เทคนิคอย่างรวดเร็วและประหยัด ในการหาสภาวะดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ

Rapid and Cost Effective Techniques to Determine Binding Conditions of Protein on Ion Exchanger

เทพปัญญา เจริญรัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12121

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักและวิศวกรรมชีวเคมี หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120

กรวิชญ์ จิ๋วสวัสดิ์ และ นิติ พานิชเกษม

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12121

พรรณทิพย์ วรเดชวิทยา

แผนกวิจัยและพัฒนา กลุ่มงานพัฒนาวิธีวิเคราะห์ 1 บริษัท ฟาร์มา นูวา จำกัด เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ

การแลกเปลี่ยนประจุเป็นเทคนิคที่มีการประยุกต์ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ซึ่งอาจดำเนินการในรูปแบบโครมาโตกราฟีแบบฐานคงที่ หรือโครมาโตกราฟีแบบฐานขยาย อย่างไรก็ตาม การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับในคอลัมน์โดยตรงต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง งานวิจัยนี้จึงเสนอเทคนิคที่รวดเร็วและประหยัดในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ โดยไม่จำเป็นต้องทราบค่าพีไอของโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งเมื่อทำการทดสอบเทคนิคที่นำเสนอโดยการหาสภาวะในการดูดซับโปรตีน 3 ระบบ คือ 1) การดูดซับไลโซไซม์ด้วย Streamline SP 2) การดูดซับรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสด้วย Streamline Direct HST1 และ 3) การดูดซับโปรตีนไฟโคไซยานินด้วย Streamline Direct HST1 พบว่าเทคนิคนี้สามารถประยุกต์ได้เป็นอย่างดีกับโปรตีนที่ใช้ทดสอบทั้ง 3 ระบบ ดังนั้น เทคนิคที่นำเสนอนี้จึงควรจะสามารถประยุกต์กับระบบการดูดซับโปรตีนชนิดอื่นโดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุได้เช่นกัน

คำสำคัญ: การแลกเปลี่ยนประจุ สภาวะในการดูดซับ การแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์

Abstract

An ion exchange technique has been applied to use in protein purifications. It can be operated as fixed bed or expanded bed chromatography. However, the determination of optimum binding condition directly in the column is time consuming and expensive. This present investigation reports rapid and cost effective technique to determine the binding of protein to the ion exchanger, even without the knowledge of the isoelectric point of target protein. This technique has been tested to determine the optimum binding condition of 3 protein systems: 1) adsorption of lysozyme by Streamline SP, 2) adsorption of recombinant enzyme β-glucosidase by Streamline Direct HST1, and 3) adsorption of phycocyanin by Streamline Direct HST1. Thus, this technique should be possible to apply to other protein adsorption systems using ion exchanger.

Keywords: ion exchange, binding condition, protein separation

1. บทนำ

การแลกเปลี่ยนประจุเป็นหน่วยปฏิบัติการหนึ่งในวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพที่ใช้ในการแยกผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนให้บริสุทธิ์ ทั้งนี้อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนเป้าหมายและตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุเป็นแรงเนื่องจากความแตกต่างของประจุ ซึ่งขั้นตอนทั่วไปในการแยกโปรตีนโดยเทคนิคนี้ประกอบด้วย 1) การเตรียมตัวอย่างและตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ 2) การดูดซับโปรตีนเป้าหมายบนตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ 3) การล้างตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ถูกดูดซับ และ 4) การชะโปรตีนเป้าหมายออกจากตัวกลางดูดซับ [1] โดยขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากซึ่งประสิทธิภาพในการดูดซับมีความเกี่ยวข้องกับประจุของโปรตีนเป้าหมาย และค่าความเข้มข้นของเกลือในสารละลายที่โปรตีนเป้าหมายละลายอยู่

