกว่าสารสีของขมิ้นจึงทำให้สังเกตเห็นแถบโปรตีนชัดเจนกว่าในเวลาที่เท่ากัน

ดังนั้นจึงเลือกเวลาในการย้อมของน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปและน้ำย้อมลูกหม่อนที่เวลา ข้ามคืน และ 90 นาที ตามลำดับ เพื่อไปทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนโดยกำหนดความเข้มข้นของน้ำย้อมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของความเข้มข้นต่อการติดสีของโปรตีน

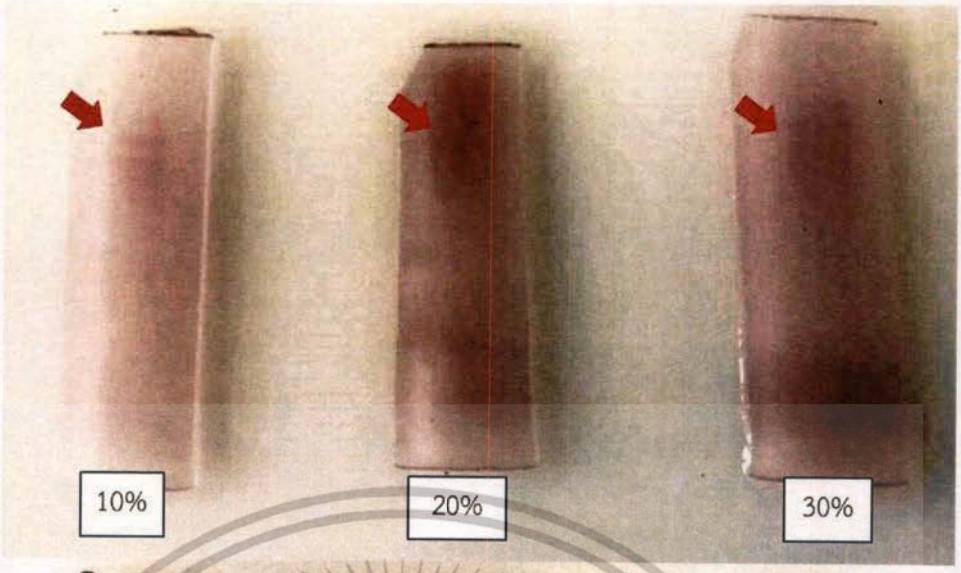
การทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนใน SDS-PAGE จากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปและน้ำย้อมลูกหม่อน โดยกำหนดความเข้มข้นของน้ำย้อม คือ ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือและถ่ายด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล พร้อมมีการปรับแสงของรูปให้เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ



รูปที่ 4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปที่ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 ตามลำดับ รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.



ข.

รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมลูกหม่อนที่ความเข้มข้น ร้อยละ 10, 20 และ 30 ตามลำดับ รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.)

ผลการทดลองพบว่า ในการย้อมเจลโปรตีนด้วยน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปติดแถบโปรตีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 30 แต่ติดได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 เนื่องจากที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มีปริมาณน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายมากกว่าขมิ้นสำเร็จรูปซึ่งเป็นตัวถูกละลาย จึงทำให้น้ำย้อมมีความเจือจาง ส่งผลให้ไม่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 มีปริมาณน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายน้อยกว่าขมิ้นสำเร็จรูปซึ่งเป็นตัวถูกละลาย จึงทำให้ประสิทธิภาพการละลายของขมิ้นสำเร็จรูปในน้ำต่ำ ส่งผลให้ติดแถบโปรตีนได้ไม่ดีเท่าที่ควร ส่วนน้ำย้อมลูกหม่อนติดแถบโปรตีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ติดแถบโปรตีนได้ชัดเจนกว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 และเป็นการลดต้นทุนได้มากกว่าการใช้ความเข้มข้นร้อยละ 30 ดังนั้นจึงเลือกน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปและน้ำย้อมลูกหม่อนที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 เพื่อไปทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนโดยการกำหนดชนิดน้ำที่ใช้ล้างต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลของชนิดน้ำที่ใช้ล้าง

