การหาสภาวะที่เหมาะสมในการการผลิต Prestained Protein ด้วยสีย้อม Remazol

Optimization of Prestained Protein production using Remazol reactive dye

นางสาวรัชนก คำลุน

นางสาวศุภรดา ปั้นมยุรา

นายสิทธนัส ฉั่วสวัสดิ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการการผลิต Prestained Protein ด้วยสีย้อม Remazol

Optimization of Prestained Protein production using Remazol reactive dye

นางสาวรัชนก คำลุน

นางสาวศุภรดา ปั้นมยุรา

นายสิทธนัส ฉั่วสวัสดิ์

TB000160
b.00265026
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Optimization of Prestained Protein production using Remazol reactive dye

Miss Ratchanok Kumloon

Miss Suparada Panmayura

Mr. Sitthanus Chuasawad

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการการผลิต Prestained Protein ด้วยสีย้อม Remazol

Optimization of Prestained Protein production using Remazol reactive dye

ชื่อนักศึกษา นางสาวรัชนก คำลุน รหัสนักศึกษา 55050981

นางสาวศุภรดา ปั้นมยุรา รหัสนักศึกษา 55051010

นายสิทธนัส ฉั่วสวัสดิ์ รหัสนักศึกษา 55051018

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ประธานกรรมการ	
ดร.ศิริขวัญ พลประทีป กรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการการผลิต Prestained Protein ด้วยสีย้อม Remazol
ชื่อนักศึกษา	นางสาว รัชนก คำลุน รหัสนักศึกษา 55050981
	นางสาว ศุภรดา ปั้นมยุรา รหัสนักศึกษา 55051010
	นาย สิทธนัส ฉั่วสวัสดิ์ รหัสนักศึกษา 55051018
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมีสิ่งแวดล้อม
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

โปรตีนเป็นมหโมเลกุล (Macromolecule) ที่พบมากที่สุดในสิ่งมีชีวิต โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะไม่ปรากฏสี การย้อมสีโปรตีน (Prestained Protein) เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ติดตามหาตำแหน่งของโปรตีนเพื่อใช้ในการตรวจสอบขนาดและชนิดของโปรตีน นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในทางการค้าด้วยวิธีการทำเป็นโปรตีนมาตรฐาน ที่เรียกว่า Prestained Protein Marker คือ โปรตีนติดสีขนาดต่างๆที่ทราบขนาดแน่นอนแล้ว ในโครงงานนี้ได้ผลิต Prestained Protein โดยใช้โปรตีน 2 ชนิด คือ Ovalbumin และ Bovine Serum Albumin (BSA) ที่มีขนาด 45 kDa และ 66 kDa ตามลำดับ ในส่วนสีที่ใช้ย้อมโปรตีนคือ สี Remazol Brilliant Blue R ใช้เทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 12% polyacrylamide gel ในการตรวจสอบผลเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ปัจจัยที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ ขนาดของแถบโปรตีน และความเข้มของสีย้อมที่ติดกับโปรตีน ในการทดลองได้ทำการศึกษา ความเข้มข้นของโปรตีน ความเข้มข้นของสีย้อม ระยะเวลาในการต้มโปรตีน ระยะเวลาในการบ่ม ผลจากการเติมสารละลาย Lysine, DTT และ Loading Buffer จากการทดลองพบว่า การผสมอัตราส่วนของโปรตีนต่อสีย้อมโดยมวลเป็น 1:3 การต้มโปรตีนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที การใช้ระยะเวลาการบ่ม 16 ชม.ขึ้นไป (Overnight) การเติม Lysine และการใส่ Loading Buffer ทำให้ผลที่ได้ใกล้เคียงกับโปรตีนมาตรฐาน

คำสำคัญ : Prestained Protein, SDS-PAGE, Remazol Brilliant Blue R, Lysine, DTT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Optimization of Prestained Protein production using Remazol reactive dye
Student	Miss Ratchanok Kumloon Student ID 55050981
	Miss Suparada Panmayura Student ID 55051010
	Mr. Sitthanus Chuasawad Student ID 55051018
Degree	Bachelor of Science Environmental Chemistry
Department	Chemistry
Academic Year	2015
Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn

ABSTRACT

Protein is macromolecule that the most found in organism. Generally of protein doesn't appear color. Prestained protein is one of method to check size and type of protein. In this project, Prestained protein production use two types of protein is Ovalbumin and Bovine Serum Albumin (BSA) that size 45 kDa and 66 kDa respectively. The dye used to staining protein is Remazol Brilliant Blue R. Using Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis technique (SDS-PAGE) with 12% polyacrylamide gel to check the result with protein standard. The factor use to compare with protein standard is size of protein and intensity of protein. In the experiments were studied concentration of protein, concentration of dye, boiling time of protein, incubation period, effect of lysine, DTT and loading buffer. The results showed mixed ratio protein per color by mass 1: 3, boiling temperature 95 C for 3 minutes, incubation over 16 hours (Overnight), addition lysine and loading buffer were similar to protein standard.

Keywords : Prestained Protein, SDS-PAGE, Remazol Brilliant Blue R, Lysine, DTT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการทำโครงงานพิเศษนี้จนประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป และ ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตนรุ่งโรจน์ ที่ให้คำแนะนำและเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทห้องปฏิบัติการชีวเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี สถานที่และคำแนะนำต่างๆตลอดการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการชีวเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้อนุเคราะห์ เครื่องมือและสารเคมีในการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำโครงงานพิเศษ

รัชนก คำลุน

ศุภรดา ปั้นมยุรา

สิทธนัส ฉั่วสวัสดิ์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญรูปภาพ ..... ช

คำย่อและสัญลักษณ์ ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 สมมติฐานการวิจัย 3

1.4 ขอบเขตการวิจัย 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดอะมิโน 5

2.2 โปรตีน 7

2.2.1 ลักษณะของโปรตีน 7

2.2.2 โครงสร้างของโปรตีน 7

2.2.3 คุณสมบัติการละลายของโปรตีน 9

2.2.4 Ovalbumin 11

2.2.5 Bovine Serum Albumin (BSA) 11

2.3 สีย้อม (Reactive Dyes) 11

2.3.1 Remazol Brilliant Blue R 12

2.4 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (Gel Electrophoresis) 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.1 โพลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟริซิส (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) 12

2.5 แถบโปรตีนมาตรฐาน 14

2.5.1 Unstained Protein Marker 14

2.5.2 Prestained Protein Marker 14

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ 16

3.2 สารเคมี 17

3.3 ขั้นตอนการทดลอง 18

3.3.1 การเตรียม Stained Protein 18

3.3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE 23

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การตรวจสอบ Stained-protein ด้วยวิธี SDS-PAGE 26

4.2 ตารางผลการทดลอง 39

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง 43

5.2 วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 43

เอกสารอ้างอิง 44

ภาคผนวก 46

ภาคผนวก ก 47

ภาคผนวก ข 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.3.1 อัตราส่วนการผสม Stained Protein 19
3.3.2 อัตราส่วน loading dye 20
3.3.3 อัตราส่วนการผสม Stained Protein 22
3.3.4 อัตราส่วน loading dye 22
3.3.5 สารผสมการทำอะคิลาไมด์เจล 12% 24
3.3.6 การเตรียม 5% stacking gels for Tris-glysine SDS-PAGE 25
4.2 ตารางผลการทดลอง 39
ข-1 ตารางสัดส่วนการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล 49
ข-2 ตารางการเตรียม 5% stacking gels for Tris-glysine SDS-PAGE 50

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 โครงสร้างระดับพื้นฐานของโปรตีน	1
1.2 ชนิดของ Prestained Protein Marker	2
2.1 โครงสร้างกรดอะมิโน	5
2.2 โครงสร้างของกรดอะมิโน 20 ชนิด	6
2.3 โครงสร้างของกรดอะมิโนชนิดดีและกรดอะมิโนชนิดแอล	6
2.4 พันธะเพปไทด์และโมเลกุลของโปรตีนที่เกิดจากกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน	7
2.5 โครงสร้างโปรตีน	8
2.6 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน	9
2.7 การละลายน้ำของโปรตีนที่ pH ต่างกัน	10
2.8 การเติมเกลือ ในสารละลายโปรตีน	10
2.9 การทำปฏิกิริยาของสีย้อม Uniblue A กับโปรตีน	11
2.10 สูตรโครงสร้าง Remazol Brilliant R	12
2.11 การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน	13
2.12 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	13
2.13 การติดสีของโปรตีนระหว่าง Prestained Protein กับ Unstained Protein	14
3.1 แผนผังการทำการทดลองในแบบที่ 1	18
3.2 แผนผังการทำการทดลองในแบบที่ 2	21
3.3 การทำงานของเครื่อง SDS-PAGE	23
3.4 Mini Tank และ Power Supply	24
3.5 แถบโปรตีนใน SDS-PAGE หลังจากเสร็จสิ้นการแยกขนาดโปรตีน	24
4.1 แสดงแถบโปรตีน Ovalbumin ที่ระดับความเข้มข้นสีต่างๆ	26
4.2 แสดงแถบโปรตีน Ovalbumin ที่ระดับความเข้มข้นสีต่างๆโดยใช้ 5X loading buffer	27
4.3 แสดงแถบโปรตีน Ovalbumin 5 µL โดยใช้ 5X loading buffer ที่ไม่มีการผสมของ Bromophenol blue ที่ระดับความเข้มข้นสีต่างๆ	27
4.4 แสดงแถบโปรตีน BSA และ Ovalbumin โดยใช้ 5X loading buffer	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.5 แสดงแถบโปรตีน BSA และ Ovalbumin โดยใช้ Loading buffer ที่มีส่วนผสมของ Dithiothreitol (DTT) 28

4.6 แสดงแถบโปรตีน BSA ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีเป็น 1:10 29

4.7 แสดงแถบโปรตีน BSA ตามความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีที่ความเข้มข้นสีต่างๆ 30

4.8 แสดงแถบโปรตีน BSA ตามความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีที่ความเข้มข้นสีต่างๆ 30

4.9 แสดงแถบโปรตีน BSA ที่เปรียบเทียบระหว่างทำการบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ มากกว่า 16 ชั่วโมง (overnight) แล้วเติม lysine 31

4.10 แสดงแถบโปรตีน BSA ที่เปรียบเทียบระหว่างการเติม lysine และไม่เติม lysine 32

4.11 แสดงผลการย้อมด้วยสี Coomassie Blue จากรูปที่ 4.10 32

4.12 แสดงแถบโปรตีน BSA ที่มีผลมาจากการเติม DTT ในปริมาตรต่างๆ 33

4.13 แสดงผลการย้อมด้วยสี Coomassie Blue จากรูปที่ 4.12 33

4.14 แสดงแถบของโปรตีน BSA ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีต่างๆ 34

4.15 แสดงแถบของโปรตีน BSA ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีต่างๆ 35

4.16 แสดงแถบของโปรตีน BSA ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีต่างๆ 36

4.17 แสดงแถบของโปรตีน BSA ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีต่างๆ 37

4.18 ผลการ Blotting ของแผ่นเจลในรูป 4.14 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

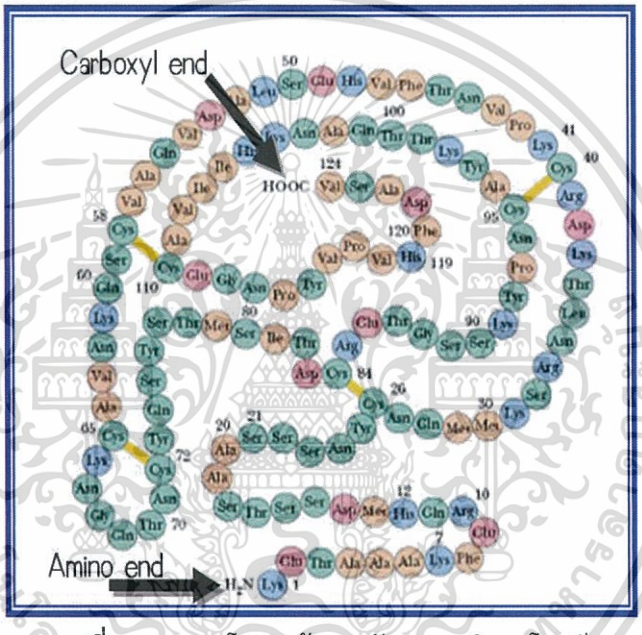
คำย่อ	ความหมาย
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
BSA	Bovine Serum Albumin
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
DTT	Dithiothreitol
TEMED	Tetramethylethylenediamine
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
kDa	กิโลดาลตัน
Conc.	ความเข้มข้น
µg	ไมโครกรัม
µL	ไมโครลิตร
°C	องศาเซลเซียส
mA	มิลลิแอมแปร
Volt	หน่วยของกำลังไฟฟ้า
M	Molar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โปรตีนเป็นมหโมเลกุล[macromolecule]ที่พบมากที่สุดในสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ใช้กรดอะมิโนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีน โดยกรดอะมิโนหลายโมเลกุลยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะเพปไทด์ โปรตีนจึงเป็นสารประเภทพอลิเพปไทด์ที่มีความซับซ้อน และมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (มนตรีและคณะ, 2530) ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 แสดงโครงสร้างระดับปฐมภูมิของโปรตีน

การจัดจำแนกโปรตีนตามตามลักษณะโครงสร้างของสายพอลิเมอร์จำแนกได้ 2 ประเภท

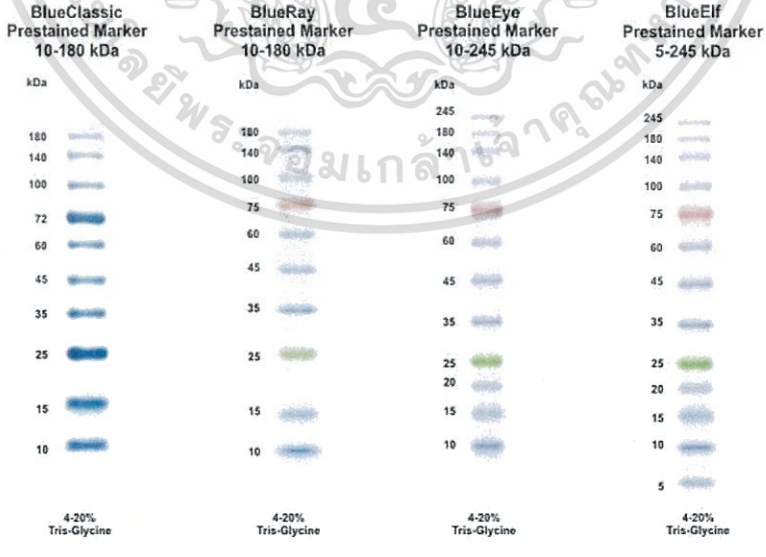
1.โปรตีนเส้นใย (fiber protein) เกิดจากสายพอลิเพปไทด์หลายเส้นเรียงขนานกัน และพันรอบกันเองคล้ายเส้นเชือก ละลายน้ำได้น้อยส่วนใหญ่ ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง เพราะมีความแข็งแรงและยืดหยุ่นสูง ตัวอย่างโปรตีนชนิดนี้ได้แก่ ไฟโบรอินในเส้นไหม อีลาสตินในเอ็น คอลลาเจนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เคราตินในผม ขน เล็บ เป็นต้น

2.โปรตีนก้อนกลม (globular protein) เกิดจากสายพอลิเพปไทด์ม้วนขดพันกันเป็นก้อนกลม ละลายน้ำได้ดี ส่วนใหญ่ทำหน้าที่เกี่ยวกับเมทาบอลิซึมต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ตัวอย่างของโปรตีนก้อนกลม เช่น เอนไซม์ ฮอร์โมนอินซูลิน ฮีโมโกลบิน โกลบูลินในพลาสมา เป็นต้น นอกจากจะแบ่งโปรตีนตามโครงสร้างแล้วยังสามารถแบ่งตามหน้าที่ได้ 6 ประเภท 1.โปรตีนเร่งปฏิกิริยา 2.โปรตีนโครงสร้าง 3.โปรตีนขนส่ง 4.โปรตีนสะสม 5.โปรตีนป้องกัน และ 6.โปรตีนฮอร์โมน (Thaigoodview, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยธรรมชาติของโปรตีนจะไม่ปรากฏสี ทำให้การหาขนาดของโปรตีนทำได้ยาก การย้อมสีโปรตีนเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเพื่อใช้ในการตรวจสอบชนิดของโปรตีนได้ โดยนำโปรตีนที่ติดสีย้อมแล้วไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ electrophoresis และ anionic detergent ชนิดหนึ่งคือ sodium dodecyl sulphate (SDS) เพื่อช่วยหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยนำมาเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (มนตรีและคณะ, 2530) โดยการปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี electrophoresis สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานต่างๆ เช่น การเปรียบเทียบและการวิเคราะห์รูปแบบ (pattern) ของสารตัวอย่างโปรตีนจากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่มาจากแหล่งต่างๆ การตรวจสอบความผิดปกติของโปรตีนที่อาจเกิดจากการผ่าเหล่า (mutation) การแยกและทำให้บริสุทธิ์ การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนทางอิมมูโนวิทยา และการตรวจหาขนาดของโปรตีน (molecular weight) (Gibthai, 2558)