เนื่องจากโปรตีนสามารถแสดงออกทั้งประจุบวกและประจุลบขึ้นอยู่กับค่าไอโซอิเล็กตริก (พีไอ) ของโปรตีน และพีเอชของสารละลายที่โปรตีนละลายอยู่ โดยถ้าพีเอชของสารละลายมีค่ามากกว่าพีไอโปรตีนจะแสดงประจุลบ และถ้าพีเอชของสารละลายมีค่าน้อยกว่าพีไอโปรตีนจะแสดงประจุบวก ดังนั้น การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยการแลกเปลี่ยนประจุจึงสามารถใช้ทั้งการแลกเปลี่ยนประจุบวกและการแลกเปลี่ยนประจุลบ อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงความเสถียรของโปรตีนเป้าหมายร่วมด้วย ในกรณีที่รู้ค่าพีไอของโปรตีนเป้าหมายจะสามารถกำหนดพีเอชที่ใช้ในการดูดซับได้โดยอาศัยหลักการเบื้องต้น คือ กำหนดค่าพีเอชต่ำกว่าพีไอประมาณหนึ่งหน่วยสำหรับการแลกเปลี่ยนประจุบวก และกำหนดค่าพีเอชสูงกว่าพีไอประมาณหนึ่งหน่วยสำหรับการแลกเปลี่ยนประจุลบ สำหรับอิทธิพลของความเข้มข้นของเกลือ พบว่าไอออนของเกลือที่ละลายอยู่ในสารละลายสามารถรบกวนการจับกันระหว่างโปรตีนเป้าหมายกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ โดยมีการรายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการดูดซับของโปรตีนเป้าหมายโดยตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลดลง [2] ทั้งนี้สำหรับงานด้านการแลกเปลี่ยนประจุบางครั้งอาจพบ

การรายงานปริมาณเกลือที่ละลายอยู่ในสารละลายในรูปค่าการนำไฟฟ้าเนื่องจากเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเกลือที่วัดค่าได้ง่าย

ในปัจจุบันเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุมีการประยุกต์ในหลายรูปแบบ เช่น โครมาโตกราฟีแบบฐานคงที่ (fixed bed) [3] และโครมาโตกราฟีแบบฐานขยาย (expanded bed) [4] โดยพบว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับในคอลัมน์โดยตรงจะต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูงถึงแม้ว่าในปัจจุบันบริษัทผู้ผลิตตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุจะมีการผลิตคอลัมน์ขนาดเล็กเพื่อใช้สำหรับหาสภาวะในการดำเนินการโดยเฉพาะ ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงนำเสนอเทคนิคอย่างรวดเร็วและประหยัดในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ โดยไม่จำเป็นทราบค่าพีไอของโปรตีนเป้าหมาย

2. วัสดุและวิธีการทดลอง

แหล่งของโปรตีนตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

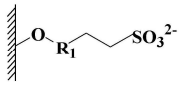
ในการวิจัยนี้เลือกใช้โปรตีนทดสอบ 3 ชนิด จาก 3 แหล่ง ที่มีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของชนิดของโปรตีน และคุณสมบัติของสารละลายที่โปรตีนละลายอยู่ เพื่อเป็นการยืนยันว่าระบบที่ออกแบบขึ้นสามารถประยุกต์กับโปรตีนที่หลากหลาย ดังนี้

- ไข่ขาวของไข่ไก่ เป็นแหล่งของไลโซไซม์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเพียง 1 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14 กิโลดาลตัน และมีค่าพีไอประมาณ 10.7 โดยไข่ขาวของไข่ไก่มีค่าพีเอชประมาณ 9.0-9.5 และมีค่าการนำไฟฟ้าประมาณ 8.60 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

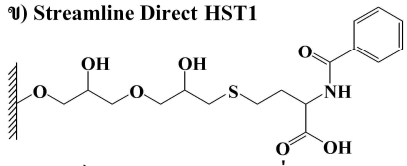
- ส่วนใสที่ได้จากการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Pichia pastoris* สายพันธุ์กลายที่มียีนเบต้ากลูโคสิเดส [2] เป็นแหล่งของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส ซึ่งมีค่าพีไอประมาณ 5.5 โดยโปรตีนชนิดนี้มี 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน โดยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 85 กิโลดาลตัน ทั้งนี้ ส่วนใสของน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* ในงานวิจัยนี้มีค่าพีเอชประมาณ 5.0 และมีค่าการนำไฟฟ้าประมาณ 18 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

- ส่วนใสที่ได้จากการนำสารแขวนลอยเซลล์สาหร่าย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 มาทำให้เซลล์แตกโดยวิธีแช่แข็ง-ละลายเป็นจำนวน 3 ครั้ง แล้วทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดกากเซลล์ เป็นแหล่งของโปรตีนไฟโคไซยานิน (phycocyanin) ซึ่งมีค่าพีไอประมาณ 4.64 โดยโปรตีนชนิดนี้มี 12 หน่วยย่อยที่ประกอบไปด้วยหน่วยย่อยชนิดแอลฟาและเบต้าอย่างละ 6 หน่วยย่อย โดยหน่วยย่อยชนิดแอลฟาและเบต้ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18 และ 17 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ทั้งนี้ ส่วนใสที่ได้จะมีค่าพีเอชประมาณ 7.0 และมีค่าการนำไฟฟ้าประมาณ 0.58 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายเซลล์สาหร่ายก่อนทำให้เซลล์แตก