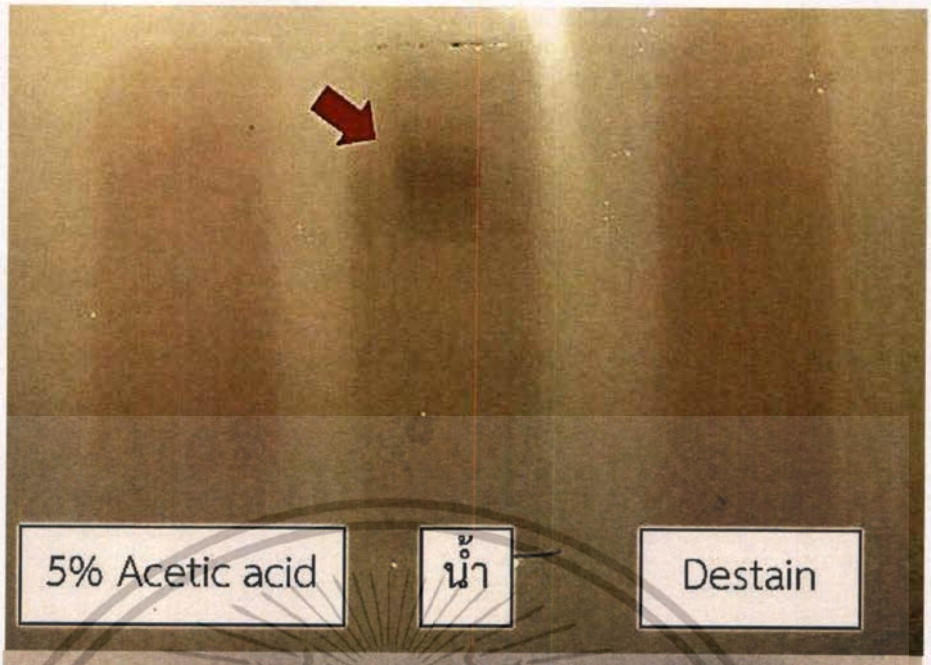
การทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนใน SDS-PAGE จากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปและน้ำย้อมลูกหม่อน โดยกำหนดชนิดน้ำล้าง คือ ชนิดที่ 1 5% Acetic acid เลือกนำมาทดสอบตามงานวิจัยของ JayaPrada Rao Chunduri และ Harsha Mota (2015) ชนิดที่ 2 น้ำ เลือกนำมาทดสอบเพราะเป็นสารเคมีที่หาง่าย ราคาถูก ชนิดที่ 3 Destain เลือกนำมาทดสอบเพราะเป็นน้ำล้างอ้างอิงที่ใช้ล้างเจลโปรตีนทั่วไป โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือและถ่ายด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมมีการปรับแสงของรูปให้เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ

ก.

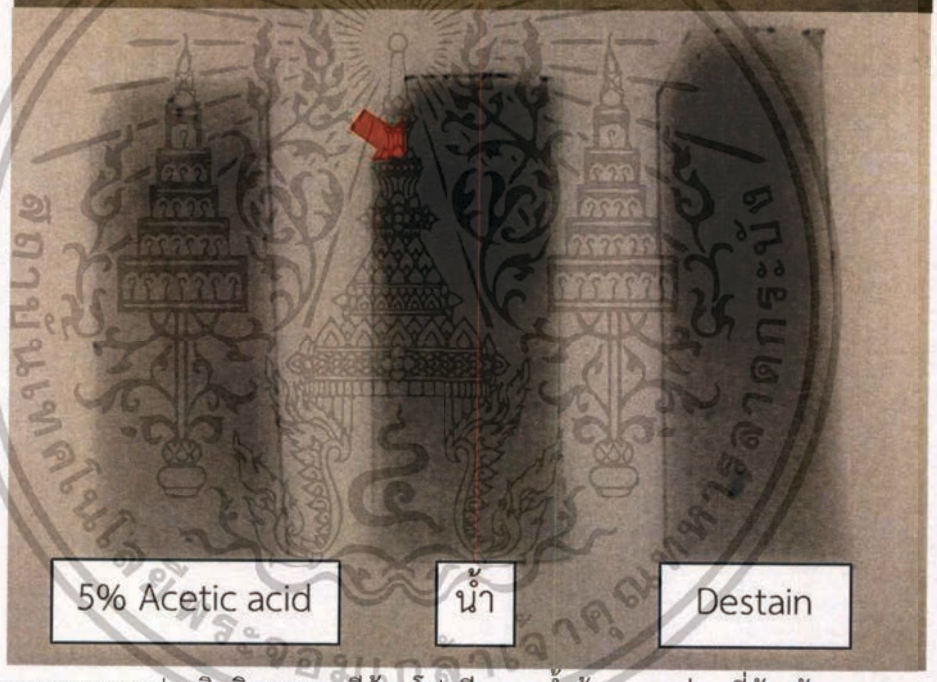
รูปที่ 4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปที่ล้างด้วย 5% Acetic acid, น้ำ และ Destain ตามลำดับ รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.



ข.



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมลูกหม่อนที่ล้างด้วย 5% Acetic acid, น้ำ และ Destain ตามลำดับ รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.)

ผลการทดลองพบว่า น้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปและน้ำย้อมลูกหม่อนที่ล้างด้วยน้ำให้ผลดีที่สุดเมื่อเทียบกับ 5% Acetic acid และ Destain มีความเป็นไปได้ว่าน้ำไม่มีส่วนผสมของกรดที่มีผลทำให้สีหลุดจากแถบโปรตีนเนื่องจากกรดมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อนมากกว่าโปรตีน จึงทำให้สีย้อมหลุดออกจากแถบโปรตีน ไม่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนได้อย่างชัดเจน

ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำในการล้างเจลโปรตีน เพื่อไปทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนโดยกำหนดความเข้มข้นของโปรตีนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

