

การศึกษาการจับระหว่างโปรตีนเอวิดินและสเตรปตาวิดินกับตัวเชื่อมอก อนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่โดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี

BINDING OF AVIDIN AND STREPTAVIDIN WITH NEW PYRENYL PROBE BY SPECTROSCOPIC TECHNIQUES

ปิณปัทม์ มะลัยแก้ว, อภิญญา เขียวสุทธางกูร

Pinpinat Malaikaew, Apinya Chaivisuthangkura

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

บทคัดย่อ

เอวิดินและสเตรปตาวิดินเป็นไกลโคโปรตีนที่สามารถจับกับโมเลกุลของไบโอตินได้ดี เนื่องจากค่าคงที่ในการจับของโปรตีนทั้งสองกับไบโอตินมีค่าสูง งานวิจัยนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไพรีนชนิดใหม่ คือ d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide (Py-biotin) โดยการเชื่อมต่อโมเลกุลของไพรีนกับไบโอติน และศึกษาการจับระหว่างอนุพันธ์ของไพรีน (Py-biotin) กับโปรตีนเอวิดิน และสเตรปตาวิดิน โดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี จากการศึกษาโดยการวัดค่าดูดกลืนแสง และคำนวณค่าคงที่การจับ (Binding constant, K_b) ของไฟไบโอติน เมื่อจับกับเอวิดิน และสเตรปตาวิดิน พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.00×10^6 และ $6.79 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 342 นาโนเมตรของไฟไบโอตินจะเลื่อนไปในทิศทางที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น ประมาณ 3 นาโนเมตร ค่าการคายแสงของไฟไบโอตินจะลดลงเมื่อจับกับโปรตีนเอวิดิน และสเตรปตาวิดิน ความเข้มข้น 10^{-6} ไมโครโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าส่วนที่เป็นหมูไพรีนในโมเลกุลไฟไบโอติน จะถูกบดบังหรือยับยั้งการคายแสงโดยโปรตีนไฟไบโอตินสามารถจับกับเอวิดินได้ดีกว่าสเตรปตาวิดิน ประมาณ 1.5 เท่า

คำสำคัญ: เอวิดิน สเตรปตาวิดิน ไพรีน

Abstract

New pyrenyl probe, d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide (Py-biotin), was synthesized by coupling d-biotin to 1(1-pyrene)methylamine hydrochloride. This study focuses on binding interactions between Py-biotin to avidin and streptavidin. Binding studies of Py-biotin to both proteins were investigated using spectroscopic techniques. Binding affinity of Py-biotin to proteins was resulted from absorption titration of protein to Py-biotin solution. Binding constants for Py-biotin with avidin and streptavidin were 1.00×10^6 and $6.79 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectively.

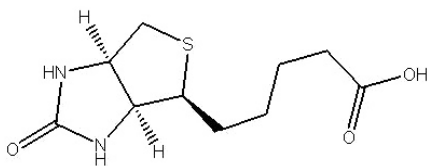
The absorption spectra of Py-biotin at 342 nm undergo changes upon binding to strept (avidin) with red shifts (3 nm) of the absorption peak positions. Adding of streptavidin (0–10 μM) to Py-biotin solution resulted in the decrease of Py-biotin fluorescence intensity. This observation indicates the protection of pyrene chromophore from aqueous solution by the protein matrix. Binding affinity of Py-biotin to avidin is about 1.5 folds higher than that of Py-biotin to streptavidin.