นอกจากการย้อมสีโปรตีนจะสามารถหาน้ำโมเลกุลของโปรตีนได้แล้วยังสามารถนำไปใช้ในทางการค้าด้วยวิธีการทำเป็นโปรตีนมาตรฐานสำหรับการนำไปใช้ในห้องแลปหรือที่เรียกว่า Prestained Protein Marker ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐานที่ผสมกับสีแล้ว[Stained Protein] สามารถนำใช้กับวิธี SDS-PAGE โดยเมื่อ run gel electrophoresis จะสามารถมองเห็นโปรตีนแต่ละขนาดจากสีที่ติดอยู่กับโปรตีน เนื่องจาก Prestained Protein Marker เป็นสินค้าที่มีราคาค่อนข้างสูง ยกตัวอย่างเช่น BlueClassic Prestained Marker 10-180 kDA ปริมาตร 500 µL มีราคาประมาณ 65 ยูโร คิดเป็นเงินไทยประมาณ 2,470 บาท [Blueray Prestained] Marker 10-180 kDA ปริมาตร 500 µL มีราคาประมาณ 85 ยูโร คิดเป็นเงินไทยประมาณ 3,230บาท [BlueeyePrestained Marker 10-245 kDA] ปริมาตร 500 µL มีราคาประมาณ 90 ยูโร คิดเป็นเงินไทยประมาณ 3,420 บาท [Blueelf Prestained Marker 5-245 kDA] ปริมาตร 500 µL มีราคาประมาณ 95 ยูโร คิดเป็นเงินไทยประมาณ 3,610 บาท เป็นต้น [Jenabioscience, 2558] ดังรูป ที่ 1.2



รูปที่ 1.2 แสดงชนิดของ Prestained Protein Marker

ที่มา www.jenabioscience.con

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นถ้าเราสามารถผลิต Prestained Protein Marker ไว้ใช้เองได้ก็จะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และยังสามารถนำไปขายได้อีกด้วย โดยเหตุผลที่ Prestained Protein Marker มีราคาสูงก็เพราะว่า การผลิต Prestained Protein Marker มีความยุ่งยาก เพราะต้องใช้โปรตีนหลายชนิดเป็นโปรตีนมาตรฐาน รวมถึงแถบโปรตีนที่ผสมกับสีต้องมีความคมชัด ซึ่งข้อมูลในการผลิต Prestained Protein Marker ส่วนใหญ่จะเป็นความลับทางการค้า

ในส่วนของสีย้อมที่จะใช้ในการย้อมโปรตีนคือ สีรีแอคทีฟ (reactive dye) เป็นสีย้อมที่สามารถทำปฏิกิริยาเกิดพันธะทางเคมีกับเส้นใยในสภาวะที่เหมาะสมได้ โครงสร้างทางเคมีของสีรีแอคทีฟ ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วน 1.สารที่ทำให้เกิดสี [Coloring substance] หรือกลุ่มเคมีที่มีสี [Chromophore] 2. ส่วนประกอบของไฮดรอกซิลหรืออะมิโนในโมเลกุลของสีเป็นกลุ่มที่ทำปฏิกิริยา [reactive component] โดยคุณสมบัติของสีรีแอคทีฟเป็นสีที่ละลายน้ำได้มีประจุลบ เมื่ออยู่ในน้ำจะมีสมบัติเป็นด่าง ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของโปรตีนที่สามารถละลายในสารละลายเกลือที่เป็นกลางได้ โดยหากเพิ่มความเข้มข้นของเกลืออยู่ในช่วงต่ำ (0-0.1M) จะช่วยให้โปรตีนละลายได้ดีขึ้น ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า salting-in effect กล่าวคือ ไอออนของเกลือช่วยให้กลุ่มที่แตกตัวได้ในโปรตีนคงสภาวะได้ดีขึ้น เพราะไอออนจะเข้าไปล้อมกรดอะมิโนที่มีประจุ และเนื่องจากไอออนมีโมเลกุลของน้ำจับอยู่เสมอ จึงทำให้กลุ่มที่มีประจุของโปรตีนจับกับน้ำได้ดีขึ้น [มนตรีและคณะ, 2530] ซึ่งปฏิกิริยาของโปรตีนและสีจะเกิดขึ้นโดยตำแหน่ง N-terminal ของโปรตีน ซึ่งเป็น primary amine จะสร้างพันธะกับ vinyl sulfone group ของสีย้อม (Mark *et al.*, 2002) มีผลทำให้โปรตีนสามารถผสมเข้ากับสารละลายสีย้อมได้ นอกจากจะดูผลการติดสีของโปรตีนจากวิธี SDS-PAGE แล้ว ยังสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Western Blot ซึ่งเทคนิคการย้ายโปรตีนจากเจลอิเลคโตรฟอเรซิสถ่ายโอนไปยังเมมเบรนโดยโปรตีนที่ติดสีแล้วจะถูกจับและยึดติดอยู่กับเมมเบรน ซึ่งเมมเบรนที่นิยมใช้ได้แก่ Polyvinylidene Difluoride (PVDF) (Gibthai, 2558)

เพื่อที่จะทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ที่สมบูรณ์ระหว่างโปรตีนกับสีย้อม ผู้วิจัยจึงทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมสีของโปรตีน โดยการควบคุมปริมาณสีย้อม อุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่ม รวมถึงตัวทำปฏิกิริยาต่างๆ เพื่อให้สีที่ย้อมกับโปรตีนเกิดการจับตัวกันด้วยพันธะโควาเลนต์ได้ดีที่สุด ซึ่งพันธะมีความแข็งแรง จะทำให้ได้โปรตีนที่ติดสีย้อมแบบสมบูรณ์ มีอายุในการเก็บรักษาได้นานขึ้น และประสิทธิภาพของสียังคงเดิม ไม่เกิดการซีดจางลงของสีที่ย้อมกับโปรตีน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของโปรตีนที่จะติดกับสีย้อมได้ดีที่สุด

1.3 สมมติฐานการวิจัย

โปรตีนสามารถติดกับสีย้อมและแสดงแถบออกมาได้เหมือนกับโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ในทางการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

1. ย้อมสีติดโปรตีน Ovalbumin และ Bovine Serum albumin ด้วยสี Remazol Brilliant Blue R ตรวจสอบโดย SDS-PAGE และ Western Blot

2. ระยะเวลาในการดำเนินการศึกษาตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2558 – 15 พฤศจิกายน 2558

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้โปรตีนที่ติดสีย้อม (Prestained Protein ladder)

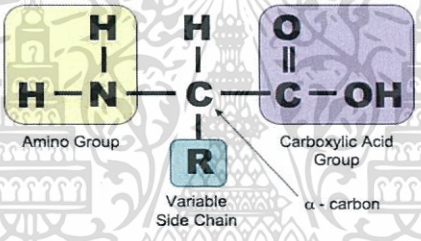
2. สามารถนำโปรตีนที่ติดสีย้อมมาใช้ในการทดลองต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโปรตีน เพื่อให้ง่ายต่อการมองเห็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดอะมิโน (Amino Acid)

กรดอะมิโนเป็นหน่วยโครงสร้าง (building block) ที่เล็กที่สุดของโปรตีนโครงสร้างทางเคมีของกรดอะมิโน ประกอบด้วย 4 ส่วนคือ หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) หมู่อะมิโน (-NH2) หมู่อาร์ (R) หรือหมู่โซ่ข้างและไฮโดรเจนอะตอม (H) โดยที่หมู่คาร์บอกซิลจะแสดงความเป็นกรด หมู่อะมิโนจะแสดงความเป็นด่างและหมู่อาร์จะแสดงถึงความแตกต่างกันของกรดอะมิโนแต่ละชนิด หมู่ต่างๆ เหล่านี้จะเกาะอยู่ที่แขนของคาร์บอน (C) อะตอมเดียวกันเรียกคาร์บอนศูนย์กลางนั้นว่า แอลฟาคาร์บอนอะตอม (α - carbon atom) ดังรูปที่ 2.1

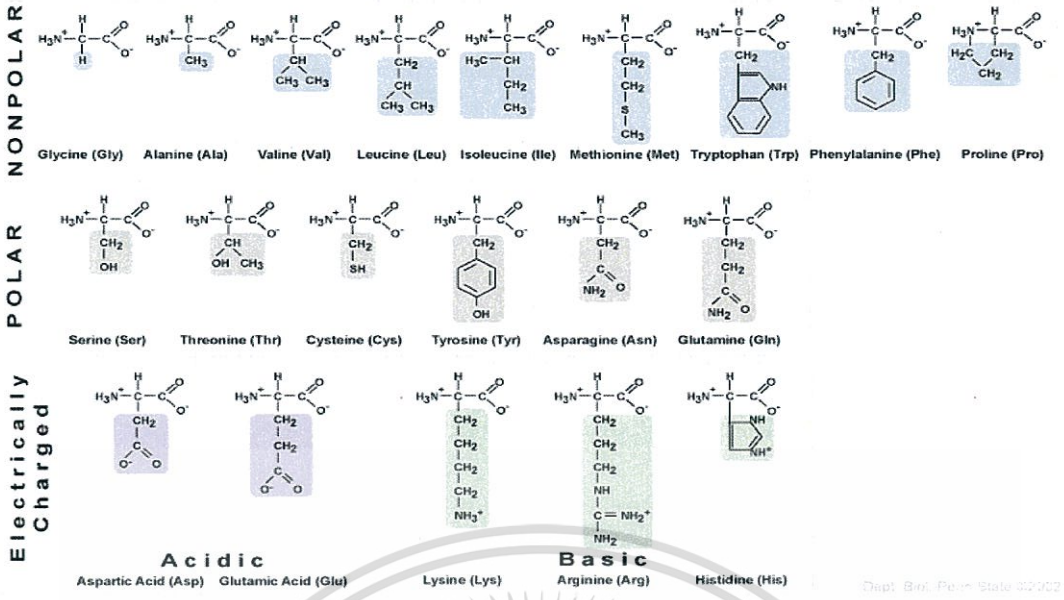


รูปที่ 2.1 โครงสร้างกรดอะมิโน

ที่มา http://study.com/academy/lesson/threonine-amino-acid-structure-function.html

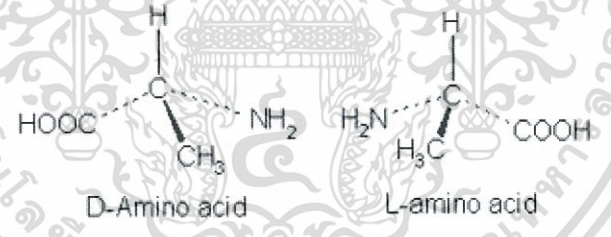
โดยทั่วไปกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนมีทั้งหมด 20 ชนิดดังรูปที่ 2.2 กรดอะมิโนทุกชนิดที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน จึงเป็นกรดอะมิโนชนิดแอลฟา (α - amino acid) หรือเรียกว่า “แอลฟาอะมิโน” และทุกชนิดเป็นกรดอะมิโนชนิดแอลฟา การเกาะกันที่หมู่ต่างๆ ของ α -carbon atom ทำให้กรดอะมิโนชนิดแอลฟาเกิดสเตอริโอไอโซเมอร์ แบบที่เป็นกระจกเงาหรืออีแนนทิโอเมอร์ ได้กรดอะมิโน 2 ชนิด คือ กรดอะมิโนชนิดดี (D-amino acid) และกรดอะมิโนชนิดแอล (L-amino acid) กรดอะมิโนทั้งสองชนิดพบได้ในธรรมชาติ โดยที่ L-amino acid พบมากที่สุดในธรรมชาติ และเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างโปรตีน ส่วน D-amino acid พบได้น้อยโดยพบว่า เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย (Science, 2558) ดังรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของกรดอะมิโน 20 ชนิด

ที่มา http://www.personal.psu.edu



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของกรดอะมิโนชนิดดีและกรดอะมิโนชนิดแอล

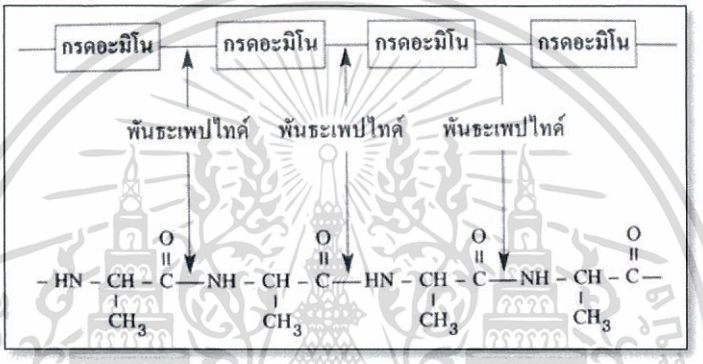
ที่มา https://en.wikibooks.org

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โปรตีน

2.2.1 ลักษณะของโปรตีน

โปรตีน เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สายยาวของกรดอะมิโน (amino acid) โมเลกุลของกรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของโปรตีน ประกอบด้วยธาตุหลักคือ คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และกำมะถัน ภายในโมเลกุลของกรดอะมิโนทุกชนิด มีหมู่อะมิโน (-NH2) และหมู่กรดคาร์บอกซิล (COOH) อย่างละ 1 หมู่ กรดอะมิโนแต่ละชนิดแตกต่างกันที่หมู่ R (side chain) ซึ่งมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันประมาณ 20 ชนิด โมเลกุลของกรดอะมิโน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนท์ ได้เป็นสายยาวของกรด อะมิโน เรียกว่า พอลิเพปไทด์ (polypeptide) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 พันธะเพปไทด์และโมเลกุลของโปรตีนที่เกิดจากกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน

ที่มา http://www.vcharkarn.com

2.2.2 โครงสร้างของโปรตีน

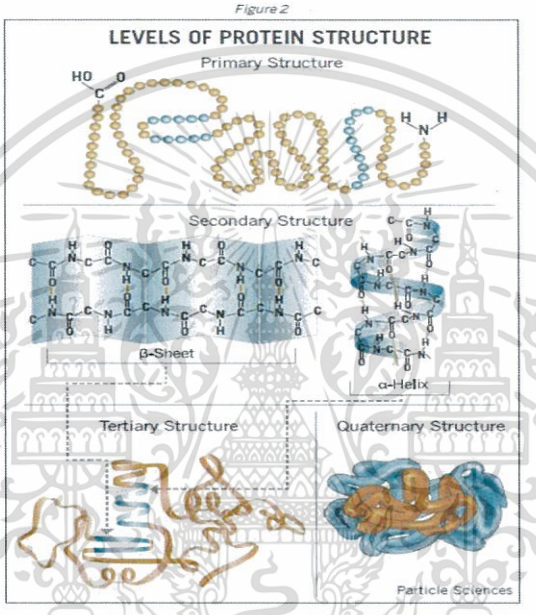
1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary sturcture) เป็นโครงสร้างหลักพื้นฐานของโปรตีน เกิดจากการเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโน (amino acid) เป็นสายยาว ระหว่างกรดอะมิโนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide) เกิดเป็นพอลิเพปไทด์ โดยมีปลายด้านหนึ่งของสาย เป็นปลายอะมิโน (amino end) และปลายอีกด้านหนึ่งเป็นปลายคาร์บอกซิล (carboxyl end) ชนิดและการเรียงลำดับของกรดแอมิโนในสายของพอลิเพปไทด์มีความเฉพาะเจาะจง ทำให้เกิดเป็นโปรตีนชนิดต่างๆ มากมาย การย่อยสลายโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน จะทำให้ได้กรดอะมิโน (amino acid) และโปรตีนสายสั้นๆ เช่น dipeptide ซึ่งความร้อนระดับการหุงต้มไม่สามารถทำลายโครงสร้างปฐมภูมิได้