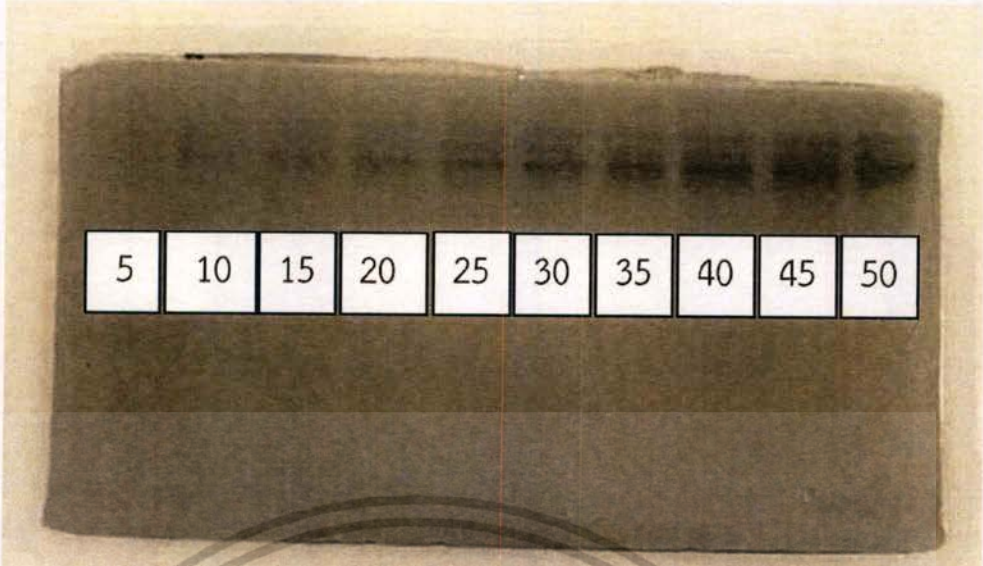
4.6 ผลของความเข้มข้นโปรตีนต่อการติดสีของโปรตีน

การทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนใน SDS-PAGE จากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปและน้ำย้อมลูกหม่อนซึ่งกำหนดความเข้มข้นของโปรตีน คือ 5 ไมโครกรัม ถึง 50 ไมโครกรัม โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือและถ่ายด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล พร้อมมีการปรับแสงของรูปให้เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ

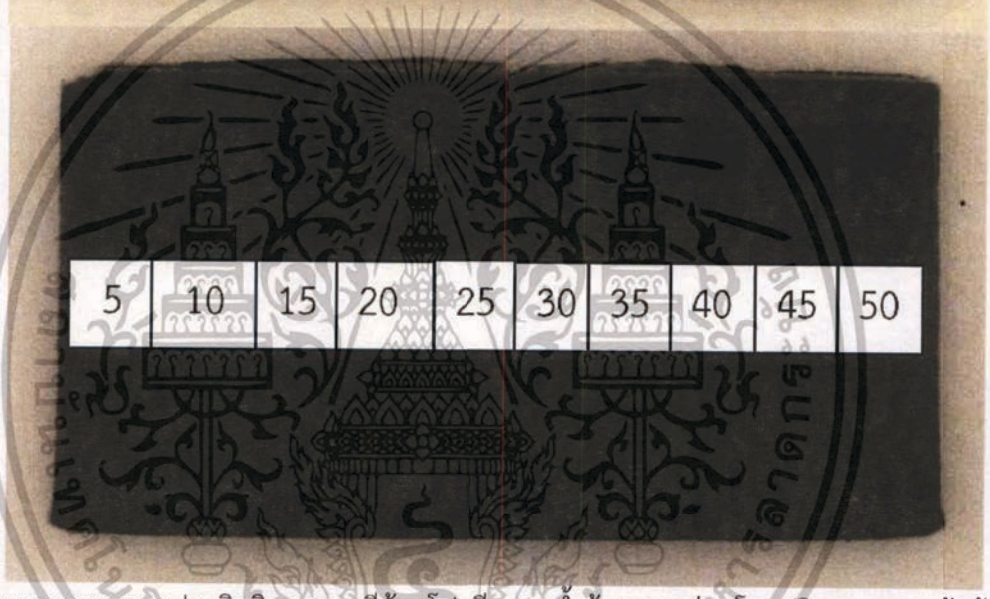
รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปโดยปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนคือ 5 ไมโครกรัม ถึง 50 ไมโครกรัม ตามลำดับ รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.) ตัวเลขที่ปรากฏ คือ ปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.



ข.



รูปที่ 4.9 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสีย้อมโปรตีนจากน้ำย้อมลูกหม่อนโดยปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนคือ 5 ไมโครกรัม ถึง 50 ไมโครกรัม ตามลำดับ รูปจากการถ่ายด้วยโทรศัพท์มือถือ (ก.) และรูปจากเครื่องถ่ายภาพเจล (ข.) ตัวเลขที่ปรากฏ คือ ปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัม

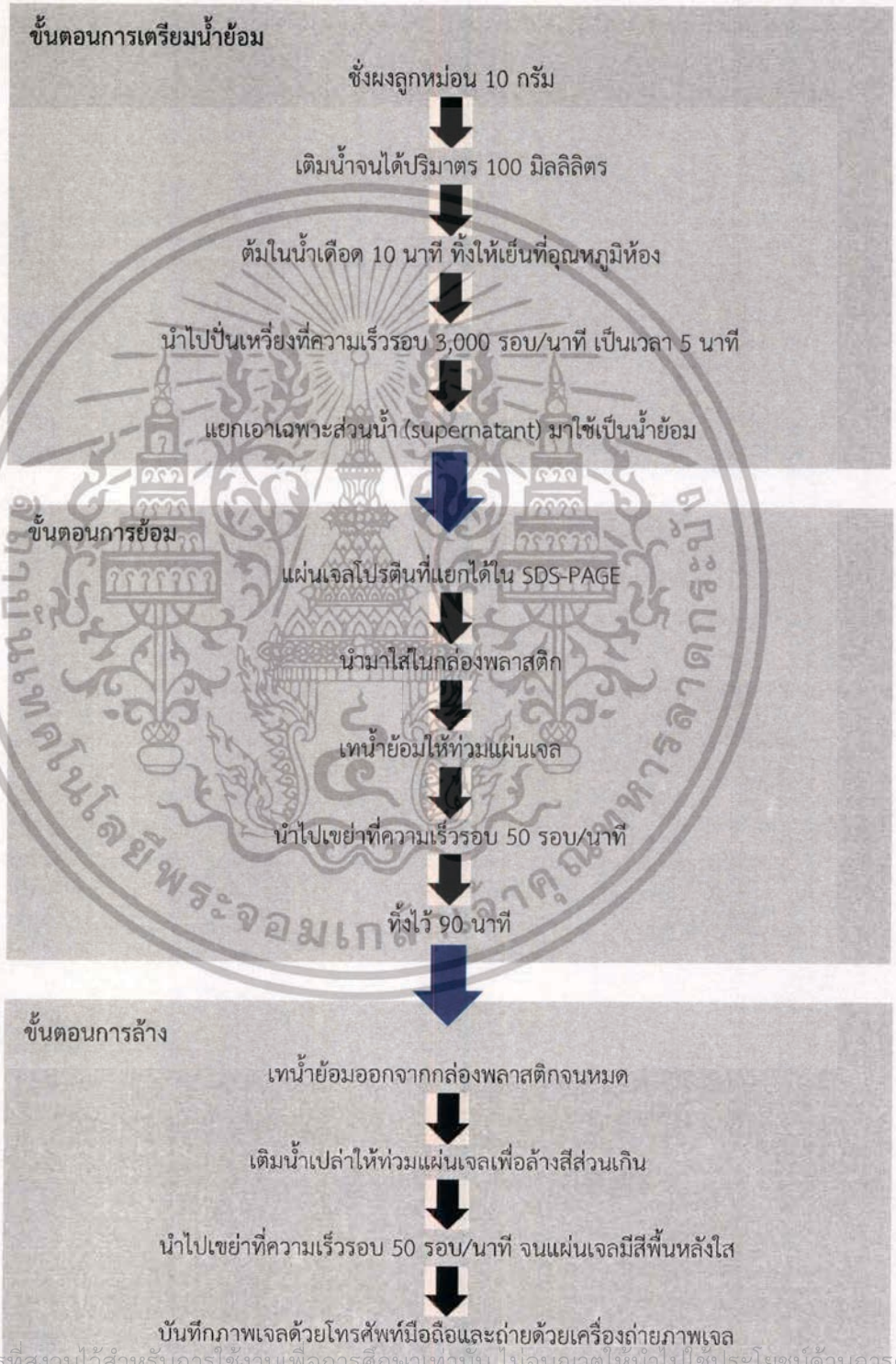
ผลการทดลองพบว่า น้ำย้อมขมิ้นสำเร็จรูปที่ปริมาณโปรตีน 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม ไม่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนได้ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 25 ไมโครกรัมขึ้นไปสามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนได้อย่างชัดเจน ในขณะที่น้ำย้อมลูกหม่อนสามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนได้อย่างชัดเจนตั้งแต่ 5 ไมโครกรัม

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ขมิ้นสำเร็จรูปมีความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนเท่ากับ 25 ไมโครกรัม ในขณะที่ลูกหม่อนมีความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนเท่ากับ 5 ไมโครกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 สรุปวิธีการย้อมโปรตีนจากลูกหม่อน

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า ลูกหม่อนเป็นน้ำย้อมโปรตีนที่ดีที่สุด โดยใช้เวลาในการย้อม 90 นาที, ใช้น้ำย้อมความเข้มข้นร้อยละ 20, ใช้น้ำในการล้างเจลโปรตีน และใช้ความเข้มข้นของโปรตีน 5 ไมโครกรัม จึงทำให้สามารถเขียนสรุปวิธีการย้อมโปรตีนด้วยลูกหม่อนได้ตามแผนผังดังต่อไปนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ย้อมโปรตีน

ในปัจจุบันมีการย้อมโปรตีนหลากหลายวิธี โดยวิธีที่เลือกมาทำการเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้ คือ Silver Staining, SYPRO Orange และ Coomassie brilliant blue เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ย้อมโปรตีนกับความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีน

วิธีที่ใช้ย้อมโปรตีน	Sensitivity (Detection limit)	References
Silver Staining	0.005 ไมโครกรัม	Holger Bartsch และคณะ, Switzer RC และคณะ
SYPRO Orange	0.03 ไมโครกรัม	Holger Bartsch และคณะ
Coomassie brilliant blue	0.02 ไมโครกรัม	Holger Bartsch และคณะ
ขมิ้นสำเร็จรูป	25 ไมโครกรัม	การศึกษาครั้งนี้
ลูกหม่อน	5 ไมโครกรัม	การศึกษาครั้งนี้

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีวัสดุธรรมชาติอย่างน้อย 2 ชนิดที่สามารถย้อมติดสีโปรตีนได้ ได้แก่ ขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อน อย่างไรก็ตามลูกหม่อนมีความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนมากกว่าขมิ้นสำเร็จรูปถึง 5 เท่า ดังนั้นผู้วิจัยไม่แนะนำให้ใช้ขมิ้นสำเร็จรูปในการติดตามโปรตีน