Keywords: Avidin, Streptavidin, Pyrene

บทนำ

ในปัจจุบันสารเคมีที่สามารถใช้ตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงมีน้อยมาก เนื่องจากพันธะเพปไทด์มีความเสถียรสูง (ค่าครึ่งชีวิตประมาณ 7 ปี ที่ 25°C, pH 7) [1] ดังนั้นจึงมีผู้วิจัยหลายท่านพยายามสังเคราะห์สารเคมีชนิดใหม่ที่มีขนาดเล็ก และสามารถทำหน้าที่แทนเอนไซม์ในการตัดโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะได้ นอกจากการตัดโปรตีนหรือเพปไทด์ขนาดใหญ่ให้เล็กลงเพื่อเป็นประโยชน์ในการหาลำดับของกรดอะมิโน (Amino Acid Sequencing) แล้ว โมเลกุลเหล่านี้ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวชี้บอกในการศึกษาถึงโครงสร้างของโปรตีน (Protein Structural Domains) [2–3] และความสัมพันธ์ของกิจกรรม (Activity) กับโครงสร้างของโปรตีน รวมทั้งการศึกษาถึงอันตรกิริยาของโมเลกุลขนาดเล็กกับโปรตีน (Ligand–protein Binding Interaction) ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการออกแบบและผลิตยาชนิดใหม่ได้ในอนาคต [4] ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า ถ้านำโมเลกุลที่เป็นสับสเตรทจำเพาะต่อเอนไซม์มาเชื่อมต่อกับอนุพันธ์ไพรีน จะได้อนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่ที่มีหมู่จำเพาะต่อเอนไซม์ชนิดนั้น ซึ่งสามารถใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีในการศึกษาโครงสร้างบริเวณตำแหน่งจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยา (Binding Site) ได้ ในงานวิจัยนี้จึงมีการใช้ D(+)-biotin ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ (Avidin) และสเตรปตาวิด (Streptavidin) มาเชื่อม

ต่อกับอนุพันธ์ไพรีน ไบโอติน (biotin, vitamin B หรือ vitamin H) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวแยกได้จากไข่ขาว ชนิดที่พบในธรรมชาติ คือ dextro-rotary form หรือ D(+)-biotin (ภาพที่ 1) ซึ่งเป็นชนิดเดียวที่ร่างกายใช้เป็นส่วนประกอบของโคเอนไซม์ ซึ่งค่าคงที่การจับ (Binding Constant) ระหว่างไบโอตินกับเอนไซม์ (Biotin-avidin) และไบโอตินกับสเตรปตาวิด (Biotin-streptavidin) มีค่าสูงถึง $\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$ นอกจากนี้ ได้มีการนำปฏิกิริยาระหว่างไบโอตินกับเอนไซม์ และไบโอตินกับสเตรปตาวิดไปประยุกต์ใช้มากมาย [5] เนื่องจากมีข้อดี คือ ประการแรก ไบโอตินจะจับกับเอนไซม์และสเตรปตาวิดที่จำเพาะกับตำแหน่งหรือเป้าหมายที่สนใจ ประการที่สอง ไบโอตินมีตำแหน่งการจับกับเอนไซม์และสเตรปตาวิดจำนวน 4 ตำแหน่งจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยาต่อหนึ่งโมเลกุลของเอนไซม์ และสเตรปตาวิด ประการที่สาม ไบโอตินเป็นโมเลกุลเล็ก ที่เมื่อถูกนำเข้าไปในโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีววิทยา (Biologically Active Macromolecules) จะไม่มีผลต่อกิจกรรมของสิ่งมีชีวิต (Biological Activity) เช่น การเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ (Enzymatic Catalysis) หรือการจับของแอนติบอดี (Antibody Binding) และประการที่สี่ ไบโอตินสามารถที่จะนำมาสังเคราะห์เป็นโมเลกุลอนุพันธ์ไพรีน เช่น ไพไบโอตินได้



ภาพที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของ D(+)-biotin

ที่มา: Sigma-Aldrich. (2011, March). D-Bioth analytical standard. Retrieved March 22, 2011, from http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=B4501SIAL&N5=SEARCH_CONCAT_PNOIB

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

สังเคราะห์โมเลกุลของอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่คือ ไพไบโอติน และศึกษาปฏิกิริยาการจับระหว่างอนุพันธ์ไพรีนชนิดใหม่กับโปรตีนเป้าหมาย ได้แก่ เอวิติน และสเตรปตาวิติน