2. โครงสร้างลำดับที่สอง หรือโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เป็นโครงสร้างที่เกิดจากกรดแอมิโน (amino acid) ที่อยู่ภายในสายพอลิเพปไทด์เดียวกัน ทำปฏิกิริยากันด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเกิดขึ้นในตำแหน่งที่เว้นระยะห่างสม่ำเสมอกัน ทำให้เกิดโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่มี 2 รูปแบบหลักคือ แบบเกลียวแอลฟา (alpha-helix) ซึ่งมีลักษณะเป็นเป็นเกลียวขดคล้ายสปริง เกลียวแอลฟาเป็นโครงสร้างพื้นฐานทั้งในโปรตีนเส้นใย (fibrous protein) และในโปรตีนก้อนกลม (globular protein) แบบ beta sheets หรือ pleated sheet ซึ่งเป็นแผ่นพับซ้อนกันไปมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. โครงสร้างลำดับที่สาม (tertiary structure) เป็นโครงสร้างของโปรตีนที่แสดงถึงรูปร่าง (conformation) ที่แท้จริงของโปรตีน เป็นโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่มีทั้งความ กว้าง ยาว และหนา โดยโปรตีนจะมีการม้วนตัว (protein folding) ขดไปมา การม้วนตัวของโปรตีนเกิดจากพันธะต่าง ๆ เช่น พันธะไดซัลไฟด์ พันธะไฮโดรเจน พันธะไฮโดรโฟบิก แรงยึดระหว่างประจุ แรงแวนเดอร์วาลล์ เป็นต้น

4. โครงสร้างลำดับที่สี่ (quaternary structure) เกิดจากการรวมกันของสายพอลิเพปไทด์มากกว่า 1 สาย ด้วยแรงดึงดูดอย่างอ่อน ระหว่างหมู่ R ระหว่างสายพอลิเพปไทด์ ที่ยังไม่เกิดพันธะซึ่งอยู่บริเวณผิวด้านนอกของโครงสร้าง โครงสร้างลำดับที่สี่นี้พบในโมเลกุลของเอนไซม์(enzyme) (Vichakarn, 2558) รูปแบบโครงสร้างโปรตีน ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างโปรตีน

ที่มา http://www.particlesciences.com

พันธะที่พบในโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งช่วยให้โครงสร้างนั้นมีความเสถียรมากขึ้น ได้แก่

1. Peptide bond เป็นพันธะที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันระหว่างหมู่ α -carbonyl ของกรดอะมิโนตัวหนึ่งกับหมู่ α -amino ของกรดอะมิโนอีกตัว พันธะนี้ก่อให้เกิดความแข็งแรงแก่สายพอลิเพปไทด์

2. Disulfide bond เป็นพันธะที่เกิดจากการจับตัวกันของ cysteine 2 residues ที่อาจจะอยู่ในสายเดียวกัน (intrachain) ของพอลิเพปไทด์ chain หรือต่างสาย (interchain) ก็ได้ โดยทั่วไป disulfide bond นี้จะทนต่อสภาวะต่างๆที่ใช้ในการทำลายสภาพธรรมชาติ (denature) ของโปรตีน แต่อย่างไรสารเคมีบางชนิดที่สามารถทำลายพันธะนี้ได้ คือ b-mercaptoethanol, dithiotheritol เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Hydrogen bond (H-bond) พันธะนี้จะเกิดขึ้นได้ 2 แบบ แบบแรกเกิดระหว่างอะตอมของไฮโดรเจนและออกซิเจนของพันธะเปปไทด์ ซึ่งอาจจะอยู่ในสายพอลิเพปไทด์ เดียวกันหรือต่างสายกัน แบบที่ 2 อาจเกิดจากการสร้าง H-bond ระหว่างหมู่ที่มีขั้วของสายข้างของกรดอะมิโนที่อยู่บนผิวของโปรตีนกับน้ำ H-bond ทั้ง 2 แบบนี้จะแสดงบทบาทที่สำคัญในการรักษาโครงสร้างของโปรตีน

4. Van der Waals interaction เป็นพันธะอย่างอ่อนที่เกิดระหว่างหมู่ของสายข้างของกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสถียรขึ้น (Vichakarn, 2558)

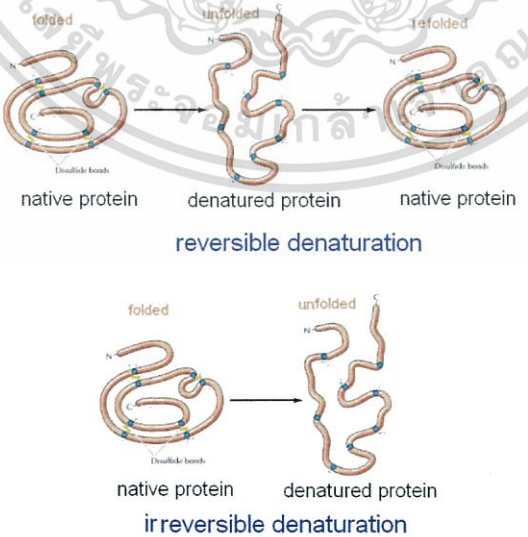
2.2.3 คุณสมบัติการละลายของโปรตีน

คุณสมบัติการละลายของโปรตีนมีความสำคัญต่อการศึกษาโครงสร้างและกลไกการทำงานของโปรตีน โดยการจับกับน้ำของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณ และโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการแขวนลอยและการตกตะกอนของโปรตีน ได้แก่

2.2.3.1 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Denaturation) มีผลทำให้โครงสร้างทางเคมีเปลี่ยนไป เป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพตามธรรมชาติของโปรตีน (native conformation) ที่ปกติทำงานได้ดี ให้กลายเป็นโปรตีนที่ทำงานได้น้อยลงหรือสูญเสียหน้าที่ไป แต่ไม่ได้ทำลายพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ซึ่งเป็นพันธะระหว่างกรดอะมิโน (amino acid) ในโมเลกุลของโปรตีน

แต่พันธะไฮโดรเจนถูกทำลายโครงสร้างจึงเกิดการคลายตัว (unfolded) ดังรูปที่ 2.6 และยังอาจมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติอื่นๆของโปรตีนด้วย เช่น มีการละลายได้น้อยลง เนื่องจากโครงสร้างระดับที่ 2, 3 และ 4 ของโปรตีนถูกทำลายไปโดยสารเคมีหรือโดยสภาวะบางอย่างได้แก่ ความร้อน สารเคมี เป็นต้น (Foodnetworksolution, 2558)



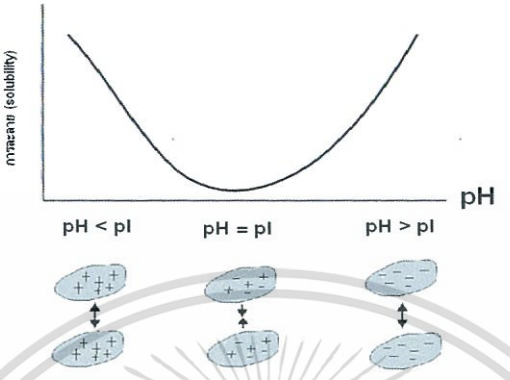
รูปที่ 2.6 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

ที่มา http://www.foodnetworksolution.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2 ค่าพีเอช

การปรับค่าพีเอช (pH) ให้เท่ากับจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่โปรตีนมีประจุบวกและประจุลบเท่ากัน โมเลกุลของโปรตีนจะดึงดูดกัน และแขวนลอยในน้ำได้น้อยที่สุด และตกตะกอนออกมา หากโปรตีนยังละลายอยู่ได้ในน้ำจะทำให้เกิดความหนืดสูง ดังรูปที่ 2.7

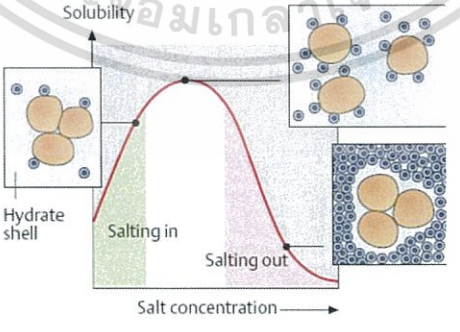


รูปที่ 2.7 การละลายน้ำของโปรตีนที่ pH ต่างกัน

ที่มา http://www.foodnetworksolution.com

2.2.3.3 คุณสมบัติทางประจุ

การเติมเกลือในสารละลายโปรตีน จะทำให้โปรตีนตกตะกอนได้เช่นเดียวกับการปรับค่าพีเอช เพราะเกลือแตกตัวเป็นประจุบวก ประจุลบและรวมตัวกับโปรตีน การเติมเกลือปริมาณน้อยๆ อาจทำให้โปรตีนละลายได้มากขึ้น หรือจับกับน้ำได้ดีขึ้น (salting in) และจะละลายได้ดีขึ้นจนถึงจุดสูงสุด แต่หากสารละลายเกลือเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้โปรตีนตกตะกอน (salting out) (Foodnetworksolution, 2558) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การเติมเกลือในสารละลายโปรตีน

ที่มา http://www.foodnetworksolution.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 Ovalbumin

โอวาบูมิน (ovalbumin) เป็นโปรตีนแอลบูมิน (albumin) ที่มีมากที่สุดในไข่ขาว มีอยู่ประมาณร้อยละ 54 ของน้ำหนักโปรตีนในไข่ขาว จัดเป็นฟอสโฟไกลโคโปรตีน (phosphoglycoprotein) มีโครงสร้างเป็นสายพอลิเพปไทด์ที่มีหมู่ฟอสเฟตและคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ มีจุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point) ที่ pH 4.6 และจะตกตะกอนที่ pH 4.6-4.8 เป็นโปรตีนที่ทนความร้อนได้ มีขนาดเท่ากับ 45 kDa

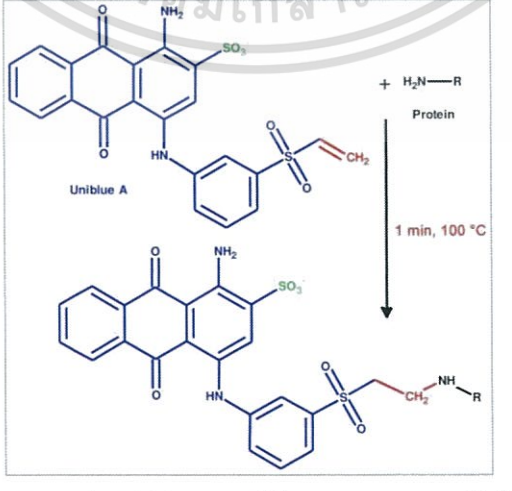
2.2.5 Bovine Serum Albumin

Bovine Serum Albumin หรือที่เรียกว่า Fraction V เป็นโปรตีนที่ได้มาจากซีรั่มของสัตว์เคี้ยวเอื้องกลุ่มวัวควาย มีจุดไอโซอิเล็กตริก (isoelectric point) ที่ pH 4.7 มีขนาดเท่ากับ 66 kDa (Wikipedia, 2558)

2.3 สีรีแอกทีฟ (Reactive Dyes)

สีรีแอกทีฟ (Reactive Dyes) เป็นสีที่ละลายน้ำได้ มีประจุลบ เมื่ออยู่ในน้ำมีฤทธิ์เป็นด่าง สีย้อมชนิดนี้เหมาะกับการย้อมเส้นใยเซลลูโลสมากที่สุด โมเลกุลของสีจะยึดจับกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-) ของเซลลูโลส และเชื่อมโยงติดกันด้วยพันธะโควาเลนท์ในสภาวะที่เป็นด่าง กลายเป็นสารประกอบเคมีชนิดใหม่กับเซลลูโลส สีรีแอกทีฟมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ย้อมติดที่อุณหภูมิสูง 70-75 °C และกลุ่มที่ย้อมติดที่อุณหภูมิปกติ สีรีแอกทีฟให้สีที่สดใส ทุกสีติดทนในทุกสภาวะ สมบัติการละลายและดูดติดเส้นใยของตัวสีทำให้สีเข้าไปอยู่ภายในเส้นใย และเมื่อเกิดปฏิกิริยาตัวสีจะยึดติดเส้นใย (Tpa, 2558)

หลักการในการติดสีย้อมของโปรตีน ซึ่งการเชื่อมโยงพันธะโควาเลนต์ของสี Remazol dye กับโปรตีน เกิดระหว่าง Vinyl sulfone ซึ่งเชื่อมกับหมู่ Alcohol, Sulfhydryl, 1° amine และ 2° amine ของโปรตีน เกิดปฏิกิริยาขึ้นภายใต้สภาวะเบส (pH>7) ดังรูปที่ 2.9 (Marco et al., 2012)



รูปที่ 2.9 การทำปฏิกิริยาของสีย้อม Uniblue A กับโปรตีน
ที่มา Mass Spectrometry Compatible Staining of Proteins,2012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 Remazol Brilliant Blue R

ชื่อทางเคมี: Reactive Blue 19

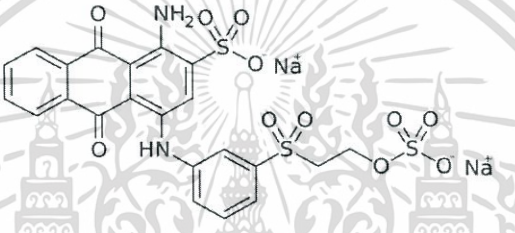
ชื่ออื่น: Remazol brilliant blue R; C.I. Reactive Blue 19; Remalan Brilliant Blue R; Cavalite Brilliant Blue R; Reactive Blue KN-R, Reactive Blue KN-RS, Reactive Blue brilliant KN-R, Reactive Blue brilliant KN-RS

สูตรโมเลกุล : $C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$

มวลโมเลกุล : 626.55 g/mol

CAS Registry Number : 2580-78-1

โครงสร้างของ Remazol Brilliant Blue R ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 สูตรโครงสร้าง Remazol Brilliant Blue R

ที่มา https://en.wikipedia.org

2.4 เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (Gel Electrophoresis)

2.4.1 โพลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟริซิส

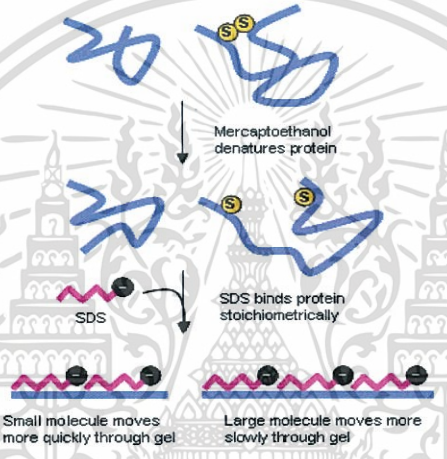
(Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis , PAGE)

หลักการทั่วไปของการแยกโปรตีนโดยเจลอิเลคโตรโพรีซีส คือ โปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่นี้จะถูกต้านโดยปฏิกิริยาระหว่างสารกับร่างแหเจล ซึ่งทำหน้าที่เป็น molecular sieve ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน ในการแยกโปรตีนส่วนใหญ่ใช้เจลที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์อยู่ในช่วงร้อยละ 5 - 15 ซึ่งเจลที่มีร้อยละของอะคริลาไมด์ต่ำจะให้ขนาดรูพรุนใหญ่ที่สุด ซึ่งเหมาะสำหรับแยกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นแถบด้วยกระแสไฟฟ้า และการเพิ่มความเข้มข้นของอะคริลาไมด์จะช่วยแยกโปรตีนที่มีขนาดเล็กได้ดีขึ้น