ลูกหม่อนมีความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนที่ 5 ไมโครกรัม ในขณะที่ Silver Staining, SYPRO Orange และ Coomassie brilliant blue มีความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนที่ 0.005, 0.03 และ 0.02 ไมโครกรัม ตามลำดับ แสดงว่าลูกหม่อนมีความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนต่ำกว่า Silver Staining, SYPRO Orange และ Coomassie brilliant blue 1,000, 167 และ 250 เท่า ตามลำดับ จำนวนแถบโปรตีนของลูกหม่อนคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแถบโปรตีนของ Coomassie brilliant blue ถึงแม้ว่าความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนของลูกหม่อนจะต่ำกว่า 3 วิธีข้างต้น แต่ผู้วิจัยแนะนำให้ใช้ลูกหม่อนเป็นตัวเบื้องต้นในการเริ่มติดตามโปรตีนเนื่องจากเป็นวัสดุธรรมชาติ ราคาถูกและไม่ยุ่งยากในการเตรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดลองนี้เป็นการพัฒนาสีย้อมโปรตีนโดยเลือกใช้สีจากวัสดุธรรมชาติ ซึ่งวัสดุธรรมชาติที่เลือกมานั้นมีมากมายแต่ที่ให้ผลในการย้อมโปรตีนเป็นผลสำเร็จ คือ ผงขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อน ซึ่งจากการทำการทดลองได้ทดสอบเวลาในการย้อม พบว่าผงขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อนย้อมติดสีโปรตีนที่ข้ามคืนและ 90 นาที ตามลำดับ จากนั้นพบว่าความเข้มข้นน้ำย้อมของทั้งผงขมิ้นสำเร็จรูปและลูกหม่อน คือ 20 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของน้ำล้างที่ใช้ล้างสีย้อมส่วนเกิน พบว่า การใช้น้ำดีที่สุด และสุดท้ายพบว่าความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีนของผงขมิ้นสำเร็จรูป คิดเป็น 25 ไมโครกรัม ในขณะที่ลูกหม่อนคิดเป็น 5 ไมโครกรัม จึงแนะนำให้ใช้ลูกหม่อนในการติดตามโปรตีน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. สามารถทดลองลดปริมาณโปรตีนในการย้อมด้วยลูกหม่อนเพื่อดูความว่องไวในการย้อมติดสีโปรตีน
2. สามารถทดลองเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนกับโปรตีนชนิดอื่นในการย้อมด้วยลูกหม่อน
3. สำหรับการย้อมด้วยลูกหม่อนสามารถทดลองทำการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ให้ได้เม็ดสีของลูกหม่อนเพียงอย่างเดียว เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย้อมติดสีโปรตีน
4. สามารถทดลองปรับสภาวะในการย้อม เช่น ปรับอุณหภูมิในการย้อม จำนวนครั้งในการล้างน้ำย้อม เพื่อพัฒนาผลการทดลองให้มีความหลากหลายและเพื่อการติดสีโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

"การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE..." ค้นเมื่อ 13 พฤษภาคม 2562, จาก http://digi.library.tu.ac.th/thesis/st/0328/11CHAPTER_3.pdf

กองบรรณาธิการเว็บซีดไลน์. (ม.ป.ป.). ข้อมูลเกี่ยวกับข้าวโพด. ค้นเมื่อ 14 พฤษภาคม 2562,จาก http://www.seedline.co.th/index.php/th/knowledge/29-corn-anti-cancer.html

กองบรรณาธิการเว็บพืชเกษตร. 2014. ข้อมูลเกี่ยวกับมังคุด. ค้นเมื่อ 15 พฤษภาคม 2562, จาก https://puechkaset.com

กองบรรณาธิการเว็บเมดไทย. (ม.ป.ป.). ข้อมูลเกี่ยวกับบีทรูท, ทับทิม, และอัญชัน. ค้นเมื่อ 14 พฤษภาคม 2562, จาก https://medthai.com

พัฒน์ สุขมี, กาญจนา พลนอก, ภานรินทร์ มะลิผล, พนิดา อากาศวิภาต, พิสุทธิ์พร คงสาโรจน์ และทิพรัตน์ ฟู. (ม.ป.ป.). โครงสร้างของกรดแอมิโนและโปรตีน. ค้นเมื่อ 13 พฤษภาคม 2562, จาก https://sites.google.com/site/foodat23/portin-protein/krd-xa-mi-no

ฐานข้อมูลสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. "หม่อน". ค้นเมื่อ 13 พฤษภาคม 2562 จาก www.phargarden.com.

ธนากร บุญเกิด, วันวิสา พิลึก, และนิรัชชา ไชยสมบูรณ์ (ม.ป.ป.). คุณสมบัติของเครื่องถ่ายภาพเจล. ค้นเมื่อ 13 พฤษภาคม 2562, จาก http://www.dent.nu.ac.th/research_units/word/Molec_DT1330_Gel_Documentation_47.htm

ปิ่นปินันท์ มะลัยแก้ว. 2553. การตัดโปรตีนเอวิดีน และสเตรปตาวิดินด้วยอนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่โดยการกระตุ้นด้วยแสง. ปริญญานิพนธ์ วท.ม.(เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิญญา ชัยวิสุทธางกูร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรยุทธ ลิ้วพรเจริญวงศ์

ผศ.ดร.สัญชัย พยงภร. (ม.ป.ป.). เทคนิคทางชีวเคมีขั้นพื้นฐานในเซลล์ชีววิทยา. ค้นเมื่อ 13พฤษภาคม 2562, จาก http://biochem.md.chula.ac.th/Data/PDF%20files/Basic%20Biochemical%20Techniques%20in%20Cell%20Biology-2012.pdf