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การสังเคราะห์และตรวจสอบโครงสร้างของไพไบโอติน

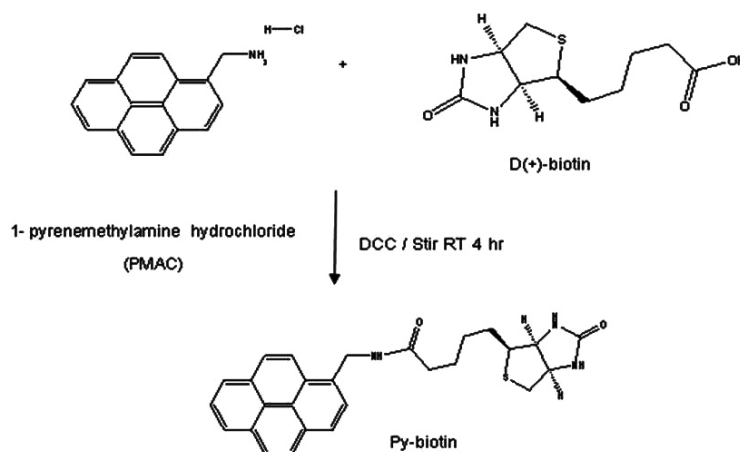
1. นำ 1-Pyrenemethylamine hydrochloride (PMAC) (จากบริษัท Aldrich, purity 95%) 50 มิลลิกรัม ไปทำปฏิกิริยากับ D(+)-biotin (จาก

บริษัท Acros, purity 98%) 50 มิลลิกรัม โดยละลายในอะซิโตรไนไทรล์ (Acetonitrile) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และเตตระไฮโดรฟูราน (Tetrahydrofuran) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไดไซโคลเฮกซิลคาร์โบไดอิมิด (Dicyclohexyl Carbodiimide, DCC) 100 มิลลิกรัม และ 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไบคาร์บอเนตโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (5%(w/v) Sodium Bicarbonate) (ละลายใน 80 เปอร์เซ็นต์ อะซิโตรไนไทรล์ต่อน้ำ) ดังแสดงในภาพที่ 2

2. คนสารละลายที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ทินแลร์โครมาโตกราฟี (TLC) ทุกๆ 1 ชั่วโมง เมื่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ไม่เกิดเพิ่มขึ้นจึงเติมน้ำ เพื่อหยุดปฏิกิริยา

3. ทำการสกัดผลิตภัณฑ์ด้วยไดคลอโรมีเทน (CH₂Cl₂) จากนั้นนำชั้นไดคลอโรมีเทนที่ได้มารวมกันแล้วนำไปกำจัดน้ำโดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (MgSO₄ anhydrous)

4. นำไประเหยแห้ง และแยกสารที่ได้ (Crude) ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล (Silica gel) เป็นเฟสคงที่ (Stationary phase) และตรวจสอบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้ UV, Fluorescence, NMR และ Mass Spectroscopy



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไพไบโอติน

การศึกษาทางสเปกโทรสโกปี

1. การศึกษาการจับ (Binding) ของไฟไบโอตินกับเอวิดิน และสเตรปตาวิดิน โดยการวัดการดูดกลืนแสง

1.1 เดิมสารละลายเอวิดิน (หรือสเตรปตาวิดิน) ความเข้มข้น 0-10 ไมโครโมลาร์ ลงในสารละลายไฟไบโอติน ซึ่งละลายใน 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 300-400 นาโนเมตร

1.2 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของไฟไบโอติน ที่ความยาวคลื่น 343 นาโนเมตร ที่แต่ละความเข้มข้นของเอวิดินและสเตรปตาวิดินกับความเข้มข้นของเอวิดินและสเตรปตาวิดิน