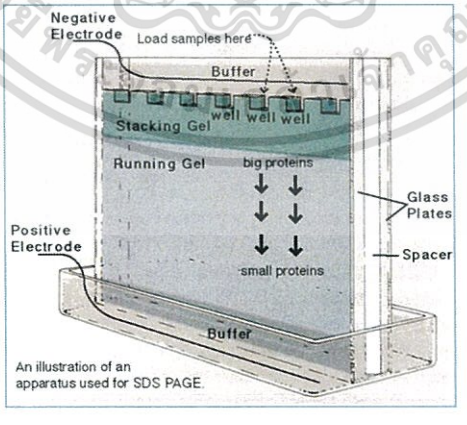
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.1 SDS-PAGE (Sodium dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SDS-PAGE เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโลเมกุล SDS เป็นสารพวก Detergen โดย SDS เมื่อรวมกับโปรตีนจะทำให้โครงสร้างของโปรตีนที่มี SDS จับอยู่มีประจุเป็นลบในอัตราส่วนโดยน้ำหนักหนักที่คงที่ตลอดทั้งเจลทำให้โปรตีนทุกชนิดมีค่าความหนาแน่นของประจุต่อน้ำหนักโปรตีนเท่ากัน และสายของโปรตีนยืดตัวออกจากสภาพธรรมชาติที่เป็นก้อนกลมกลายเป็นเส้นตรงดังรูปที่ 2.11 ฉะนั้นใน SDS-PAGE นี้โปรตีนจึงแยกกันด้วยความแตกต่างของขนาด (มวลโมเลกุล) เท่านั้น เมื่อใส่ SDS และ DTT (dithiothreitol) จะทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) ระหว่างหน่วยย่อยของโปรตีน SDS-PAGE ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยทั่วไป โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Gibthai, 2558) ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.11 การเข้าจับของ SDS กับโปรตีน



รูปที่ 2.12 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ที่มา http://www.gibthai.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

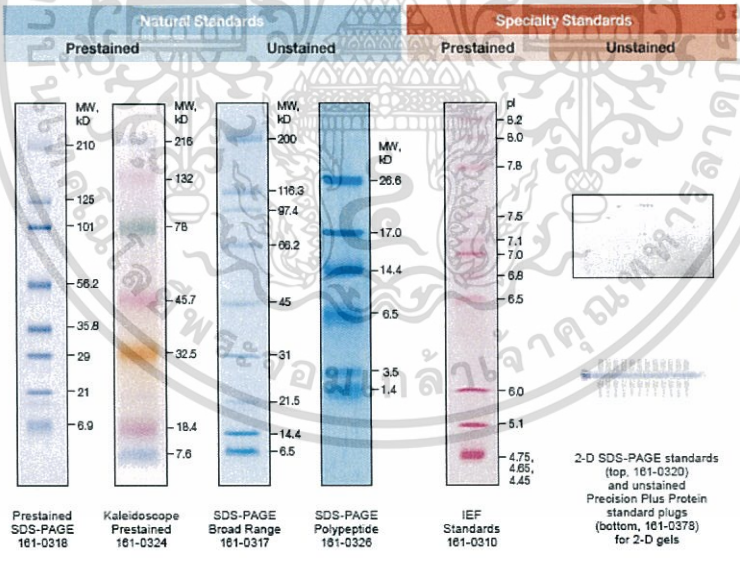
2.5 แถบโปรตีนมาตรฐาน

2.5.1 Unstained Protein Marker

แถบโปรตีนที่ไม่มีสี (Unstained Protein Marker) เป็นโปรตีนมาตรฐานชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่มีสีที่มีความแตกต่างกันเนื่องจากน้ำหนักโมเลกุล โดยจะประกอบด้วยโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง สามารถทราบขนาดที่เฉพาะเจาะจงได้ประมาณ 10-12 ตัว หลังจากนำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE แล้วจะมีแถบแถบหนึ่งซึ่งแสดงถึงขนาดของโปรตีนเมื่อเทียบกับแถบมาตรฐาน โดยถ้าแถบโปรตีนตัวอย่างอยู่ในช่วงใดช่วงหนึ่งของแถบมาตรฐานก็จะถือว่าเป็นการยืนยันขนาด ของโปรตีนที่เราสนใจ ถึงอย่างไรก็ตามแถบโปรตีนที่ไม่มีสีจะสามารถเปรียบเทียบขนาดของ โปรตีนได้แม่นยำกว่าแถบโปรตีนที่มีสี แต่ไม่สามารถมองเห็นแถบได้เลยในขณะทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ต้องนำไปผ่านการย้อมด้วยสีย้อม Coomassie จึงจะสามารถมองเห็นแถบของโปรตีนตัวอย่างได้

2.5.2 Prestained Protein Marker

แถบโปรตีนที่มีสี (Prestained Protein Marker) เป็นโปรตีนมาตรฐานชนิดหนึ่งซึ่งมักมีสีนิยมนำมาใช้กับเทคนิค SDS-PAGE เพื่อวิเคราะห์แยกขนาดโปรตีนตัวอย่าง แถบโปรตีนที่มีสี สามารถมองเห็นแถบขนาดของโปรตีนตัวอย่างในขณะทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ได้ ทันทีโดยไม่ต้องนำไปย้อมด้วยสีย้อม Coomasie ก่อน



รูปที่ 2.13 เปรียบเทียบการติดสีโปรตีนระหว่าง Prestained Protein ladder กับ Unstained protein ladder

ที่มา www.bio-rad.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mark M. et.al (2002) ได้ทำการศึกษาเรื่องการทำให้โปรตีนติดกับสีย้อม เพื่อใช้สำหรับหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน สำหรับวิธี SDS-PAGE โดยในงานวิจัยได้บอกถึงวิธีการทดลองในการทำให้สีย้อมติดกับโปรตีน โดยใช้โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างกัน เช่น Bovine Serum Albumin(BSA), Ovalbumin เป็นต้น และสีต่างกัน เช่น Remazol Brilliant Blue R,Remazol Brilliant Red F3B เป็นต้น นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ติดสีกับไม่ติดสีว่าเปลี่ยนแปลงอย่างไร

Peter J. et.al (1995) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการตรวจวัดโปรตีนที่ติดสีโดยวิธี SDS-PAGE โดยศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติโปรตีนกับสี เช่น การใช้ Organic Dyes , การ Silver Staining , การทำให้เกิด Fluorescent Protein

Gopal G. et.al (2000) ได้ทำการศึกษาวิธีในการทำให้โปรตีนติดสี โดยใช้ mixed-dye (sulfo-rhodamine B and 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid (NH)) solution โดยการติดสี mixed-dye สามารถใช้วัดโปรตีนที่มีปริมาณน้อยได้ถึง 15 ng และวิธีนี้สามารถใช้ได้กับโปรตีนทุกชนิด ซึ่งสามารถวัดโปรตีนที่มีปริมาณน้อยได้ดีกว่าการย้อมด้วยวิธี Coomassie Blue วิธีการย้อมสีโปรตีนนี้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ จากการทดสอบย้อมสีกับโปรตีนหลายชนิด เช่น phosphorylase b , bovine serum albumin , ovalbumin , carbonic anhydrase , soybean trypsin inhibitor เป็นต้น และตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าสีและแถบโปรตีนมีความชัดเจน

Dong Ma (2006) เป็นวิธีการย้อมสีโปรตีนมากกว่า1สี อธิบายถึงขั้นตอนในการทำ อย่างเช่น การเตรียมโปรตีน การเตรียมสี ระยะเวลาในการบ่ม รวมถึงการเติมตัวหยุดปฏิกิริยาอย่าง lysine

Marco A. et.al (2012) ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์โปรตีนที่ผสมกับสีย้อม Uniblue A เพื่อศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างโปรตีนกับสีย้อม Uniblue A ด้วยวิธี mass spectrometry (MS) ซึ่งคือ เทคนิคในการวิเคราะห์ผลการวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ของอนุภาคที่มีประจุ ใช้เพื่อระบุมวลของอนุภาค ส่วนประกอบของธาตุในสารประกอบตัวอย่างหรือในโมเลกุล และเพื่อแสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล เช่น เพปไทด์ และสารประกอบทางเคมีอื่นๆ การทำงานของ MS คือทำให้สารประกอบเคมีกลายเป็นประจุ (ionize) เพื่อสร้างโมเลกุลที่มีประจุขึ้นมาและวัดสัดส่วนมวลต่อประจุของมัน และจากการศึกษาพบว่า โปรตีนสามารถติดกับสีย้อมด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งเกิดจาก vinyl sulfone group ของสี Uniblue A ทำปฏิกิริยากับ primary amine ของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Mini dry bath รุ่น BSH 300 control Panel บริษัท Bench mark ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน
2. Micro pipette รุ่น Nichipet EX (NLE-1000) บริษัท NICHIRYO ประเทศ ญี่ปุ่น
3. Micro pipette รุ่น Nichipet EX (NLE-200) บริษัท NICHIRYO ประเทศ ญี่ปุ่น
4. Micro pipette รุ่น Nichipet EX (NLE-100) บริษัท NICHIRYO ประเทศ ญี่ปุ่น
5. Micro pipette รุ่น Nichipet EX (NLE-20) บริษัท NICHIRYO ประเทศ ญี่ปุ่น
6. Micro pipette รุ่น Nichipet EX (NLE-10) บริษัท NICHIRYO ประเทศ ญี่ปุ่น
7. Incubator รุ่น บริษัท Memmert ประเทศ เยอรมันนี
8. Electrophoresis Power Supplies รุ่น Powerpac Basic บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. เครื่อง Electrophoresis Chambers รุ่น Mini Protein Tetra System บริษัท BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Microcontrifuge tube บริษัท Hycon plastic
11. Micro tube บริษัท Hycon plastic
12. Acrylamide Kits บริษัท Bio-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ชนิด Internal Calibration รุ่น Sartorius บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมันนี
14. เครื่องแก้วต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 สารเคมี

1. Bovine Serum Albumin (BSA) เกรดวิเคราะห์ บริษัท ACROS organic ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. Dithiothreitol (DTT)
3. Ethyene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) เกรดวิเคราะห์ บริษัท J.T. Baket ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Glycerol
5. L-lysine เกรดวิเคราะห์ บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Remazol Brilliant Blue R เกรดวิเคราะห์ บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. Mercaptoethanol
8. Ovalbumin เกรดวิเคราะห์ บริษัท ACROS organic ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. Sodium Carbonate (Na_2CO_3) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Tetramethylene diamine (TEMED) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Bio-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Tris เกรดวิเคราะห์ บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Acrylamid mix 30% เกรดวิเคราะห์ บริษัท Bio-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Ammonium Persulfate เกรดวิเคราะห์ บริษัท Bio-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

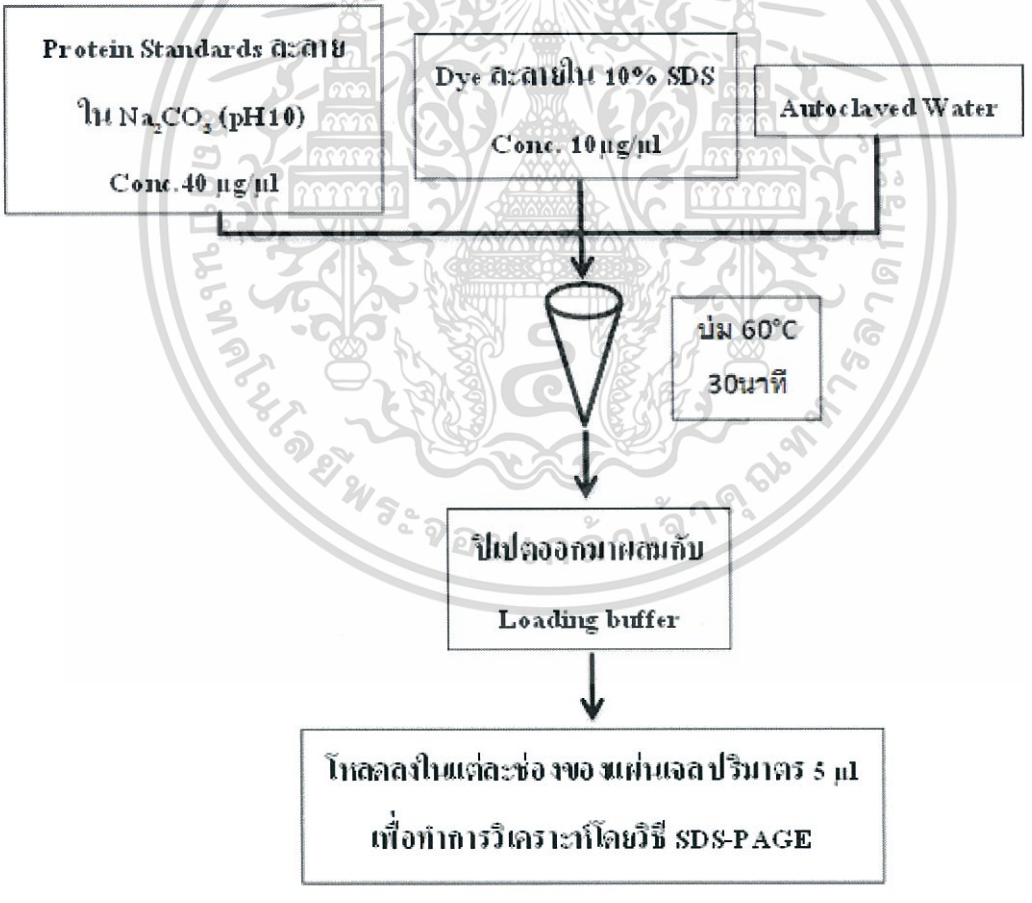
3.3 ขั้นตอนการทดลอง

3.3.1 การเตรียม Stained Protein

การเตรียมโปรตีน แบ่งออกเป็น 2 วิธี

แบบที่ 1

การเตรียม Stained Protein ในวิธีที่ 1 ใช้โปรตีนอยู่ 2 ตัว คือ Ovalbumin และ BSA Protein ที่ละลายในโซเดียมคาร์บอเนต pH 10 ผสมกับน้ำบริสุทธิ์ และ Reactive Blue Dye ที่ละลายใน 10% SDS (อัตราส่วนตามตาราง 3.3.1) หลังจากนั้นนำไปบ่ม 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา Overnight (ใช้เวลามากกว่า 16ชั่วโมง) นำ Pre-stained protein ไปผสมกับ Loading Buffer ซึ่งประกอบด้วย Pre-stained protein , 75% glycerol, 10% SDS, 1M Tris pH 6.8, 1M DTT, 0.5M EDTA, น้ำบริสุทธิ์ (อัตราส่วนตามตาราง 3.3.2) แบ่งไปต้มครึ่งหนึ่ง 15นาที และไม่ต้มที่เหลือ นำไปแช่เย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา 10 นาที นำไปเขย่าและปั่นตก หลังจากนั้นนำไปปิเปตลงในช่องในแผ่นเจล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร



รูปที่ 3.1 แผนผังการทำการทดลองในแบบที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3.1 อัตราส่วนการผสม Stained Protein

Protein (µg/µL)	16.67	0.384	0.384	0.384	0.384	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Dye (µg/µL)	1 1.34 1.67 2 2.34	0.14 0.19 0.24 0.29 0.34	0.14 0.19 0.24 0.29 0.34	1 1.34 1.67 2 2.34	1 1.34 1.67 2 2.34	5.5	5.5	8.25	5.5	2.5	1.5	0.55
Water (µL)	241.62 224.62 208.12 191.62 174.62	4.1 4.1 4.1 4.1 4.1	4.1 4.1 4.1 4.1 4.1	48.32 44.92 41.62 38.32 34.92	48.32 44.92 41.62 38.32 34.92	83.33	83.33	33.33	33.33	33.33	33.33	33.33
ปริมาตรการ Load (µL)	20	5	5	5	5	2	2	2	2	2	2	2

Protein (µg/µL)	0.55	0.55	0.55	0.55
Dye (µg/µL)	1.65	1.65	2.75	2.75
10% SDS (µg/µL)	50	50	50	50
0.1M L-lysine (µg/µL)	-	5	-	5
Water (µL.)	5	-	5	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