รศ.ดร. อาภัสสรา ชูเทศะ, นายสมหมาย หอมสวาท, ผศ.ดร.น.สพ. จตุพร หนูสุด คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สาธิตการทำ SDS-PAGE. ค้นเมื่อ 31 พฤษภาคม 2562, จาก http://physio.vet.ku.ac.th/course/SDS%20page_3.pdf

"ส่วนประกอบของ SDS-PAGE..." ค้นเมื่อ 31 พฤษภาคม 2562, จาก http://www.bio-rad.com/en-us/product/mini-protean-tetra-handcast-systems?ID=N3F2W9KG4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beow Keat Yap and Lay-Harn Gam. 2019. "Differentiation of bovine from porcine gelatin capsules using gel electrophoresis method". *Food Chemistry*. 274, 16-19

Bio-Rad Laboratories Ltd. (ม.ป.ป.). เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel Documentation). ค้นเมื่อ 13 พฤษภาคม 2562, จาก http://www.bio-rad.com/en-th/product/gel-doc-ez-gel-documentation-system?source_wt=geldocez_surl&ID=O4950KKG4

Chuanguang Qin, Yang Li, Weining Niu, Yan Ding, Ruijie Zhang and Xiaoya Shang. 2010. "Analysis and Characterization of Anthocyanins in Mulberry Fruit". *Food science*. 28, 117-126.

Francois Chevalier. 2010. " Standard Dyes for Total Protein Staining in Gel-Based Proteomic Analysis". *Materials*. 3, 4784-4792.

Gilani AH1, Shah AJ, Ghayur MN, and Majeed K. 2005. "Pharmacological basis for the use of turmeric in gastrointestinal and respiratory disorders." Life Sciences. 76, 3089- 3105

JayaPrada Rao Chunduri and Harsha Mota. 2015. "Aqueous phytal extracts as source for staining in gel-based protein techniques". *Anal of Applied Bio sciences*. 2, 28-35.

Lianzhou Jiang, Yingjie Liu, Liang Li, Baokun Qi, Mengnan Ju, Yue Xu, Yan Zhang and Xiaonan Sui. 2019. " Covalent conjugates of anthocyanins to soy protein: Unravelling their structure features and in vitro gastrointestinal digestion fate". *Food Research International*. 120, 603-609.

M. Cousins 2007. "Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric (Curcuma longa L.) grown in vitro." Industrial Crops and Products. 25, 129-135.

Michael Van Dyke. 2017. Department of Chemistry and Biochemistry, Kennesaw State University. ค้นเมื่อ 31 พฤษภาคม 2562, จาก https://www.protocols.io/view/dna - analysis-by-native-polyacrylamide-gel-electrop-mcyc2xw

Paul M. Rose, Victoria Cantrill, Meryem Benohoud, Alenka Tidder, Christopher M. Rayner and Richard S. Blackburn. 2018. "Application of Anthocyanins from Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Waste as Renewable Hair Dyes". *Journal of agricultural and food chemistry*. 66, 6790-6798.

Paulina Ongkowijoyo, Diego A, Luna-Vital and Elvira Gonzales de Mejia. 2018. "Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food source by mass spectrometry: An update". *Food Chemistry*. 250, 113-126.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R. Siva, Githin J.Mathew, Abhishek Venkat and Chetan Dhawan. 2008. "An alternative tracking dye for gel electrophoresis". *Current science*. 94, 765-767.

R. Syafinar, N. Gomesh, M. Irwanto, M. Fareq and Y.M. Irwan. 2015. "Potential of Purple Cabbage, Coffee, Blueberry and Turmeric as Nature Based Dyes for Dyes Sensitized Solar Cell(DSSC)". *Energy Procedia*. 79, 799-807.

S.M. Saeem, S.Umer, S.Sayeed and Rashida. 2010. "Food colour interactions and its application in rapid protein assay". *Food Protein*. 28, 506-513.

Sezai Ercisli and Emine Orhan. 2007. "Chemical composition of white (*Morus alba*), red (Morus rubra) and black (Morus nigra) mulberry fruits". Food Chemistry. 103, 1380-1384.

Shen Luo, Nancy B. Wehr and Rodney L. Levine. 2006. "Quantitation of protein on gels and blots by infrared fluorescence of Coomassie blue and Fast Green". *Analytical Biochemistry*. 350, 233-238.

Sunshine Market Co., Ltd. 2019. รูปภาพบีทรูท. ค้นเมื่อ 13 พฤษภาคม 2562, จาก http://sunshinemarket.co.th/wp/index.php/product/organic-beetroot- powder-100g/

Tom Schell. 2018. ข้อมูลทั่วไปของขมิ้นชัน. ค้นเมื่อ 13 พฤษภาคม 2562, จาก https://nouvelleresearch.com/index.php/articles/6261-understanding-curcumin-and-impact-for-your-horse

