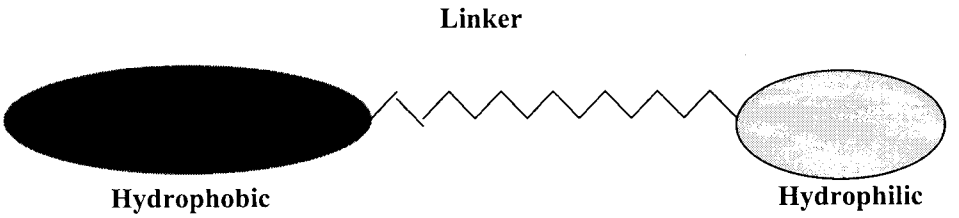
การตัดโปรตีนโดยใช้แสง

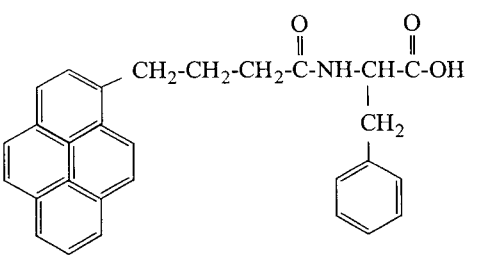
ดร.อภิญญา ชัยวิสุทธางกูร
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุดมุ่งหมายในการวิจัย

1. เพื่อสร้างโมเลกุลที่สามารถทำหน้าที่เป็น probe ที่สามารถจับกับโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีนที่ตำแหน่ง binding site
2. สามารถใช้โมเลกุลที่สร้างขึ้นในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะภายใต้สภาวะแสง UV เพื่อประโยชน์ในการตัดโปรตีนหรือเปปไทด์ขนาดใหญ่ให้เล็กลงเพื่อหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน

Probe Design





Fluorophore Recognition Element

N-(phenylalanine)-4(1-pyrene) butylamide (Py-Phe)

จุดมุ่งหมายในการวิจัย

1. สังเคราะห์สารเคมีที่สามารถตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะให้เป็นเปปไทด์สายเล็กลง เพื่อประโยชน์ในการหาลำดับกรดอะมิโน

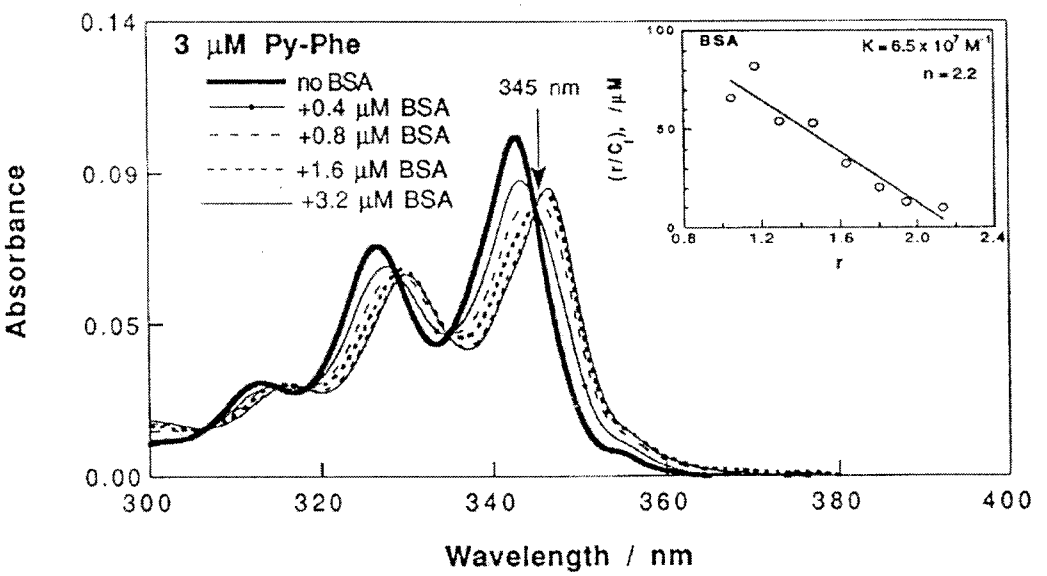
2. ใช้เป็น probe ในการศึกษาโครงสร้างของโปรตีนในบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site)

3. ศึกษาการจับของโมเลกุลที่สังเคราะห์ได้ในการจับกับโปรตีนโดยใช้เทคนิคทาง Spectroscopy