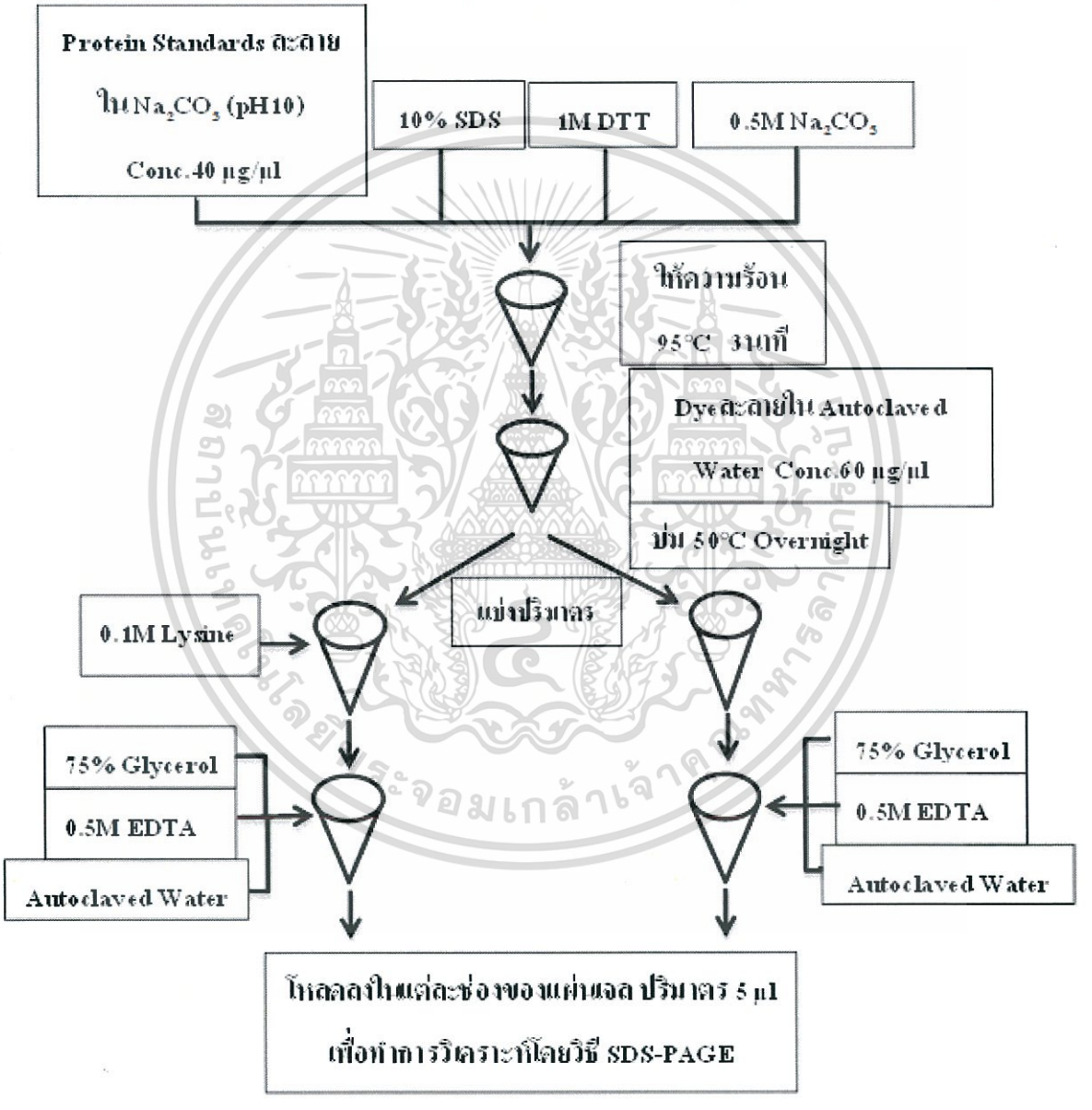
ตารางที่ 3.3.2 อัตราส่วน loading dye

1M Tris-HCl (pH6.8) (µg/µL)	60	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
50%glycerol (µg/µL)	500	-	-	-	-	-	-
10% SDS (µg/µL)	200	20	20	20	20	20	20
2-mercaptoethanol (µg/µL)	50	-	-	-	-	-	-
Water (µL)	90	21	21	11	11	12	9.25
Stained-Protein (µg/µL)	-	6	6	16.7	16.7	15	18.5
75%glycerol (µg/µL)	-	40	40	40	40	40	40
1M DTT (µg/µL)	-	5	5	5	5	5	5
0.5M EDTA (µg/µL)	-	1	1	1	1	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบที่ 2

การเตรียม Stained Protein โดย BSA Protein ที่ละลายในโซเดียมคาร์บอเนต pH10 ผสมกับน้ำบริสุทธิ์ และ DTT(อัตราส่วนตามตาราง3.3.3) นำไป Incubate 95 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 นาทีและ 10 นาที หลังจากนั้น เติม Reactive Dye ที่ละลายใน 10%SDS แบ่งเป็น 2 ส่วน โดยในส่วนที่ 1 แบ่งไปบ่ม 50 องศาเซลเซียล 4 ชั่วโมง และแบ่งไปบ่ม 50 องศาเซลเซียล เวลา Overnight (ใช้เวลามากกว่า16ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำมาเติม Loading Buffer 75% glycerol, 10% SDS, 1M Tris pH 6.8, 1M DTT, 0.5 M EDTA, น้ำบริสุทธิ์ (อัตราส่วนตามตาราง 3.3.4)



รูปที่ 3.2 แผนผังการทำการทดลองในแบบที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง3.3.3 อัตราส่วนการผสม Stained Protein

Conc.40 µg/µL Protein(µg/µL)	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Conc.60 µg/µL Dye(µg/µL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Water(µL)	-	-	-	-	-
1M DTT(µg/µL)	5.0	5.0	5.0	1.8	-
0.1M L-lysine(µg/µL)	5.0	5.0	-	5.0	5.0
0.5M NaCO3(µL)	-	10.0	10.0	10.0	10.0

Conc.40 µg/µL Protein(µg/µL)	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Conc.60 µg/µL Dye(µg/µL)	1.65	1.65	1.65	1.65	21.65	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75
Water(µL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1M DTT(µg/µL)	-	5.0	3.0	5.0	10.0	-	5.0	3.0	5.0	10.0
0.1M L-lysine (µg/µL)	-	-	5.0	5.0	5.0	-	-	5.0	5.0	5.0
0.5M $NaCO_3$ (µL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

ตารางที่ 3.3.4 อัตราส่วน loading dye

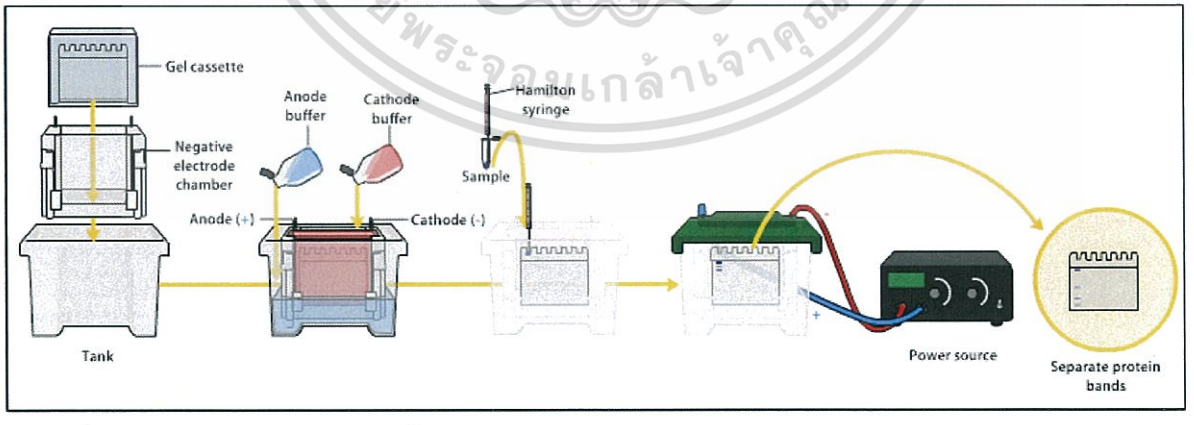
75%glycerol (µg/µL)	40	40	40	40	40
0.5M EDTA(µL)	1	1	1	1	-
Water(µL)	9	14	5.8	4	4
1M DTT(µL)	-	-	3.22	5	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

การวิเคราะห์วิธี Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ขั้นแรกต้องประกอบกระจกเข้าด้วยกัน ซึ่งกระจกต้องเช็ดด้วยเอทานอลแล้ว ประกอบเข้ากันที่ถูกต้องคือต้องมีช่องตรงกลาง วางกระจกลงในcasting fame โดยกระจกด้านสั้นไว้ด้านหน้า หลังจากนั้น นำกระจกที่ประกอบใน casting frame วางบน casting stand ที่มี gray castingstand gasket รองอยู่ที่ด้านล่าง โดยกดส่วน spring loaded lever ให้gel cassette assemblyแนบสนิท และตั้งฉากกับ casting stand เช็คการรั่วซึมโดนใช้น้ำกลั่น และ จะใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 12 % ตามตารางที่ 3.3.5 (ส่วนผสมในการทำเจล 1ชุด)ผสมส่วนผสมลงบีกเกอร์ และเมื่อ พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัวจึงเติมเจลซ้อน (Stacking gel)ตามตารางที่ 3.3.6 (ส่วนผสมในการทำเจล 1ชุด) ลงในถาดรองเจลจากนั้นทำการปักหวีเจล เมื่อเจลแข็งตัว ดึงหวีเจลออก นำไปล้างทำความสะอาด หลังจากนั้นนำเจลไปติดตั้งกับเครื่องนำ Gel Cassette Assemblies ออกจาก CastingStand แล้วนำไปต่อเข้ากับ Electrode Assembly โดยหันด้าน กระจกที่สั้นของ Gel Cassette Sandwich เข้าด้านในตรงส่วนของ U-shaped Gaskets และเติมสารละลาย 1X Tris-Glycine Electrophoresis Buffer (running buffer) ให้ท่วมบริเวณช่องที่มีเจลด้านในและประมาณครึ่งหนึ่งของกล่องใหญ่ของเครื่อง Electrophoresis System

ขั้นตอนต่อไปคือการ load สารตัวอย่างลงไปในwell จากนั้นทำการวิเคราะห์ โดยปิดฝาใช้ปลั๊กที่มีขั้วสายสีแดงและดำ ต่อMini Tank ต่อเข้ากับ Power Supply โดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 mA ความต่างศักย์ 100 Volts จนกระทั่งสีของ Loading Dye เคลื่อนที่จนพ้นเจลจึงหยุดกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย Coomassie และนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด โดยให้สีน้ำเงินออกให้มากที่สุด หลังจากนั้นทำการสีย้อมออกด้วยน้ำยา Destained และนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 ชั่วโมง หรือทำการล้างสีย้อมโดยนำเจลมาผสมกับน้ำกลั่น ไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้าที่ 360 watt เป็นเวลา 5 นาทีโดยทำซ้ำจนเห็นแถบสีของโปรตีนบนเจล



รูปที่ 3.3 แสดงการทำงานของเครื่อง Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

ที่มา https://en.wikipedia.org/wiki/Polyacrylamide_gel_electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3.4 Mini Tank และ Power Supply

ที่มา http://medinfo2.psu.ac.th/crl/pages/tools.html

รูปที่ 3.5 แสดงแถบโปรตีนใน SDS-PAGE หลังจากเสร็จสิ้นการแยกขนาดโปรตีน

ตารางที่ 3.3.5 สารผสมการทำอะคิลาไมด์เจล 12%

สาร	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
Water	1.6
Acrylamide mix (30%)	2.0
Tris (1.5M,pH8.8)	1.3
SDS (10%)	0.05
Ammonium persulfate (10%)	0.05
Temed	0.002
Isopropanol	1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 3.3.6 การเตรียม 5% stacking gels for Tris-glysine SDS-PAGE

สาร	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
Water	2.1
Acrylamide mix (30%)	0.5
Tris (1.5M,pH6.8)	0.38
SDS (10%)	0.03
Ammonium persulfate (10%)	0.03
Temed	0.03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 การตรวจสอบ Stained-protein ด้วย วิธี SDS-PAGE

นำโปรตีน Ovalbumin ละลายใน Na_2CO_3 (pH10) แล้วผสมกับสี Remazol Brilliant Blue R ที่ละลายใน 10%SDS โดยกำหนดค่าความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนเป็น 16.67 µg/µL และกำหนดค่าความเข้มข้นสุดท้ายของสีเป็น 1.00 , 1.34 , 1.67 2.00 , 2.34 µg/µL ตามลำดับ ทำการปิเปตลงในช่องแผ่นเจลปริมาตร 20 µL โดยไม่ใส่ 5X loading buffer ซึ่งขนาดของ Ovalbumin เท่ากับ 45kDa

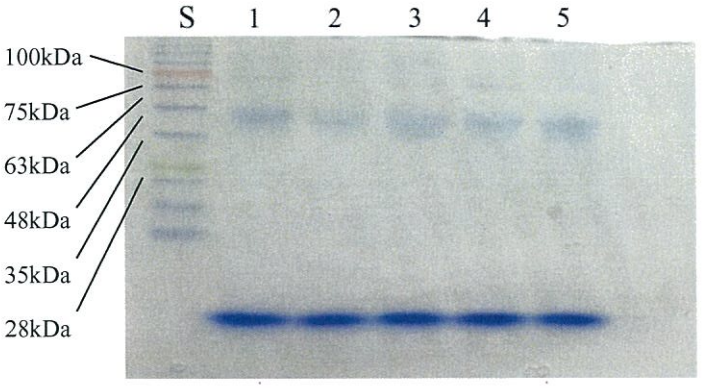
รูปที่ 4.1 แสดงแถบของโปรตีน Ovalbumin 20 µL ที่ระดับความเข้มข้นสีต่างๆ

ช่องS: standard proteins marker ช่อง1: 1.00 µg/µL ช่อง2: 1.34 µg/µL
ช่อง3: 1.67 µg/µL ช่อง4: 2.00 µg/µL ช่อง5: 2.34 µg/µL

จากผลการทดลองพบว่า แถบของโปรตีนมีขนาดใหญ่เกิน เนื่องจากว่า ปริมาณ stained protein ที่ทำการปิเปตลงในช่องแผ่นเจลมีมากเกิน เนื่องจากความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนเป็น 16.67 µg/µL การที่ปิเปต stained protein ลงในช่องแผ่นเจล ลงไป 20 µL เท่ากับว่า มีปริมาณโปรตีนถึง 333.4 µg จึงเกิดการ overload ขึ้น ดังรูปที่ 4.1

จากผลการทดลองที่ 4.1 จึงได้ทำการปรับปริมาตรโปรตีนในตอนปิเปตลงในช่องแผ่นเจลจาก 20 µl เป็น 5 µl โดยใส่ 5X loading buffer ที่มีส่วนผสมของ Bromophenol blue จากผลการทดลองพบว่า แถบของโปรตีนยังมีขนาดใหญ่อยู่ และเกิดแถบสีด้านล่างของแผ่นเจล ซึ่งเกิดมาจาก Bromophenol blue ที่มีอยู่ใน 5X loading buffer ดังรูปที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงแถบของโปรตีน Ovalbumin 5µL ที่ระดับความเข้มข้นสีต่างๆโดยใช้ 5X loading buffer

ช่องS: standard protein marker ช่อง1: 1.00 µg/µL ช่อง2: 1.34 µg/µL
ช่อง3: 1.67 µg/µL ช่อง4: 2.00 µg/µL ช่อง5: 2.34 µg/µL

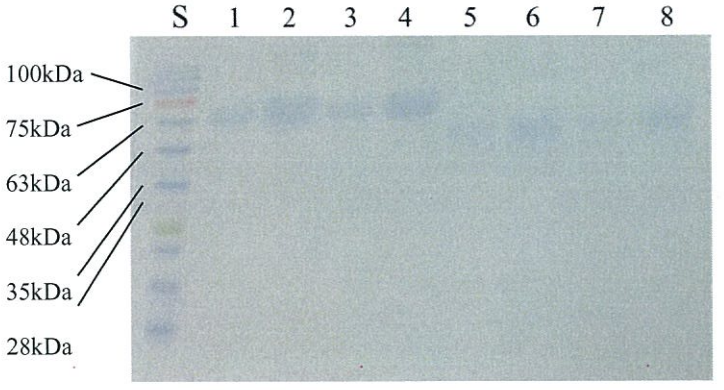
ซึ่งจากผลการทดลองที่ 4.2 จึงทำการปิเปตลงในช่องแผ่นเจลปริมาตร 5 µL โดยใส่ 5X loading buffer ที่ไม่มี Bromophenol blue ผสมอยู่ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า แถบของโปรตีนยังคงบวม ไม่มีความคมชัดและการติดของสียังชัดจาง ดังรูปที่ 4.3