ก) Streamline SP



ข) Streamline Direct HST1



รูปที่ 1 ลิแกนด์ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก ก) Streamline SP และ ข) Streamline Direct HST1

ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ

ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งหมดเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท GE Healthcare เมือง Uppsala ประเทศสวีเดน ได้แก่

- Streamline SP ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวกที่มีลิแกนด์เป็นหมู่ซัลโฟเนต (รูปที่ 1ก)

- Streamline Direct HST1 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวกที่มีหลายหมู่ฟังก์ชันประกอบกันเป็นลิแกนด์ (รูปที่ 1ข) ซึ่งบริษัทผู้ผลิตออกแบบขึ้นมาให้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงได้

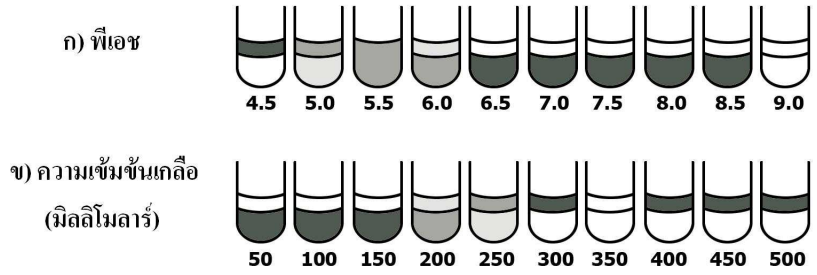
การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ

งานวิจัยนี้เป็นกระบวนการอย่างง่ายที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับโปรตีนของตัวกลางดูดซับ ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้ (รูปที่ 2)

1. เติมตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดประมาณ 5-10 หลอด

2. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำให้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุอิ่มตัว ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 0.05 โมลาร์ และมีพีเอชแตกต่างกัน 5-10 พีเอช โดยควรมีพีเอชในช่วง 5-9 สำหรับการแลกเปลี่ยนประจุลบ และพีเอช 4-8 สำหรับการแลกเปลี่ยนประจุบวก (ในงานวิจัยนี้ที่พีเอช 4.0-5.5 ใช้โซเดียมอะซิเทรตบัฟเฟอร์ และที่พีเอช 6.0-8.0 ใช้โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์)

3. ทำให้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุอิ่มตัวครั้งที่ 1 โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละพีเอชลงในแต่ละหลอดจากข้อ 1 หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ใหม่ โดยทำทั้งหมด 5 ครั้ง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์



รูปที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ ก) พีเอช และ ข) ความเข้มข้นของเกลือหรือค่าการนำไฟฟ้า

4. ทำให้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุอิ่มตัวครั้งที่ 2 โดยดูดสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์จากหลอดในข้อ 3 ทิ้ง แล้วดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเพิ่มการดำเนินการเป็น 10 ครั้ง

5. ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายโปรตีนตัวอย่างปริมาตร 1-5 มิลลิลิตร ที่มีพีเอชเท่ากับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ทำให้ตัวกลางดูดซับอิ่มตัวลงในแต่ละหลอด นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่โปรตีนเป้าหมายจะถูกดูดซับด้วยตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ โดยในหลอดที่โปรตีนเป้าหมายถูกดูดซับได้ดีก็จะเหลือโปรตีนเป้าหมายละลายในสารละลายน้อย (สำหรับชุดทดลองควบคุมให้นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง ที่พีเอชต่างๆ ใส่ลงแต่ละหลอดที่ไม่มีตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ แล้วนำไปเขย่าพร้อมกับชุดทดลอง)

6. เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวกลางแลก เปลี่ยนประจุนอนก้น ดูดเอาส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเป้าหมาย

7. ที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นการหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการดูดซับ สำหรับการหาค่าการนำไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการดูดซับสามารถดำเนินการเช่นเดียวกันโดยทำการแปรผันค่าความเข้มข้นของเกลือในสารละลายโปรตีนซึ่งเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าการนำไฟฟ้า โดยทั่วไปนิยมใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ (รูปที่ 2ข)