Spectroscopic Studies

Absorption Spectra of Py-Phe

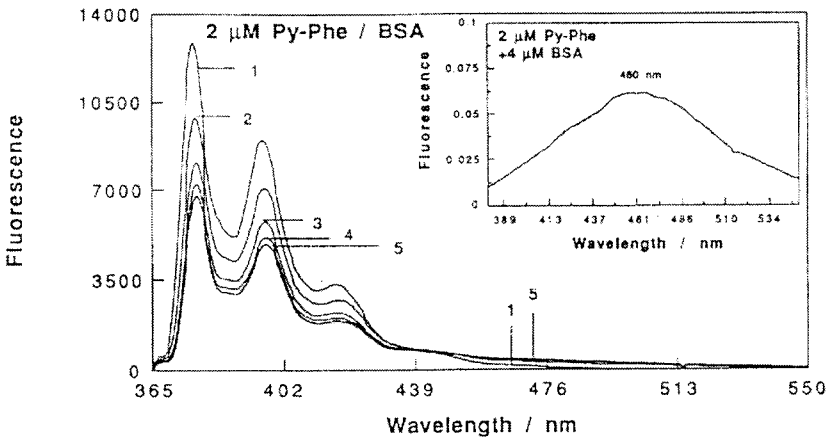
with and without BSA (0.4-3.2 μM)



1) Absorption Studies

หลังจากที่ Py-Phe จับกับโปรตีน (เช่น bovine serum albumin หรือ BSA) absorption spectrum ของ Py-Phe จะมีการเปลี่ยนตำแหน่งของ peak ไปที่ความยาวคลื่นสูงขึ้น (red shift) ถึง 4 nm (จาก λ_{max} = 343 nm เป็น 347 nm) ซึ่งการเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้นนี้ พบว่า สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อละลาย Py-Phe ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น benzene จากการคำนวณค่าคงที่การจับกับโปรตีน (binding constant) พบว่า Py-Phe จับกับ BSA ด้วยค่า binding constant สูงถึง 6.5 x 10^7 M^{-1} (รูปเล็ก)

Fluorescence Spectra of Py-Phe with Increasing Concentration of BSA

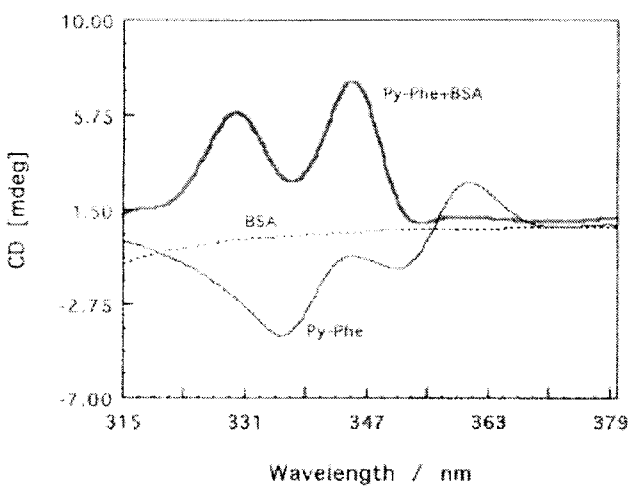


(1) 0 μM, (2) + 0.50 μM (3) + 1.00 μM, (4) + 1.50 μM, (5) + 2.00 μM

2) **Fluorescence Studies**

Py-Phe จะมีประสิทธิภาพในการคายแสงลดลงเมื่อ Py-Phe จับกับ BSA โดยการคายแสงของ Py-Phe จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ BSA เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมรอบๆ หมู่ไพรีน ซึ่งเป็นหมู่ที่สามารถคายแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 365-500 nm นอกจากนี้ยังมี peak ใหม่เกิดขึ้นที่ความเข้มข้นสูงๆ ของ BSA เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่ไพรีนกับกรดอะมิโนของ BSA ที่ตำแหน่ง binding site

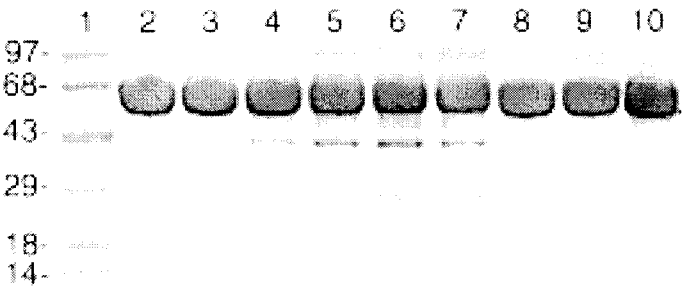
Circular Dichroism Spectra of Py-Phe with (red line) and without (blue line) BSA