รูปที่ 4.3 แสดงแถบของโปรตีน Ovalbumin 5 µL โดยใช้ 5X loading buffer ที่ไม่มีการผสมของ Bromophenol blue ที่ระดับความเข้มข้นสีต่างๆ

ช่องS: standard protein marker ช่อง1: 1.00 µg/µL ช่อง2: 1.34 µg/µL
ช่อง3: 1.67 µg/µL ช่อง4: 2.00 µg/µL ช่อง5: 2.34 µg/µL

จากนั้นจึงได้นำโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA) ละลายใน Na_2CO_3 (pH10) แล้วผสมกับสี Remazol Brilliant Blue R ที่ละลายใน 10%SDS จึงมี stained protein ของ Ovalbumin และ BSA แล้วจึงได้นำมาทำการทดสอบการต้มและไม่ต้ม stained protein เพื่อเป็นการเปรียบเทียบผลที่ได้จากการต้มเพื่อให้ความร้อนกับโปรตีนและการไม่ต้มโปรตีนก่อนที่จะนำไปทำการปิเปตลงในช่องแผ่นเจล ซึ่ง stained protein จะผสมกับ 5X loading buffer จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.4 พบว่า แถบของโปรตีนทั้งสองชนิดยังไม่มีความคมชัด สียังคงชัดจาง แต่แถบโปรตีนของ BSA มีความคมชัดมากกว่าแถบโปรตีนของ Ovalbumin ซึ่งขนาดของ BSA เท่ากับ 66kDa และขนาดของ Ovalbumin เท่ากับ 45kDa

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงแถบของโปรตีน BSA และ Ovalbumin โดยใช้ 5X loading buffer ทดสอบการต้มและไม่ต้ม ก่อนปิเปตลงในแผ่นเจล

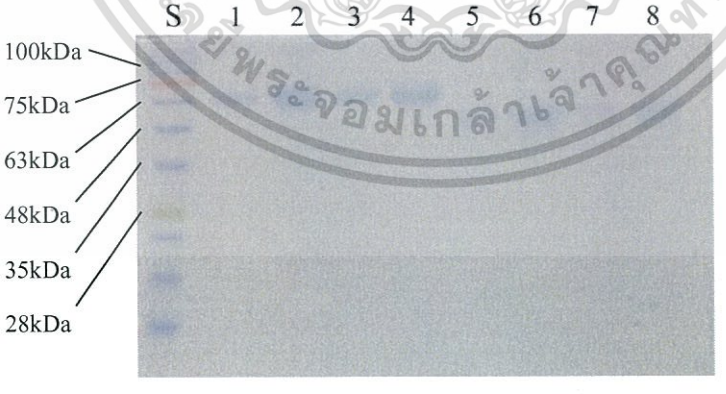
ช่องS: standard protein marker ช่อง1: BSA 5 µL ต้ม ช่อง2: BSA 10 µL ต้ม

ช่อง3: BSA 5 µL ไม่ต้ม ช่อง4: BSA 10 µL ไม่ต้ม

ช่อง5: Ovalbumin 5 µL ต้ม ช่อง6: Ovalbumin 10 µL ต้ม

ช่อง7: Ovalbumin 5 µL ไม่ต้ม ช่อง8: Ovalbumin 10 µL ไม่ต้ม

ซึ่งจากผลการทดลองรูปที่ 4.4 พบว่า แถบของโปรตีนยังไม่มีความคมชัด สียังคงซีดจาง จึงได้ทำการเปลี่ยน loading buffer จากเดิมที่ใช้ 5X loading buffer เป็น loading buffer ที่มีส่วนผสมของ Dithiothreitol (DTT) นั้น ส่งผลให้แถบของโปรตีน มีความคมชัดมากขึ้น ในส่วนของการต้มโปรตีนและไม่ต้มโปรตีนนั้น ภาพที่ปรากฏนั้นเกิดจากการที่นำโปรตีนไปต้มไม่ได้ปั่นตกไอน้ำที่เกาะอยู่ด้านในของฝาหลอดทดลองก่อนที่จะนำมาปิเปตลงในช่องแผ่นเจล จึงทำให้ความเข้มของสีนั้นเพิ่มมากขึ้น ดังรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 แสดงแถบโปรตีน BSA และ Ovalbumin โดยใช้ Loading buffer ที่มีส่วนผสมของ Dithiothreitol (DTT) ที่ทดสอบการต้มและไม่ต้ม ก่อนปิเปตลงในแผ่นเจล

ช่องS: standard protein marker ช่อง1: BSA 5 µL ต้ม ช่อง2: BSA 10 µL ต้ม

ช่อง3: BSA 5 µL ไม่ต้ม ช่อง4: BSA 10 µL ไม่ต้ม

ช่อง5: Ovalbumin 5 µL ต้ม ช่อง6: Ovalbumin 10 µL ต้ม

ช่อง7: Ovalbumin 5 µL ไม่ต้ม ช่อง8: Ovalbumin 10 µL ไม่ต้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองรูปที่ 4.5 เปรียบเทียบให้เห็นได้ว่า แถบของโปรตีน BSA มีความคมชัดมากกว่าแถบของโปรตีน Ovalbumin จึงทำการเลือกชนิดของโปรตีน BSA มาทำการทดลองต่อเพียงชนิดเดียวก่อน

จากนั้นทำการผสมสารละลายโปรตีนBSAกับสารละลายสี Remazol Brilliant Blue R ให้มีอัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีเป็น 1:10 และไม่ใส่ loading buffer ทำการปิเปต Stained protein ลงในช่องแผ่นเจล ช่องละ 3.0 , 2.5 , 2.0 , 1.5 , 1.0 , 0.5 µL ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า การที่ความเข้มข้นของสีมากกว่าโปรตีนถึง 10 เท่า มีผลทำให้เกิดสีส่วนเกิน (dye front) ตกลงมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งเกิดจากสีส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับโปรตีน และการไม่ใส่ loading buffer มีผลต่อความคมชัดของแถบโปรตีน ทำให้ทราบได้ว่าในส่วนผสมของ loading buffer ต้องมีสารที่ส่งผลต่อสภาพของโปรตีน ทำให้โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลง ดังรูปที่ 4.6

รูปที่ 4.6 แสดงแถบโปรตีน BSA ที่อัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีเป็น 1:10

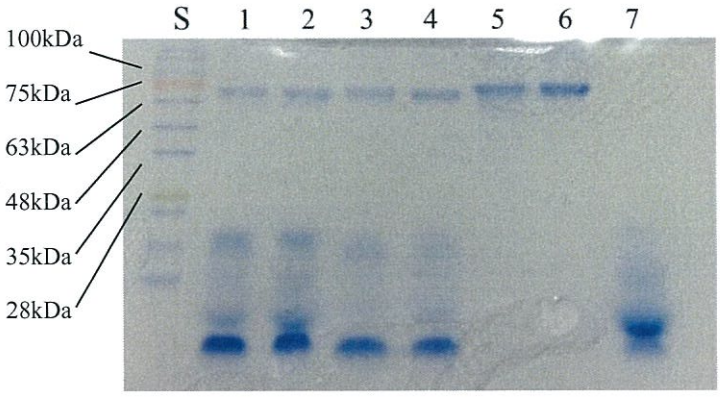
ช่องS: standard protein marker ช่อง1: 3.0 µL ช่อง2: 2.5 µL

ช่อง3: 2.0 µL ช่อง4: 1.5 µL ช่อง5: 1.0 µL

ช่อง6: 0.5 µL

จากนั้นจึงได้ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีน BSA ต่อสี เป็น 1:15 , 1:10 และ 1:5 โดยใส่ loading buffer ที่มี DTT เป็นส่วนผสมและทำการทดสอบการต้มและไม่ต้มของทั้ง 3 สัดส่วนความเข้มข้น และทำการปิเปตเฉพาะแค่สีย้อม จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.7พบว่าที่สัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีเป็น 1:5 นั้น สีสามารถจับโปรตีนได้พอดี ไม่เกิดสีส่วนเกินลงมา แต่แถบของโปรตีนยังไม่มีความคมชัดมากพอ และในส่วนของการต้ม พบว่า การไม่ต้ม จะทำให้โปรตีนจับกับสีย้อมได้ดีกว่าการต้ม ซึ่งสังเกตได้จากความเข้มของสี จากทั้ง 3 สัดส่วนความเข้มข้น

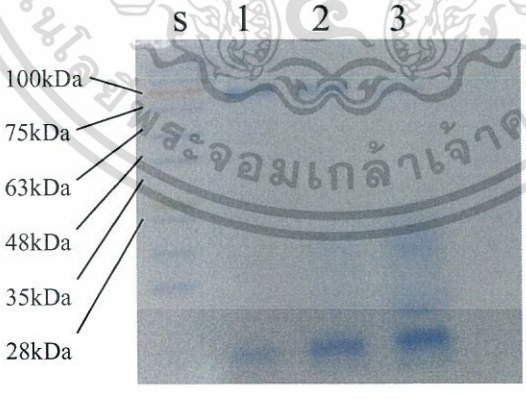
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงแถบของโปรตีน BSA ตามสัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสี ที่ทำการทดสอบ การต้มโปรตีนและไม่ต้มโปรตีน ก่อนปิเปตลงในแผ่นเจล

ช่องS: standard protein marker ช่อง1: 1:15 ต้ม ช่อง2: 1:15 ไม่ต้ม
ช่อง3: 1:10 ต้ม ช่อง4: 1:10 ไม่ต้ม ช่อง5: 1:5 ต้ม
ช่อง6: 1:5 ไม่ต้ม ช่อง7: สีที่ไม่มีโปรตีน

ซึ่งจากผลการทดลองที่ 4.7 จึงได้ทำเปรียบเทียบอัตราส่วนความเข้มข้นของโปรตีน BSA ต่อสี เป็น เป็น 1:3 , 1:5 และ 1:10 โดยใส่ loading buffer มี DTT เป็นส่วนผสม เพื่อจะหาสัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนกับสีที่เหมาะสม จากการทดลองพบว่า ที่สัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีเป็น 1:3 มีความชัดเจนใกล้เคียงกับ 1:5 แต่สัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสี1:3 เกิดสีส่วนเกินน้อยกว่าจึงเหมาะสมกว่า ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงแถบของโปรตีน BSA ตามสัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสีที่ความเข้มข้นต่างๆ

ช่องS: standard protein marker ช่อง1: 1:3 ช่อง2: 1:5 ช่อง3: 1:10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

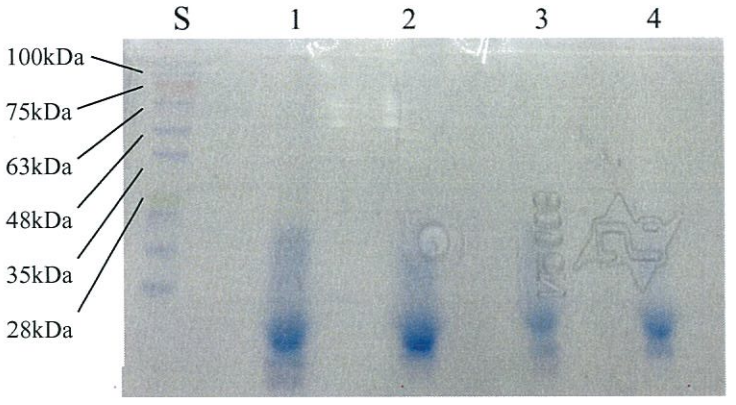
จากผลการทดลองข้างต้น ซึ่งยังไม่เป็นที่น่าพอใจ จึงได้ทำการเปลี่ยนวิธีการเตรียม stained BSA protein โดยนำโปรตีน BSA ที่ละลายใน Na_2Co_3 (pH10) ผสมกับ10%SDS และ 1M DTT นำไปให้ความร้อน 95°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำเติมสี Remazol Brilliant Blue R ที่ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปบ่ม 50°C แบ่งเป็น 4 ชั่วโมง และมากกว่า 16 ชั่วโมง (overnight) แล้วจึงเติม lysine ซึ่งเป็นตัวหยุดปฏิกิริยา นำไปบ่มที่ 50°C ต่ออีก 10 นาที แล้วจึงเติม 75% glycerol และ 0.5EDTAโดยความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนก่อนที่จะปิเปตลงในช่องของแผ่นเจลเป็น 0.55 µg/µL และความเข้มข้นสุดท้ายของสีย้อมเป็น 5.0 µg/µL ได้สัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีน BSA ต่อสี เป็น 1:10 จากผลการทดลองพบว่า วิธีการเตรียม stained BSA protein ใหม่นี้ สีย้อมไม่ติดกับโปรตีน จึงเกิดความสงสัยว่าค่า pH ของสารละลายโปรตีนในขณะที่โปรตีนทำปฏิกิริยากับสีย้อมมีค่า pH ต่ำกว่า 10 จึงทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาในการติดสีของโปรตีน ดังรูปที่ 4.9

รูปที่ 4.9 แสดงแถบของโปรตีน BSA ที่สัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนต่อสี 1:10 ทำการบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และมากกว่า 16 ชั่วโมง (overnight) แล้วเติม lysine

ช่องS: standard protein marker ช่อง1: 1 µL บ่ม 4 hrs
ช่อง2: 1 µL บ่ม overnight ช่อง3: 2 µL บ่ม 4 hrs
ช่อง4: 2 µL บ่ม overnight

จากผลการทดลองรูปที่ 4.9 จึงได้มีการเติม 0.5M Na_2CO_3 เพื่อปรับ pH ให้ใกล้เคียง pH10 เปรียบเทียบระยะเวลาการบ่มเป็น 4 ชั่วโมงและมากกว่า 16 ชั่วโมง (overnight) แต่แบ่งโปรตีนออกเป็นแบบเติม lysine กับแบบไม่เติม lysine เนื่องจากคาดว่า lysine ส่งผลให้โปรตีนไม่ติดสี จากผลการทดลอง ไม่สามารถมองเห็นแถบของโปรตีนได้ แสดงให้เห็นว่า lysine ไม่มีผลต่อต่อการที่โปรตีนไม่ติดสี ดังรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงแถบของโปรตีน BSA ที่เปรียบเทียบระหว่างการเติม lysine และไม่เติม lysine

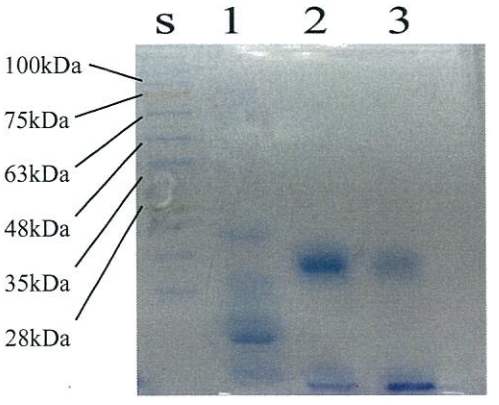
ช่องS: standard protein marker
ช่อง1: 2µL บ่ม overnightใส่ lysine
ช่อง2: 2µL บ่ม overnightไม่ใส่ lysine
ช่อง3: 2µL บ่ม 4hrsใส่ lysine
ช่อง4: 2µL บ่ม 4hrs ไม่ใส่ lysine

จากผลการทดลองรูปที่ 4.10 จึงทำการย้อมสีแผ่นเจลด้วย Coomassie Blue เพื่อตรวจสอบแถบของโปรตีนที่อาจติดอยู่บนแผ่นเจล พบว่า เห็นแถบของโปรตีนอยู่ลางๆ ในช่วง 66 kDa ซึ่ง เป็นช่วงน้ำหนักของโปรตีน BSA ดังรูปที่ 4.11

รูปที่ 4.11 แสดงผลการย้อมด้วยสี Coomassie Blue เพื่อตรวจหาแถบของโปรตีนจากผลการทดลอง

จากผลการทดลองรูปที่ 4.10 และ รูปที่ 4.11 จึงเกิดข้อสงสัยเกี่ยวกับการเติม DTT ในขั้นตอนการนำไปให้ความร้อนก่อนที่จะเติมสีย้อม และผลของ DTT ที่มีต่อการติดสีของโปรตีน จากการทดลองพบแถบของโปรตีนในลักษณะที่แตกต่าง โดยการใส่ DTT ปริมาณ 5 µL แล้วนำไปต้ม 95°C 3นาที แถบของโปรตีนมีความคมชัดมาก แต่น้ำหนักของโปรตีนกลับเพิ่มขึ้น แตกต่างจากอีก 2 ช่องที่มีการเติม DTT 1.8 µl และไม่มีการเติม DTT ก่อนการนำไปต้ม 95°C 3นาที จึงสามารถสรุปได้ว่า การใส่ DTT แล้วนำไปต้ม มีผลต่อความคมชัดของแถบโปรตีน ดังรูปที่ 12