8. ทำการคำนวณค่าความจุที่สภาวะสมดุล (equilibrium capacity, Qeq) โดยอาศัยสมการที่ 1 ซึ่งเป็นค่าที่นิยมใช้ในการรายงานความสามารถในการดูดซับของตัวกลางดูดซับ

$$Qeq = \frac{(C_0 - C_{eq})V_l}{V_{ads}} \quad (1)$$

เมื่อ C_0 คือ ค่าความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้น

C_{eq} คือ ค่าความเข้มข้นโปรตีนที่สภาวะสมดุลหลังจากผ่านการดูดซับ

V_l คือ ปริมาตรของทั้งระบบ

V_{ads} คือ ปริมาตรตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ

วิธีการวิเคราะห์

1. กิจกรรมของไลโซไซม์วิเคราะห์ตามวิธีที่อธิบายโดย Wilken และ Nikolov (2006) [5] โดยการวัดความขุ่นที่ลดลงของสารแขวนลอยของเซลล์ *Micrococcus luteus* ซึ่งไลโซไซม์ 1 หน่วย มีค่าเท่ากับปริมาณไลโซไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ลดลง 0.001 ต่อนาที โดยในการทดลองนี้จะรายงานความเข้มข้นของ ไลโซไซม์ในหน่วยมิลลิกรัมของไลโซไซม์โดยใช้ไลโซไซม์ของบริษัท Fluka เป็นสารมาตรฐาน

2. กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสทำตามวิธีที่เสนอโดย Evans (1985) [6] ซึ่งเป็นวิธีที่วัด *p*-nitrophenol ที่ปลดปล่อยออกมาจากโมเลกุลของ *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยมีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที

3. ความเข้มข้นของโปรตีนไฟโคไซยานินวิเคราะห์โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 615 652 และ 730 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนไฟโคไซยานินตามสมการที่ 2 [7]

$$[phycocyanin](mg/ml) = A_{615} - \frac{A_{730} - 0.47(A_{652} - A_{730})}{5.34} \quad (2)$$

4. โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (SDS-PAGE) ดำเนินการตามหลักการของ Laemmli (1970) [8]

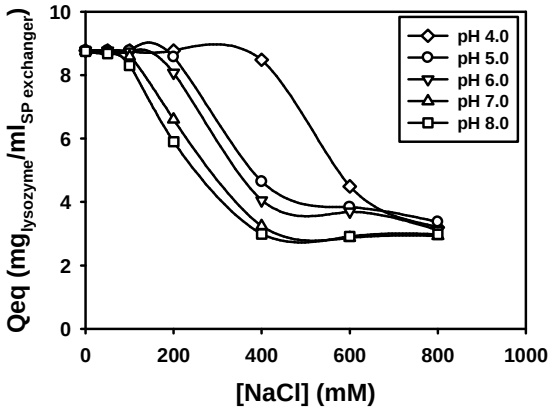
5. ค่าพีเอช และค่าการนำไฟฟ้า ค่าพีเอชวัดโดยใช้เครื่องวัดค่าพีเอชของ HACH COMPANY รุ่น SensION™ และค่าการนำไฟฟ้าวัดโดยเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity meter) ของ Hand-held Conductivity /TDS meter รุ่น CON 6/TDS 6

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับไลโซไซม์ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline SP

การทดลองในส่วนนี้เป็นระบบแรกที่ใช้ในการทดสอบเทคนิคที่ออกแบบ โดยระบบที่ศึกษา คือ การดูดซับ ไลโซไซม์ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline SP โดยระบบนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยร่วม 2 ปัจจัย ได้แก่ ผลของค่าการนำไฟฟ้าในรูปของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในช่วง 0-800 มิลลิโมลาร์ (มีค่าการนำไฟฟ้าในช่วงประมาณ 5-70 มิลลิซีเมนส์) และผลของพีเอชในช่วง 4.0-8.0 โดยทำการปรับค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์และพีเอชของสารละลายไข่ขาวให้ได้ค่าตามที่ต้องการศึกษาก่อนทำการดูดซับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 3 ในรูปของค่าความจุที่สภาวะสมดุล (Qeq) โดยถ้าค่า Qeq สูงแสดงว่าดูดซับไลโซไซม์ได้ดี