3) Circular Dichroism (CD) Studies

การศึกษาโดยเทคนิค circular dichroism spectroscopy พบว่า Py-Phe อิสระมีสัญญาณ CD โดยแสดง peak ที่ (-) 336, (-) 351 และ (+) 360 nm แต่เมื่อ Py-Phe จับกับ BSA พบว่า peak เปลี่ยนเป็น (+) 330 และ (+) 345 nm ดังนั้น จากการเปลี่ยนแปลงของสเปคตรัมต่างๆ จึงสามารถสรุปได้ว่า การจับของ Py-Phe กับ BSA มีลักษณะการจับในลักษณะที่มีการฝังหมู่ไพรีนตรงบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของ BSA โดยที่หมู่ COOH ของ Py-Phe จับอยู่ที่ผิวนอกของโปรตีน จึงทำให้การจับมีความจำเพาะ

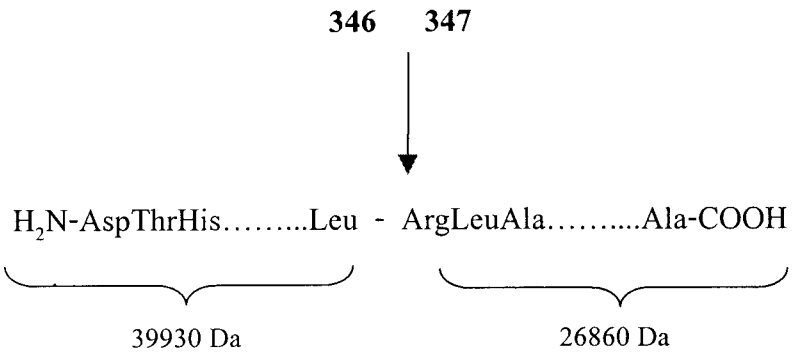
SDS-PAGE of BSA, irradiated at 344 nm



Lane 1: M. W. markers; **Lane 2**: BSA; **Lanes 3-7**: BSA + Py-Phe + CoHA, irradiated for 0, 5, 10, 20, 30 minutes; **Lane 8**: BSA, irradiated for 30 minutes; **Lane 9**: BSA + Py-Phe, irradiated for 30 minutes; **Lane 10**: BSA + CoHA, irradiated for 30 minutes SDS-PAGE

and Amino Acid Sequencing

เมื่อฉายแสงไปที่สารละลายผสมของ BSA และ Py-Phe พบว่า BSA ถูกตัดเป็น 2 เปปไทด์ (lane 4-7) ในการตัดโปรตีนจำเป็นจะต้องมีตัวรับอิเลคตรอน ซึ่งในที่นี้ใช้ Hexammine cobalt (III) chloride (CoHA) ปฏิกิริยาการตัดโปรตีนจะไม่เกิดขึ้นถ้าขาดแสง (lane 3) ขาด Py-Phe (lane 10) หรือ ขาด CoHA (lane 9) อย่างใดอย่างหนึ่ง และพบว่า เปปไทด์ที่ได้จากการตัด BSA จะมีมวลโมเลกุลประมาณ 40 และ 27 kDa โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (lane 1) ซึ่งผลรวมของมวลโมเลกุลของเปปไทด์ทั้งสองนี้จะเท่ากับมวลโมเลกุลของ BSA (lane 2) ซึ่งเท่ากับ 67 kDa พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ของเปปไทด์ที่ได้จากการตัดสูงสุดเท่ากับ 21% เมื่อทำการฉายแสงนาน 20 นาที จากการหาลำดับของกรดอะมิโนและ Mass spectrometry พบว่า เกิดการตัดของ BSA ระหว่าง Leu 346 และ Arg 347



สรุปผลการวิจัย

1. สามารถสังเคราะห์สารเคมีชนิดใหม่ที่ทำหน้าที่เป็น probe ในการศึกษาการจับกับโปรตีนโดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy

2. สามารถใช้สารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นในการตัดโปรตีน เช่น BSA และ lysozyme ที่ตำแหน่งจำเพาะได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเห็นได้จากการทดลองทาง gel electrophoresis (SDS-PAGE) การหาลำดับกรดอะมิโน และผลจาก Mass spectrometry ถ้าการตัดเกิดขึ้นแบบ random จะเห็นเป็น smear เกิดขึ้นแทนที่จะเป็นแถบของเปปไทด์ที่ชัดเจนดังแสดงข้างต้น

3. งานวิจัยชิ้นนี้เป็นตัวอย่างแรกของการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะและมีประสิทธิภาพโดยใช้สารเคมีสังเคราะห์และแสง (ที่ 344 nm)

ผู้เชี่ยวชาญ

Professor Challa V. Kumar, Department of Chemistry, University of Connecticut, USA