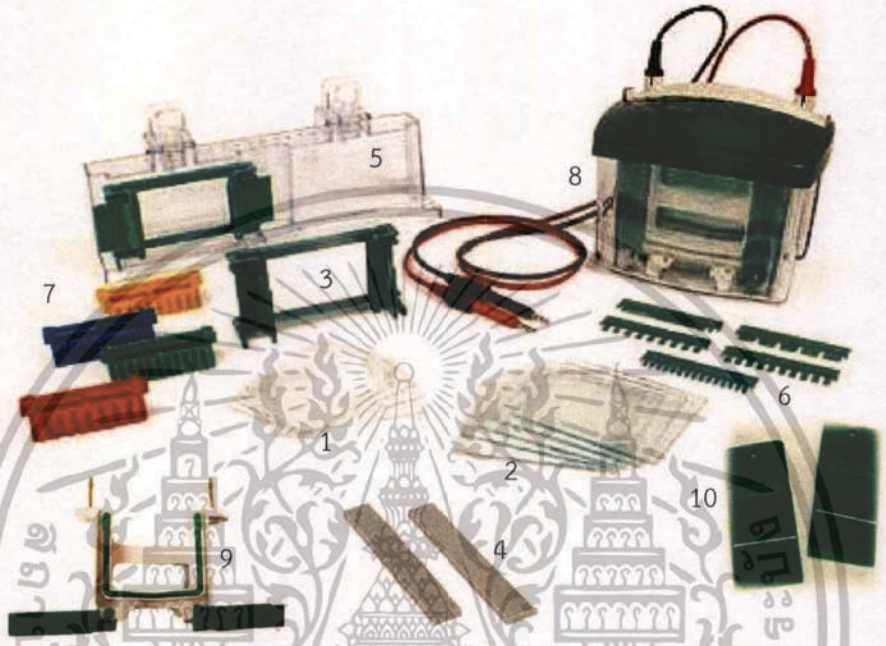
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. ส่วนประกอบของอุปกรณ์ SDS-PAGE



รูปที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆ ของอุปกรณ์ SDS-PAGE

จากรูปที่ 1 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ของอุปกรณ์ SDS-PAGE ซึ่งแสดงเป็นหมายเลขเพื่อบ่งบอกได้ ดังนี้

หมายเลข 1 คือ Glass plate กระจกแบบสั้น

หมายเลข 2 คือ Glass plate กระจกแบบยาว

หมายเลข 3 คือ Casting frames

หมายเลข 4 คือ Gray gaskets

หมายเลข 5 คือ Casting stand

หมายเลข 6 คือ Combs

หมายเลข 7 คือ Sample loading guides

หมายเลข 8 คือ Chamber

หมายเลข 9 คือ Clamping frames

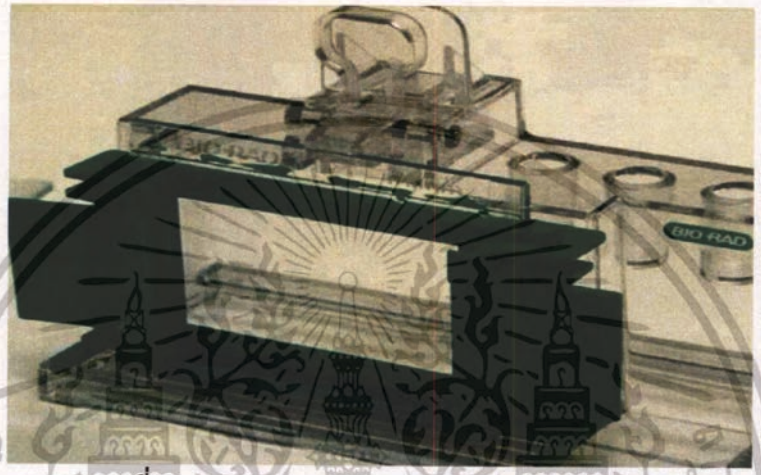
หมายเลข 10 คือ Gels releaser

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมเจล

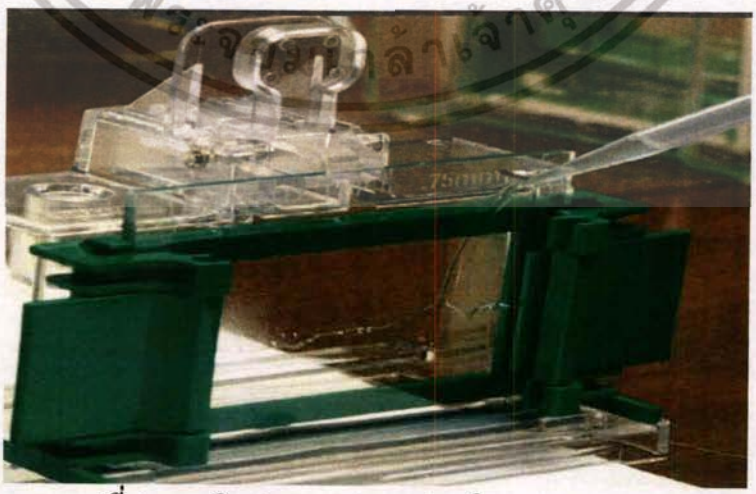
2.1 เตรียมสารสำหรับ Separating gel และ Stacking gel แยกใส่บีกเกอร์

2.2 ประกอบอุปกรณ์ SDS-PAGE โดยการนำกระจกแบบสั้นและแบบยาวประกบคู่กัน (gel sandwich) โดยกระจกแบบสั้นอยู่ด้านหน้าแล้ววางลงใน Casting frames ให้ปลายกระจกทั้งสองแผ่นเสมอกันแล้วค่อยๆกดล็อคกระจก จากนั้นนำไปวางบน Casting stand โดยมี Gray gaskets รองอยู่ด้านล่าง แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การประกอบกระจกวางบน Casting stand