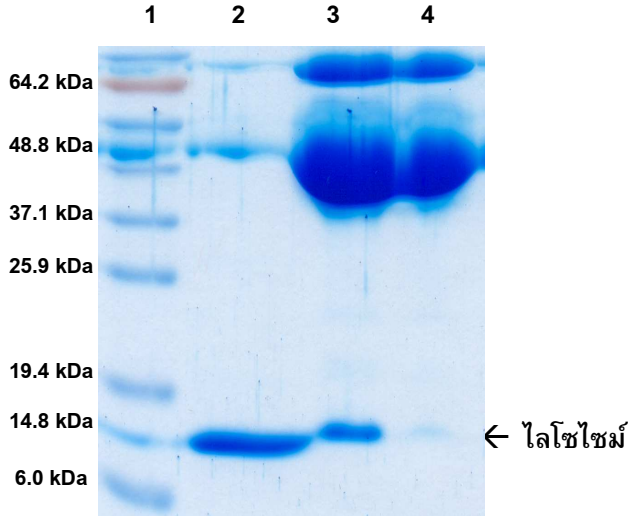
จากรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาเฉพาะอิทธิพลของพีเอช พบว่าเมื่อพีเอชสูงขึ้นให้ค่า Qeq ลดลง อย่างไรก็ตาม พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่เกิน 100 มิลลิโมลาร์ Streamline SP สามารถดูดซับไลโซไซม์ได้ดีในทุกพีเอชที่ทำการศึกษา ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าค่าพีไอของไลโซไซม์มีค่าสูงกว่าพีเอชสูงที่สุดที่ใช้ในการศึกษา (พีเอช 8.0) ทั้งนี้ เนื่องจากไข่ขาวมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำ ดังนั้น การเลือกใช้พีเอช 8.0 ในการดูดซับจึงเหมาะสมกว่าการเลือกใช้พีเอชที่ต่ำกว่า เนื่องจากในไข่ขาวมีโปรตีนชนิดอื่นที่มีค่าพีไอในช่วง 4.6-6.6 มากถึง 67 เปอร์เซ็นต์ [9] ซึ่งการเลือกใช้พีเอช 4.0 ในการดูดซับ ถึงแม้ว่าจะให้ประสิทธิภาพในการดูดซับไลโซไซม์สูงกว่าแต่จะส่งผลเสียในแง่ความบริสุทธิ์ของโปรตีนเป้าหมาย เนื่องจากจะมีโปรตีนปนเปื้อนปริมาณมาก



รูปที่ 3 อิทธิพลของพีเอชและความเข้มข้นของเกลือต่อค่าความจุที่สภาวะสมดุล (Qeq) ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline SP ในการดูดซับไลโซไซม์

เมื่อพิจารณาอิทธิพลจากค่าการนำไฟฟ้าในรูปของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าค่า Q_{eq} จะลดลงเมื่อค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้น (ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น) เนื่องจากไอออนของเกลือจะขัดขวางการดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุทำให้ไลโซไซม์ถูกดูดซับ

ได้น้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Jahic และคณะ (2006) [4] ทั้งนี้ ถึงแม้ว่าที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมที่ 0 และ 50 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่า Q_{eq} ไม่ต่างกัน แต่ในการดำเนินการจริงควรเลือกใช้ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากในระบบนี้ความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจะช่วยลดโปรตีนปนเปื้อนโดยไม่ส่งผลต่อความสามารถในการดูดซับไลโซไซม์ ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดูดซับไลโซไซม์จากสารละลายไข่ขาวของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline SP คือ ระบบบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 8.0 และมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเมื่อดำเนินการภายใต้สภาวะดังกล่าวและติดตามผลโดย SDS-PAGE ได้ผลดังรูปที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการที่นำเสนอนี้สามารถใช้หาสภาวะที่เหมาะสมในการดูดซับไลโซไซม์โดย Streamline SP