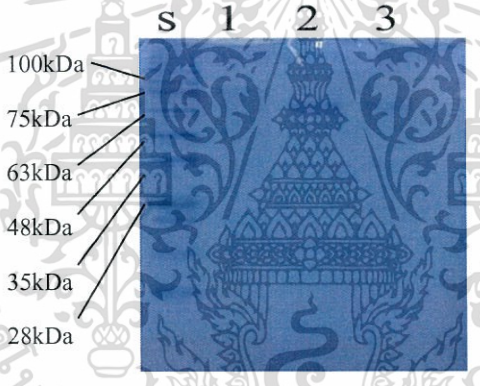
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงแถบของโปรตีน BSA ที่มีผลมาจากการเติม DTT ในปริมาตรต่างๆ

ช่องS: standard protein marker ช่อง1: ใส่ DTT ปริมาณเท่าเดิม 5 µL นำไปต้ม
ช่อง2: ใส่ DTT ปริมาณ 1.8 µL นำไปต้ม ช่อง3: ใส่ DTT ตอนหลังพร้อมกับ loading buffer

จากผลการทดลองรูปที่ 4.12 ก็ยังไม่สามารถเห็นแถบของโปรตีนได้จึงทดสอบด้วยการย้อมด้วยสี Coomassie Blue ดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงผลการย้อมด้วยสี Coomassie Blue เพื่อตรวจหาแถบของโปรตีนจากการเติม DTT ในปริมาตรต่างๆ

จากผลการทดลองข้างต้น จึงได้ทำการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบสภาวะต่างๆที่ส่งผลต่อความคมชัดของแถบโปรตีนและการติดสีของแถบโปรตีน

1. สัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนกับสีย้อม เป็น 1:3 และ 1:5

2. การเติม lysine และ ไม่เติม lysine

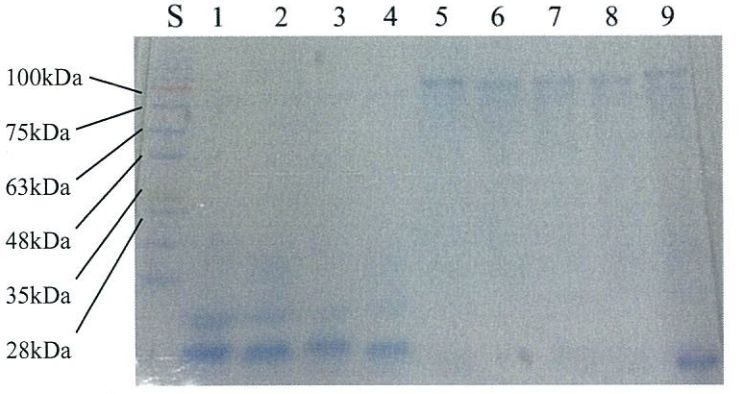
3. ระยะเวลาการต้ม 95°C 3 นาที และ 10 นาที ก่อนการเติมสีย้อม

4. การใส่ DTT ปริมาตร 3 µL , 5 µL และ 10 µL แล้วต้ม 95°C 10นาที จึงค่อยทำการปิเปตลงในช่องของแผ่นเจล , ใส่DTT หลังจากเติมสีย้อมแล้วต้ม 95°C 10นาที , ไม่เติม DTT เลย

5. ใช้สีที่ละลายในน้ำบริสุทธิ์ กับ สีที่ละลายใน10% SDS

6. ใส่ loading buffer แล้วต้มกับไม่ต้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดงแถบของโปรตีน BSA จากการ load 2 µL

ช่องS: standard protein marker

ช่อง1: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5, Dyeละลายใน 10%SDS, ใส่loading buffer แล้วต้ม 95'C 15นาที

ช่อง2: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5, Dyeละลายใน 10%SDS, ใส่ loading buffer แล้วต้ม 95'C 15นาที, เติม lysine 0.01M

ช่อง3: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3, Dyeละลายใน 10%SDS, ใส่ loading buffer แล้วต้ม 95'C 15นาที

ช่อง4: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5, Dyeละลายใน 10%SDS, ใส่ loading buffer แล้วต้ม 95'C 10นาที, เติมlysine 0.01M

ช่อง5: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3, Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที, เติม lysine 0.01 M

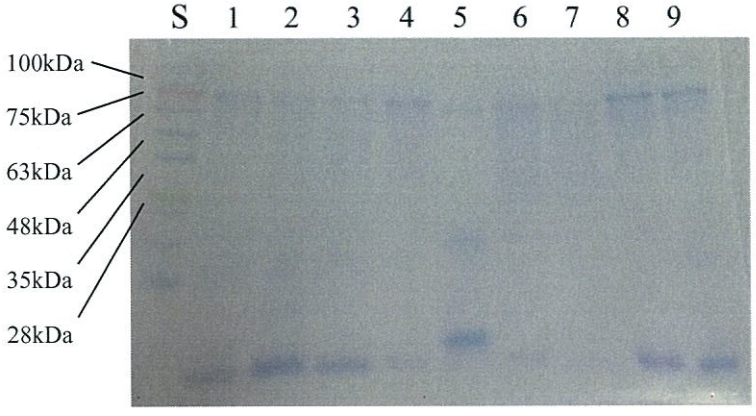
ช่อง6: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3, Dyeละลายใน H_20,ต้ม 95'C 3นาที

ช่อง7: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3, Dye ละลายใน H_20, ต้ม 95'C 10นาที,เติม lysine 0.01 M

ช่อง8: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3, Dyeละลายใน H_20, ต้ม95'C 10นาที

ช่อง9: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5, Dyeละลายใน H_20, ต้ม95'C 3นาที,เติม lysine 0.01 M

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 แสดงแถบของโปรตีน BSA จากการ load 2 µL

ช่องS: standard protein marker

ช่อง1: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที

ช่อง2: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม95'C 10นาที,เติม lysine 0.01 M

ช่อง3: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม95'C 10นาที

ช่อง4: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน H_20, ต้ม95'C 3นาที,เติม lysine 0.01 M,เติมDTT 0.03 M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง5: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที,เติม1M DTT แล้วต้ม95'C 10นาที

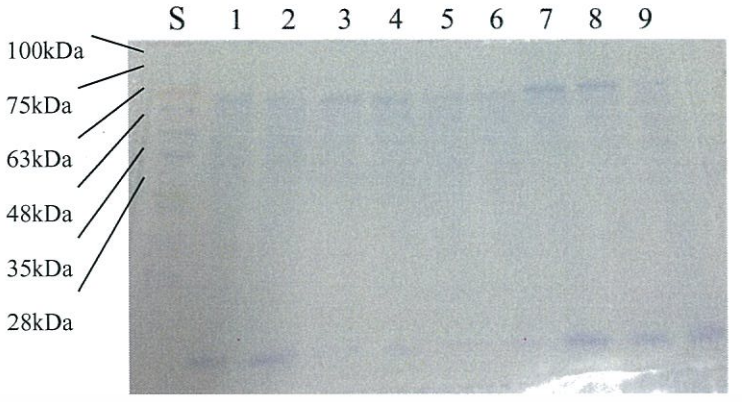
ช่อง6: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 10นาที, เติม lysine 0.01 M,ใส่DTT 0.03M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง7: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน H_20,ต้ม 95'C 10นาที,ใส่DTT 0.03M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง8: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที, เติม lysine 0.01 M,ใส่DTT 0.03M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง9: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที,ใส่DTT 0.03M แล้วต้ม95'C 10นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แสดงแถบของโปรตีน BSA จากการ load 2 µL

ช่องS: Standard Protein marker

ช่อง1: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 10นาที, เติม lysine 0.01 M,ใส่DTT 0.03M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง2: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 10นาที,ใส่DTT 0.03M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง3: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที, เติม lysine 0.01 M,ใส่DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง4: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที,ใส่DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง5: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 10นาที, เติม lysine 0.01 M,ใส่DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

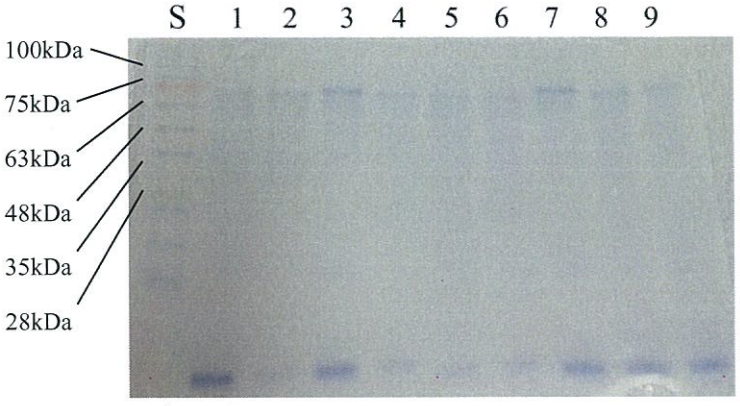
ช่อง6: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 10นาที,ใส่DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง7: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที, เติม lysine 0.01 M,ใส่DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง8: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 3นาที,ใส่DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง9: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 10นาที, เติม lysine 0.01 M,ใส่DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แสดงแถบของโปรตีน BSA จากการ load 2 µL

ช่องS: Standard protein marker

ช่อง1: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน H_20, ต้ม 95'C 10นาที ใส่DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง2: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน 10% SDS, ต้ม 95'C 3นาที ใส่ DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง3: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน 10% SDS, ต้ม 95'C 3นาที ใส่ DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง4: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน 10% SDS, ต้ม 95'C 3นาที ใส่ DTT 0.10M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง5: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน 10% SDS, ต้ม 95'C 10นาที ใส่ DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

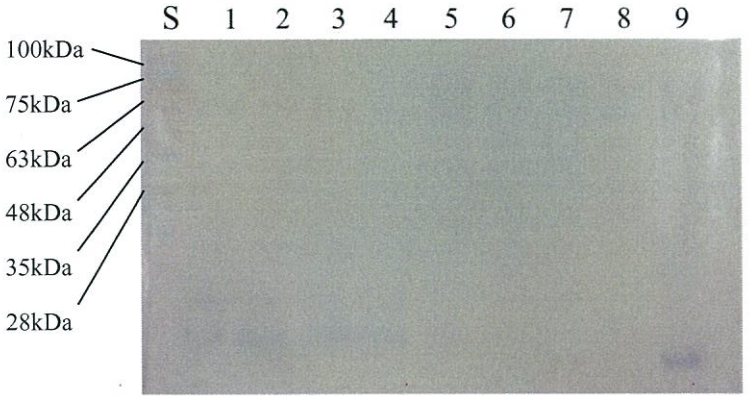
ช่อง6: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:3,Dyeละลายใน 10% SDS, ต้ม 95'C 10นาที ใส่ DTT 0.10M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง7: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน 10% SDS, ต้ม 95'C 3นาที ใส่ DTT 0.10M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง8: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน 10% SDS, ต้ม 95'C 10นาที ใส่ DTT 0.05M แล้วต้ม95'C 10นาที

ช่อง9: อัตราส่วนความเข้มข้นโปรตีนต่อสีเป็น 1:5,Dyeละลายใน 10% SDS, ต้ม 95'C 10นาที ใส่ DTT 0.10M แล้วต้ม95'C 10นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 ผลการ Blotting ของแผ่นเจลในรูป 4.14

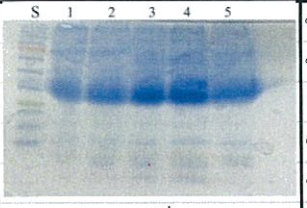
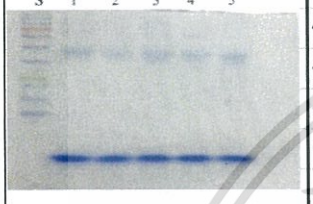
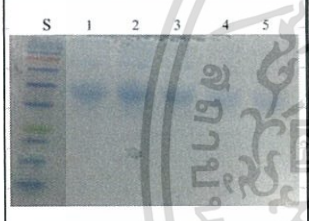
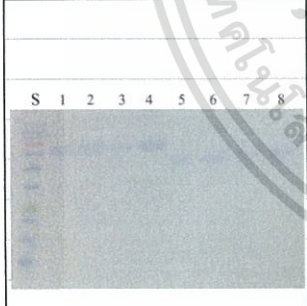
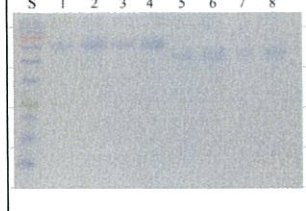
จากการทดลอง สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การเติม lysine ช่วยให้สีย้อมติดกับโปรตีนได้ดีขึ้น
2. การละลายสีย้อมในน้ำบริสุทธิ์หรือ10%SDS มีผลที่ไม่แตกต่างกัน
3. การเติม DTT ที่ 0.03M , 0.05M และ 0.10M ความคมชัดของแถบโปรตีนและการติดสีไม่แตกต่างกัน
4. การไม่เติม DTT สีย้อมติดกับโปรตีนได้ดีขึ้น แต่มีผลให้แถบโปรตีนมีความคมชัดน้อยลง
5. ระยะเวลาการต้ม 3 นาทีกับ 10 นาที ให้ผลไม่แตกต่างกัน
6. การใส่ loading buffer แล้วต้ม สีย้อมติดกับโปรตีนน้อยลง
7. สัดส่วนความเข้มข้นของสีย้อมโปรตีน ที่ 1:5 เห็นแถบของโปรตีนชัดขึ้น แต่ก็มีสีตกลงมาเยอะด้วย ในขณะที่ความเข้มข้น 1:3 ในการทำแบบ 1:3,Dye(ในน้ำ),95'C 3นาที,+lysine ผลที่ได้ไม่เกิดสีตกลงมา และแถบของโปรตีนมีสีที่ชัดเจนอีกด้วย จึงถือเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด

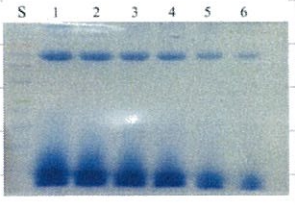
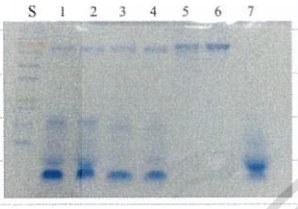
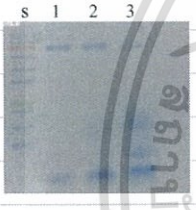
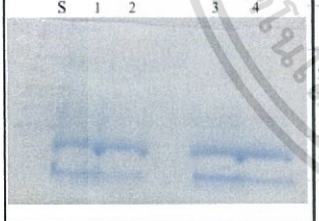
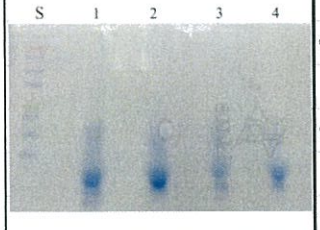
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ตารางผลการทดลอง

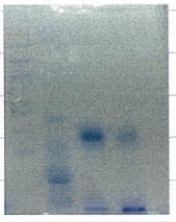
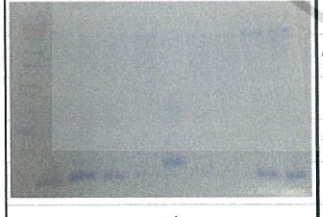
4.2 ตารางผลการทดลอง