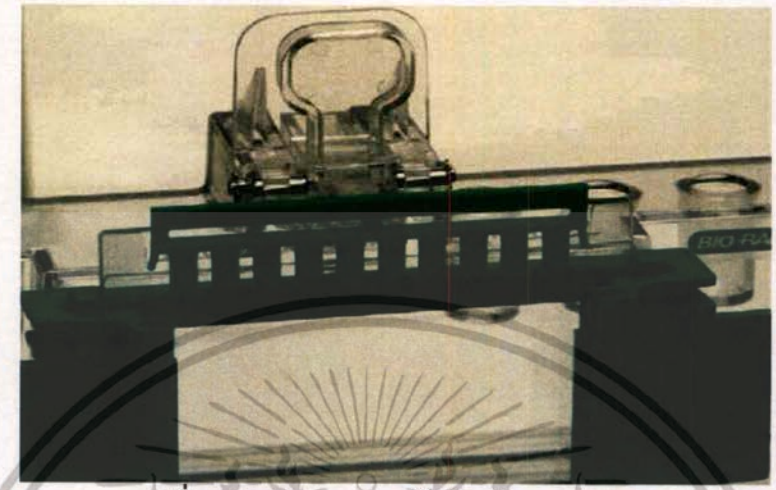
2.3 ใช้ไมโครปิเปตค่อยๆเติม Separating gel ลงใน gel sandwich เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ ให้ได้ประมาณ ¾ ส่วนของกระจก แสดงดังรูปที่ 3 จากนั้นเททับผิวหน้าเจลด้วย 50% Isopropanol แล้วรอประมาณ 30 นาที เพื่อให้ส่วน Separating gel แข็งตัว เมื่อครบเวลาเท Isopropanol พร้อมกับฉีดน้ำกลั่นล้าง Isopropanol ออกให้หมดและซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่



รูปที่ 3 การเติม Separating gel ลงใน gel sandwich

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ใช้ไมโครปิเปตเติม Stacking gel ลงในพื้นที่ที่เหลือแล้วนำ comb มาใส่ช่องว่างของกระจก แสดงดังรูปที่ 4 รอประมาณ 30 นาที เพื่อให้ส่วนของ Stacking gel แข็งตัว



รูปที่ 4 การนำ comb มาใส่ช่องว่างของกระจก

2.5 เมื่อครบเวลานำ comb ออกจากช่องว่างของกระจกและถอดเอากระจกทั้งสองออกจาก Casting frames จากนั้นประกอบเข้ากันโดยหันด้านกระจกแบบสั้นเข้าหากันเข้าทางด้านในของ Clamping frames แสดงดังรูปที่ 5 เมื่อประกอบเรียบร้อยนำไปใส่ใน chamber เตรียมการรันโปรตีนเพื่อการแยกโปรตีน

รูปที่ 5 การประกอบเข้าหากันของกระจกที่ Clamping frames

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

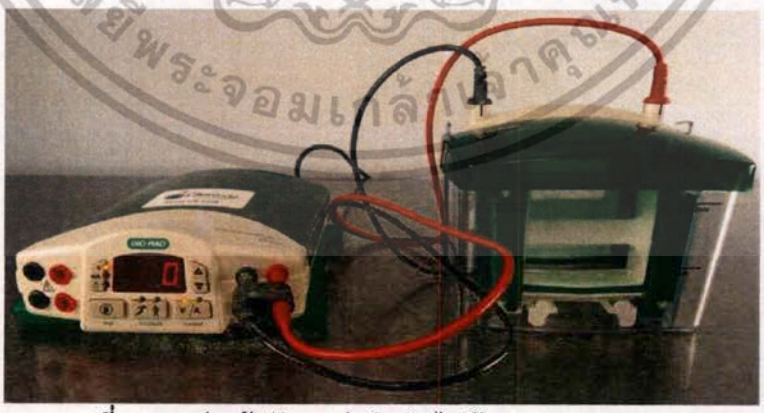
ภาคผนวก ข

1. การแยกโปรตีน

1.1 หลังจากขั้นตอนการเตรียมเจล เมื่อใส่ใน chamber แล้วจึงเท Running buffer จากนั้นทำการโหลดน้ำโปรตีนมาตรฐานลงใน well 15 ไมโครลิตร ด้วยไมโครปิเปต โดยใช้ Sample loading guides เป็นตัวช่วยในการโหลดโปรตีน แสดงดังรูปที่ 6

รูปที่ 6 การใช้ Sample loading guides

1.2 เมื่อโหลดโปรตีนเสร็จนำ Sample loading guides ออกและปิดฝา chamber ให้แน่น จากนั้นต่อเข้ากับแหล่งกำเนิดไฟฟ้า (power supply) โดยใช้ความต่างศักย์ 150 โวลต์ นาน 60 – 90 นาที แสดงดังรูปที่ 7 เพื่อทำการรันโปรตีน



รูปที่ 7 การต่อเข้ากับแหล่งกำเนิดไฟฟ้า (power supply)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เมื่อรันโปรตีนเสร็จ สังเกตเมื่อโปรตีนเคลื่อนที่ลงมาจนสุดแผ่นเจลแล้ว ให้ปิดเครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าแล้วนำแผ่นเจลออกมา จากนั้นจึงนำแผ่นเจลออกมา โดยใช้ Spacer เป็นตัวดันกระจกออกจากกัน ตัดส่วน Stacking gel ทิ้งแล้วค่อยๆลอกส่วน Separating gel ออก หลังจากนั้นนำเจลที่ได้ใส่ลงในกล่องพลาสติกเพื่อทำการย้อมโปรตีนต่อไป แสดงดังรูปที่ 8

รูปที่ 8 การตัดส่วน Stacking gel ส่วน Separating gel ใส่กล่องพลาสติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้