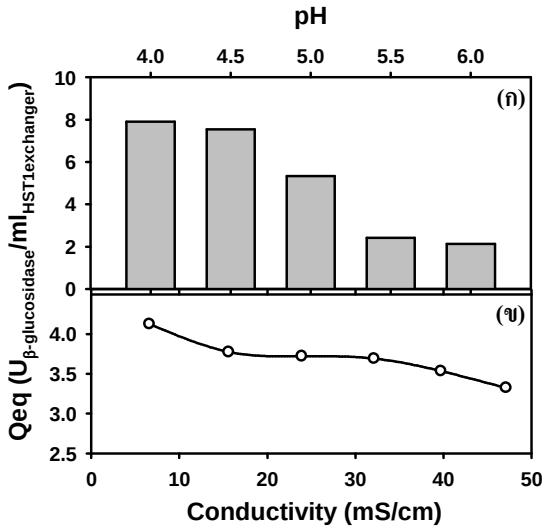
รูปที่ 4 การติดตามการดูดซับไลโซไซม์จากสารละลายไข่ขาวด้วยตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline SP ในระบบที่พีเอช 8.0 และมีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 50 มิลลิโมลาร์ เมื่อแถวที่ 1) คือ โปรตีนมาตรฐาน 2) คือ ไลโซไซม์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Fluka) 3) คือ สารละลายไข่ขาวก่อนการดูดซับ และ 4) คือ สารละลายส่วนใสหลังการดูดซับ

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline Direct HST1

การทดลองในส่วนนี้เป็นตัวแทนของระบบที่โปรตีนเป้าหมายเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน (รีคอมบิแนนท์เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส) ที่ได้จากระบบการแสดงออกโดย *P. pastoris* ซึ่งส่วนใสที่ได้จากการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักจะมีค่าการนำไฟฟ้าค่อนข้างสูงสำหรับการแลกเปลี่ยนประจุโดยทั่วไป (ประมาณ 18 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร) [2] ดังนั้นการทดลองในส่วนนี้จึงเลือกใช้ Streamline Direct HST1 ซึ่งบริษัทผู้ผลิตแนะนำว่าสามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงได้

การทดลองในส่วนนี้มีความแตกต่างจากระบบแรกที่ศึกษาการดูดซับไลโซไซม์ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline SP ซึ่งทำการศึกษา

ปัจจัยร่วม 2 ปัจจัย ในเวลาเดียวกันทำให้จำนวนหน่วยทดลองมีปริมาณมากถึง 35 หน่วยทดลอง แต่ในการทดลองนี้จะเลือกศึกษาทีละปัจจัย คือ พีเอช (5 หน่วยทดลอง) และค่าการนำไฟฟ้า (6 หน่วยทดลอง) ซึ่งพบว่ามีจำนวนหน่วยทดลองรวมเพียง 11 หน่วยทดลอง ทำให้ประหยัดเวลาและวัสดุในการวิจัย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 5

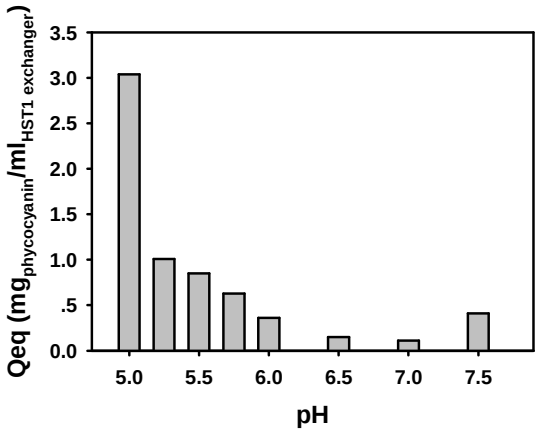


รูปที่ 5 ค่าความจุที่สภาวะสมดุล (Qeq) ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline Direct HST1 ในการดูดซับเบต้ากลูโคสิเดส (ก) อิทธิพลของพีเอช (ควบคุมค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 15.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และค่าความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสเริ่มต้น (C_0) 2.69 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และ (ข) อิทธิพลของค่าการนำไฟฟ้า (ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 4.0 และค่า C_0 1.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อพีเอชสูงขึ้นส่งผลให้ค่า Qeq ลดลง (รูปที่ 5ก) อย่างไรก็ตาม ในระบบนี้ไม่สามารถลดค่าพีเอชที่ใช้ในการศึกษาให้ต่ำกว่า 4.0 เนื่องจากเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่เสถียรที่พีเอชต่ำกว่า 4.0 เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่าการนำไฟฟ้า พบว่าการเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าจาก 6.4 เป็น 47.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ส่งผลให้ค่า Qeq ลดลงเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (รูปที่ 5ข) แสดงให้เห็นว่า Streamline Direct HST1 สามารถทำงานได้ดีแม้ในสภาวะที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงก็ตาม ซึ่งจากการทดลองทำให้ทราบพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าสำหรับการดูดซับ รวมถึงทราบอีกว่าการดูดซับรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดย Streamline Direct HST1 ไม่จำเป็นต้องทำการเจือจางน้ำหมักเพื่อลดค่าการนำไฟฟ้าก่อนดำเนินการดูดซับ