ผลการทดลอง	ส่วนผสม
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: Ovalbumin 16.67µg/µL +Dye 1.00 µg/µL บ่ม 50°C 30นาที ในปริมาตร 20 µL
	ช่อง2: Ovalbumin 16.67µg/µL +Dye 1.34 µg/µL บ่ม 50°C 30นาที ในปริมาตร 20 µL
	ช่อง3: Ovalbumin 16.67µg/µL +Dye 1.67 µg/µL บ่ม 50°C 30นาที ในปริมาตร 20 µL
	ช่อง4: Ovalbumin 16.67µg/µL +Dye 2.00 µg/µL บ่ม 50°C 30นาที ในปริมาตร 20 µL
จากรูปที่ 4.1	ช่อง5: Ovalbumin 16.67µg/µL +Dye 2.34 µg/µL บ่ม 50°C 30นาที ในปริมาตร 20 µL
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: Ovalbumin0.38µg/µL+Dye 0.14µg/µL บ่ม 50°C 30นาที +5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง2: Ovalbumin 0.38µg/µL+Dye 0.19µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง3: Ovalbumin0.38µg/µL+Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง4: Ovalbumin0.38µg/µL +Dye 0.29µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง5: Ovalbumin0.38µg/µL +Dye 0.34µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
จากรูปที่ 4.2	5X loading buffer (1M Tris-HCl (pH6.8), 50%Glycerol, 10%SDS, 2-mercaptoethanol,Bromophenol blue,H_2O)
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: Ovalbumin0.38µg/µL+Dye 0.14µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง2: Ovalbumin 0.38µg/µL+Dye 0.19µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง3: Ovalbumin0.38µg/µL+Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง4: Ovalbumin0.38µg/µL +Dye 0.29µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง5: Ovalbumin0.38µg/µL +Dye 0.34µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
จากรูปที่ 4.3	5X loading buffer โดยไม่มี Bromophenol blue
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: BSA 0.38µg/µL +Dye 0.24 µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5 µL
	ช่อง2: BSA 0.38µg/µL +Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 10 µL
	ช่อง3: BSA 0.38µg/µL +Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5 µL
	ช่อง4: BSA0.38µg/µL +Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 10 µL
	ช่อง5: Ovalbumin0.38µg/µL+Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง6: Ovalbumin 0.38µg/µL+Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร10µL
	ช่อง7: Ovalbumin0.38µg/µL+Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง8: Ovalbumin0.38µg/µL +Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+5X loading bufferในปริมาตร10µL
จากรูปที่ 4.4	5X loading buffer โดยไม่มี Bromophenol blue
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: BSA 0.38µg/µL +Dye 0.24 µg/µL บ่ม 50°C 30นาที +loading bufferในปริมาตร 5 µL
	ช่อง2: BSA 0.38µg/µL +Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+loading bufferในปริมาตร 10 µL
	ช่อง3: BSA 0.38µg/µL +Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+loading bufferในปริมาตร 5 µL
	ช่อง4: BSA0.38µg/µL +Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+loading bufferในปริมาตร 10 µL
	ช่อง5: Ovalbumin0.38µg/µL+Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง6: Ovalbumin 0.38µg/µL+Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+loading bufferในปริมาตร10µL
	ช่อง7: Ovalbumin0.38µg/µL+Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+loading bufferในปริมาตร 5µL
	ช่อง8: Ovalbumin0.38µg/µL +Dye 0.24µg/µL บ่ม 50°C 30นาที+loading bufferในปริมาตร10µL
จากรูปที่ 4.5	loading buffer(75%glycerol,10%SDS, 1M Tris pH6.8, 1M DTT, 0.5 EDTA ,H2O)

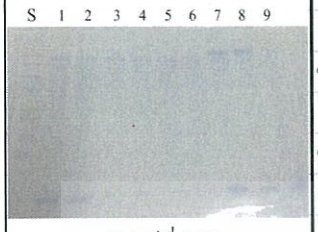
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: BSA 3.34µg/µL +Dye 30 µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง ในปริมาตร 3 µL
	ช่อง2: BSA 3.34µg/µL +Dye 30µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมงในปริมาตร 2.5 µL
	ช่อง3: BSA 3.34µg/µL +Dye 30µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง4: BSA 3.34µg/µL +Dye 30µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง ในปริมาตร 1.5 µL
	ช่อง5: BSA 3.34µg/µL +Dye 30µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง ในปริมาตร 1 µL
จากรูปที่ 4.6	ช่อง6: BSA 3.34µg/µL +Dye 30µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง ในปริมาตร 0.5 µL
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: BSA 0.55µg/µL +Dye 8.25 µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง2: BSA 0.55µg/µL +Dye 8.25µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง3: BSA 0.55µg/µL +Dye 5.5µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง4: BSA 0.55µg/µL +Dye 5.5µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง5: BSA 0.55µg/µL +Dye 2.75µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง6: BSA 0.55µg/µL +Dye 2.75µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading bufferในปริมาตร 2 µL
จากรูปที่ 4.7	ช่อง7: Dye 60µg/µL ในปริมาตร 2 µL
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: BSA 0.55µg/µL +Dye 1.65 µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง2: BSA 0.55µg/µL +Dye 2.75µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง3: BSA 0.55µg/µL +Dye 5.5µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL
จากรูปที่ 4.8	
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: BSA 0.55µg/µL+10%SDS+DTT 0.14M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µLบ่ม50°Cมากกว่า16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง2: BSA 0.55µg/µL+10%SDS+DTT 0.14M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µLบ่ม50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง3: BSA 0.55µg/µL+10%SDS+DTT 0.14M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µL บ่ม50°C 4 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 4 µL
	ช่อง4: BSA 0.55µg/µL+10%SDS+DTT 0.14M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µLบ่ม50°C 4 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 4 µL
จากรูปที่ 4.9	
	ช่องS: standard proteins
	ช่อง1: BSA 0.55µg/µL+10%SDS+DTT 0.14M +Na_2CO_3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µL บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง2: BSA 0.55µg/µL+10%SDS+DTT 0.14M +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µL บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL
	ช่อง3: BSA 0.55µg/µL+10%SDS+DTT 0.14M +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µL บ่ม 50°C 4ชั่วโมง +lysine0.01M+75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 4 µL
	ช่อง4: BSA 0.55µg/µL+10%SDS+DTT 0.14M +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µL บ่ม 50°C 4ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 4 µL
จากรูปที่ 4.10	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S 1 2 3  จากรูปที่ 4.12	ช่องS: standard proteins ช่อง1: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na_2CO_3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA +DTT 0.05M ในปริมาตร 2 µL ช่อง2: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na_2CO_3 0.05M +DTT 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง+lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL ช่อง3: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na_2CO_3 0.05M +DTT 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 5.5 µg/µL บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL
S 1 2 3 4 5 6 7 8 9 จากรูปที่ 4.14	ช่องS: standard proteins ช่อง1: BSA 0.55µg/µL +Dye 2.75 µg/µl บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL ช่อง2: BSA 0.55µg/µL +Dye 2.75 µg/µl บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer+lysine0.01M ในปริมาตร 2µL ช่อง3: BSA 0.55µg/µL +Dye 1.65 µg/µ บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer ในปริมาตร 2 µL ช่อง4: BSA 0.55µg/µL +Dye 1.65 µg/µl บ่ม50°Cมากกว่า 16 ชั่วโมง +loading buffer+lysine0.01M ในปริมาตร 2µL ช่อง5: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 1.65 µg/µl บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8+0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL ช่อง6: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 1.65 µg/µl บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL ช่อง7: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 1.65 µg/µl บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8+0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL ช่อง8: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 1.65 µg/µl บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8+0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL ช่อง9: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 2.75 µg/µl บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง+lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8+0.5M EDTA ในปริมาตร2µL
S 1 2 3 4 5 6 7 8 9  จากรูปที่ 4.15	ช่องS: standard proteins ช่อง1: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 2.75 µg/µl บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8+0.5M EDTA ในปริมาตร2µL ช่อง2: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 2.75 µg/µl บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8+0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL ช่อง3: BSA 0.55µg/µL +10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 2.75 µg/µl บ่ม50°C มากกว่า 16 ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8+0.5M EDTA ในปริมาตร 2 µL ช่อง4: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.03M ในปริมาตร 2µL ช่อง5: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.03M ในปริมาตร 2µL ช่อง6: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.03M ในปริมาตร 2µL ช่อง7: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.03M ในปริมาตร 2µL ช่อง8: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.03M ในปริมาตร 2µL ช่อง9: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.03M ในปริมาตร 2µL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



จากรูปที่ 4.16

ช่องS: standard proteins

ช่อง1: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.03M ในปริมาตร 2µL

ช่อง2: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.03M ในปริมาตร 2µL

ช่อง3: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง4: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

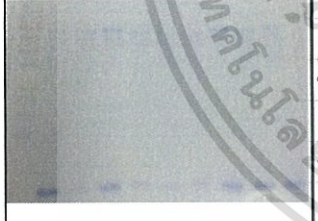
ช่อง5: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง6: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง7: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง8: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง9: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +lysine0.01M +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL



จากรูปที่ 4.17

ช่องS: standard proteins

ช่อง1: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง2: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง3: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.1M ในปริมาตร 2µL

ช่อง4: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง5: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 1.65 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.1M ในปริมาตร 2µL

ช่อง6: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง7: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 3นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.1M ในปริมาตร 2µL

ช่อง8: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.05M ในปริมาตร 2µL

ช่อง9: BSA 0.55µg/µL+10%SDS +Na2CO3 0.05M Incubate 95°C 10นาที +Dye 2.75 µg/µLบ่ม 50°Cมากกว่า 16ชั่วโมง +75%glycerol +1M Tris pH6.8 +0.5M EDTA+ DTT 0.1M ในปริมาตร 2µL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองผลิต prestained protein ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมซึ่งส่งผลต่อความ คมชัดของแถบโปรตีนและการติดสีของโปรตีน โดยวิธีการทดลองที่ให้ผลใกล้เคียงกับโปรตีนมาตรฐานที่สุดก็คือ การนำโปรตีนมาผสมกับสีย้อมโดยให้อัตราความเข้มข้นของสีย้อมต่อโปรตีนที่เป็น 3:1 ซึ่งสารละลายสีย้อมจะละลายในน้ำบริสุทธิ์หรือสารละลาย SDS ก็ได้โดยให้ผลไม่แตกต่างกัน และเมื่อผสมแล้วต้องให้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนเป็น 0.55 µg/µL จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที และไม่ต้องใส่ DTT ต่อด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C แบบ overnight จากนั้นจึงใส่ lysine เพื่อหยุดปฏิกิริยาของสีย้อมกับโปรตีน และเมื่อจะปิเปตลงในแผ่นเจลต้องใส่ loading buffer ทุกครั้ง

5.2 วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองผลิต prestained protein ผลที่ได้ยังมีความแตกต่างกับ prestained protein standard อยู่พอสมควร ทั้งขนาดของแถบโปรตีนและความเข้มของสีย้อมที่ติดกับโปรตีนเมื่อทำการเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่มีขนาดเดียวกัน นอกจากนี้ในการทดลองควรมีการเพิ่มชนิดของโปรตีนและชนิดของสีย้อม เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองให้น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, 2530. **ชีวเคมี ฉบับ 2530**, พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 107-145, กรุงเทพฯ:ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ชนิดและหน้าที่ของโปรตีน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

http://www.thaigoodview.com/library/contest2552/type2/science04/28/P_Untitled-20.html [สืบค้นเมื่อ 4 พฤศจิกายน 2558]

การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Gel electrophoresis of protein). [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=21 [สืบค้นเมื่อ 4 พฤศจิกายน 2558]

Western Blot. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=18 [สืบค้นเมื่อ 4 พฤศจิกายน 2558]

โครงสร้างของโปรตีน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

http://vichakarn.triamudom.ac.th/comtech/studentproject/final54/832BioTec/bio/Website%20(BioBiomolec)/Protein.html [สืบค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2558]

กรดอะมิโน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

http://science.srru.ac.th/org/sci-elearning/courseonline/4022503/chapter5-amino1.htm [สืบค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2558]

การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน / Protein denaturation. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0936/protein-denaturation-การสูญเสียสภาพการสูญเสียสภาพธรรมชาติ [สืบค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2558]

การเติมเกลือในสารละลายโปรตีน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1820/salting-out [สืบค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2558]

สีรีแอกทีฟ (reactive dye). [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

http://www.tpa.or.th/writer/read_this_book_topic.php?pageid=6&bookID=370&read=true&count=true [สืบค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2558]

Prestained Protein MW Marker. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/catalog/1802_prestained_protein_mw_marker.html [สืบค้นเมื่อ 18 พฤศจิกายน 2558]

Mark, M., Stacey, J. and Ron, P. 2002. **Generation of multicolored, prestained molecular weight markers for gel electrophoresis.** Electrophoresis. 23, 3262–3265.

Marco, A., Matthew, T., Armando, G., Silvia, V. and Robert, W. 2012. **Accelerated Identification of Proteins by Mass Spectrometry by Employing Covalent Pre-Gel Staining with Uniblue A.** PLoS ONE. 7(2), e31438.

Gopal, G., Thallampuranam, K., Shanmugiah, P. and Chin, Y. 2000. **Rapid staining of proteins on polyacrylamide gels and nitrocellulose membranes using a mixture of fluorescent dyes.** J. Biochem. Biophys. Methods. 46(2000), 31-38.

Peter, W. and Alfredo, R. 1995. **Staining methods in gel electrophoresis, including the use of multiple detection methods.** Journal of Chromatography A. 698(1995), 123-143.

Dong M. 2006. **Highly homogeneous molecular markers for electrophoresis.** U.S patent no. WO2006138366A2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมี

ก-1 การเตรียม Na_2CO_3 ที่มีความเข้มข้น 0.1M pH 10

ชั่ง Na_2CO_3 หนัก 413 mg. ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 50mL

ก-2 การเตรียม Sodium Dodecyl Sulfate (10% SDS)

ชั่ง SDS 2 g ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 20 ml. จากนั้นละลายให้เข้ากัน

ก-3 การเตรียมสีย้อม Reactive Blue Dye(Conc. 10 µg/µL)

ชั่งสีย้อม Reactive Blue Dye 105.9 mg. ละลายใน 10%SDS 10.59 mL

ก-4 การเตรียมสีย้อม Reactive Blue Dye (Conc. 60 µg/µL)

ชั่งสีย้อม Reactive Blue Dye 0.0636 mg. ละลายใน10% SDS 1.06 mL

ก-5 การเตรียม BSA Protein (Conc. 40 µg/µL)

ชั่งBSA Protein มา 393 mg. ละลายใน Na_2CO_3 9.825 mL

ก-6 การเตรียม L-lysine (Conc. 0.1M)

ชั่ง L-lysine หนัก 0.0136 g เติมน้ำบริสุทธิ์ 0.325mL

ก-7 การเตรียม Ovalbumin Protein (Conc. 40 µg/µL)

ชั่ง Ovalbumin Protein หนัก501.6 mg. ละลายใน Na_2CO_3 12.54 mL

ก-8 การเตรียม Na_2CO_3 ที่มีความเข้มข้น 0.5M

ชั่ง Na_2CO_3 หนัก 186.7 mg. ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 3.5 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

อัตราส่วนการเตรียมพอลิอะคลิลาไมด์เจล

ตารางที่ ข-1 สัดส่วนการเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจล

	ปริมาตรทั้งหมด							
COMPONENTS	5mL	10mL	15 mL	20mL	25mL	30mL	35mL	40mL
6% gel								
H_2O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
Acrylamide mix 30%	1	2	3	4	5	6	8	10
1.5M Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Ammonnium Persulfate(10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% gel								
H_2O	2.3	4.6	6.9	5.3	11.5	13.9	18.5	23.2
Acrylamide mix 30%	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.3
1.5M Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Ammonnium Persulfate(10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% gel								
H_2O	1.9	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
Acrylamide mix 30%	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.7
1.5M Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Ammonnium Persulfate(10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ปริมาตรทั้งหมด							
COMPONENTS	5mL	10mL	15 mL	20mL	25mL	30mL	35mL	40mL
12% gel								
H_2O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
Acrylamide mix 30%	2	4	6	8	10	12	16	20
1.5M Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Ammonnium Persulfate(10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%gel								
H_2O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
Acrylamide mix 30%	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
1.5M Tris (pH8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
Ammonnium Persulfate(10%)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

ตารางที่ ข-2 การเตรียม 5% stacking gels for Tris-glysine SDS PAGE

	ปริมาตรทั้งหมด							
COMPONENTS	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
H_2O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.7
Acrylamide mix 30%	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
1.5M Tris (pH8.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
Ammonnium Persulfate(10%)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้