3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับโปรตีนไฟโคไซยานินของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline Direct HST1

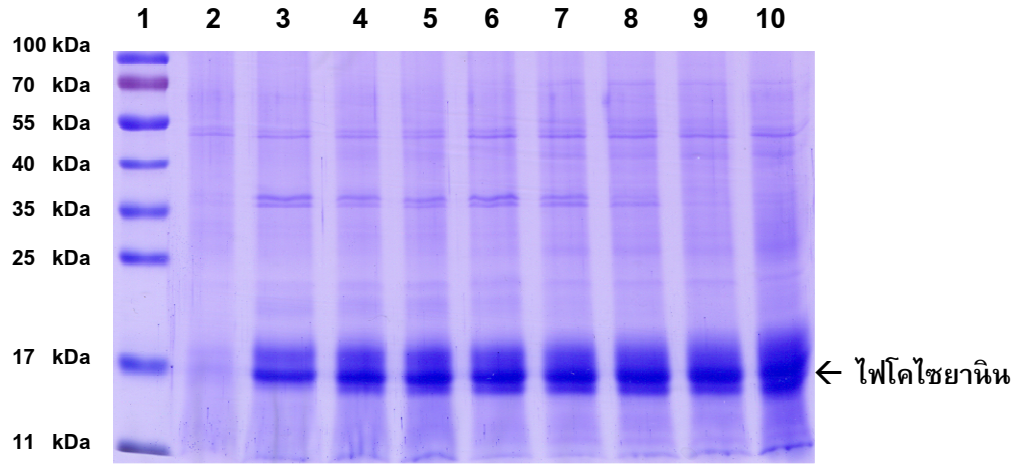
การทดลองในส่วนนี้เป็นตัวแทนของการดูดซับโปรตีนที่อยู่ในเซลล์ซึ่งต้องผ่านการทำให้เซลล์แตกเพื่อปลดปล่อยโปรตีนก่อนทำการดูดซับ โปรตีนติดตามที่ใช้ คือ โปรตีนไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *A. siamensis* TISTR 8012 ซึ่งมี 12 หน่วยย่อย คือ หน่วยย่อยชนิดแอลฟาและเบต้าอย่างละ 6 หน่วยย่อย โดยระบบนี้เลือกศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับเพียงปัจจัยเดียว เนื่องจากสารละลายตัวอย่างเริ่มต้นมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำมาก (0.58 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร) อย่างไรก็ตาม การทดลองในส่วนนี้ยังคงเลือกใช้ Streamline Direct HST1 โดยไม่ได้คำนึงถึงความสามารถในการทำงานได้ในสภาวะที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูง แต่ให้ความสำคัญต่อค่าความจุในการดูดซับ ซึ่งมีการรายงานว่ามีค่าความจุของการดูดซับสูงกว่า Streamline SP [2]



รูปที่ 6 อิทธิพลของพีเอชต่อค่าความจุที่สภาวะสมดุล (Qeq) ของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก Streamline Direct HST1 ในการดูดซับโปรตีนไฟโคไซยานิน (ควบคุมค่าการนำไฟฟ้าเท่ากับ 0.58 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และค่าความเข้มข้นของโปรตีนไฟโคไซยานินเริ่มต้น 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 6 ซึ่งพบว่าเมื่อทำการเพิ่มพีเอชในช่วง 5.0-7.5 จะส่งผลให้ค่า Qeq ลดลง ซึ่งที่พีเอช 5.0 มีความเหมาะสมต่อดูดซับโปรตีนไฟโคไซยานินโดยให้ค่า Qeq สูงที่สุด 3.0 มิลลิกรัมไฟโคไซยานินต่อมิลลิลิตรของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ ทั้งนี้ ถึงแม้ว่าการลดพีเอชจะมีแนวโน้มที่จะให้ค่า Qeq สูงขึ้น แต่จากการทดลองพบว่าที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 โปรตีนไฟโคไซยานินจะตกตะกอนจึงไม่เหมาะที่จะดำเนินการที่พีเอชต่ำกว่า 5.0

สำหรับการติดตามผลการทดลองด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 7) พบแถบของโปรตีนหลัก 2 แถบ ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 17 และ 18 กิโลดาลตัน ซึ่งจากการย้อมเจลด้วยซิงค์อะซิเตรตและตรวจสอบภายใต้แสงยูวี [10] พบว่าเกิดการเรืองแสงสีส้มซึ่งเป็นการยืนยันว่าแถบดังกล่าวเป็นไฟโคบิลิโปรตีน ซึ่งมีขนาดสอดคล้องกับขนาดของหน่วยย่อยชนิดแอลฟา



รูปที่ 7 การติดตามการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการดูดซับโปรตีนไฟโคไซยานินของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ Streamline Direct HST1 ด้วย SDS-PAGE เมื่อแถวที่ 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2-9 คือ สารละลายส่วนใสหลังการดูดซับที่พีเอช 5.00 5.25 5.50 5.75 6.00 6.50 7.00 และ 7.50 ตามลำดับ และแถวที่ 10 คือ สารละลายเริ่มต้นก่อนการดูดซับ

และเบต้าของไฟโคไซยานิน โดยที่พีเอช 5.0 ตรวจพบแถบของไฟโคไซยานินน้อยที่สุดและความเข้มของแถบของไฟโคไซยานินจะมากขึ้นตามพีเอชซึ่งแสดงว่าที่พีเอชสูงขึ้นมีการดูดซับโปรตีนไฟโคไซยานินได้น้อยลง

4. สรุป

เทคนิคอย่างรวดเร็วและประหยัดในการหาสภาวะในการดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุที่นำเสนอเป็นเทคนิคที่ใช้เวลาน้อยและประหยัดค่าใช้จ่ายโดยใช้สารเคมีและวัสดุทดลองน้อยลง ซึ่งสามารถใช้ในหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุใน 3 ระบบทดสอบ ที่มีความแตกต่างกันทั้งในแง่ชนิด ขนาด คุณสมบัติ และแหล่งของโปรตีน รวมถึงชนิดคุณสมบัติของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ ดังนั้นเทคนิคที่นำเสนอนี้จึงน่าจะสามารถประยุกต์กับระบบการดูดซับโปรตีนชนิดอื่นโดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุได้เช่นกัน

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ปี 2550) ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยโครงการนี้ และขอของคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ส่งเสริมบุคลากรในสังกัดให้ได้ทำงานวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Bollag, D.M., Rozycki, M.D., and Edelstein S.T., Protein Methods., 2nd ed., Wiley-Liss, Inc., New York, 1996.

[2] Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Enfors, S.-O., and Veide, A., Recovery of Recombinant β-glucosidase by Expanded Bed Adsorption from *Pichia pastoris* High-Cell-Density Culture Broth. J. Biotechnology., Vol. 122, pp. 86-98, 2006.

[3] Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., and Madamwar, D., Extraction, Purification and Characterization of Phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the Rocky Shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. Process Biochem., Vol. 41, pp. 2017-2023, 2006.

[4] Jahic, M., Knoblechner, J., Charoenrat, T., Enfors, S.-O., and Veide, A., Interfacing *Pichia pastoris* Cultivation with Expanded Bed Adsorption. Biotech. Bioeng., Vol. 93, pp. 1040-1049, 2006.

[5] Wilken, L.R. and Nikolov, Z.L., Factors Influencing Recombinant Human Lyzozyme Extraction and Cation Exchange Adsorption. Biotechnol. Prog., Vol. 22, pp. 745-752, 2006.

[6] Evan, C.S., Properties of the β-glucosidase (Cellobiase) from the Wood-Rotting Fungus *Coriolus versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 22, pp. 128-131, 1985.

[7] Siegelman, H. and Kycia, J.H., Algal Biliproteins. pp. 71-79. *In* Handbook of Phycological Methods: Physiological Biochemistry Methods. Edited by Hellebust, J.A. and Craigie, J.S., Cambridge University Press, London, 1978.

[8] Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, Vol. 227, pp. 680-685, 1970.

[9] Stadelman, W.J. and Cotterill, O.J., Egg science and technology, 2nd ed. The AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut, 1977.

[10] Brekelman, T.R. and Lagarias, J.C., Visualization of Bilin-Linked Peptides and Proteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem., Vol. 156, pp. 194-201, 1986.