1.3 คำนวณหาค่าคงที่การจับ (Binding Constant) จากสมการของ Scatchard equation [6]

$$[1/C_f = K_b((n/r)-1)] \dots\dots\dots(1)$$

โดยที่ r = อัตราส่วนความเข้มข้นของตัวจับที่จับกับโปรตีน (Bound Probe) ต่อความเข้มข้นของโปรตีน ($C_b / [avidin]$ หรือ $C_b / [streptavidin]$)

C_f = ความเข้มข้นของตัวจับอิสระ (Free Probe)

n = จำนวนของตำแหน่งจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยา (Binding Site)

K_b = ค่าคงที่การจับ

2. การศึกษาการจับ (Binding) ของไฟไบโอตินกับเอวิดินและสเตรปตาวิดิน โดยการวัดการคายแสง

2.1 เดิมสารละลายเอวิดิน หรือ สเตรปตาวิดิน ความเข้มข้น 0-10 ไมโครโมลาร์ ลงในสารละลายไฟไบโอติน (2 ไมโครโมลาร์) ใน 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 นำไปวัดการคายแสงที่ 350-500 นาโนเมตรโดยกระตุ้นที่ 342 นาโนเมตร

2.2 นำค่าการคายแสงของไฟไบโอตินที่ได้จากความยาวคลื่น 376 นาโนเมตร ที่แต่ละความเข้มข้นของเอวิดินและสเตรปตาวิดิน มาเทียบกับค่า

การคายแสงของไฟไบโอตินที่ความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์ ของเอวิดินและสเตรปตาวิดิน จะได้ I_0/I

2.3 เขียนกราฟระหว่าง I_0/I กับความเข้มข้นของเอวิดินและสเตรปตาวิดิน

2.4 คำนวณหาค่าคงที่ K_{sv} จากสมการ Stern-Volmer equation [7]

$$I_0/I = 1 + K_{sv} [Q] \dots\dots\dots(2)$$

โดยที่ I_0 และ I คือ ความเข้มข้นแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence) ของตัวจับก่อนและหลังเติมเอวิดินและสเตรปตาวิดิน ตามลำดับ

K_{sv} คือ Stern-Volmer quenching constant

[Q] คือ ความเข้มข้นของตัวจับยั้งการคายแสง (เอวิดินและสเตรปตาวิดิน)

3. การศึกษาการยับยั้งการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟไบโอติน ในกรณีจับอยู่กับเอวิดินและสเตรปตาวิดินความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ โดยใช้เฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ (CoHA) เป็นตัวยับยั้ง (Quencher) โดยการวัดการคายแสง

3.1 เดิมสารละลายเฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ (CoHA) ความเข้มข้น 0-1 มิลลิโมลาร์ ลงในสารละลายผสมของไฟไบโอติน (ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์) กับเอวิดิน (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) และสารละลายผสมของไฟไบโอติน (ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์) กับสเตรปตาวิดิน (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) แล้วนำไปวัดการคายแสงที่ความยาวคลื่น 350-500 นาโนเมตร

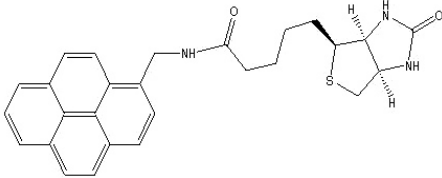
3.2 นำค่าการคายแสงของตัวจับ ที่ความยาวคลื่น 376 นาโนเมตรที่แต่ละความเข้มข้นของ เฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ มาเทียบกับค่าการคายแสงของตัวจับ ที่ 376 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์ของเฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ จะได้ I_0/I

3.3 เขียนกราฟระหว่าง I_0/I กับความเข้มข้นของเฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ และ

คำนวณหา Quenching Constant จากสมการของ Stern-Volmer

ผลการวิจัย

การตรวจสอบโครงสร้างของไฟไบโอตินจากการสังเคราะห์โมเลกุลของไฟไบโอติน (d-biotinyl-1(1-pyrene)methylamide, Py-biotin) และทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้วนำสารที่บริสุทธิ์ (ภาพที่ 3) ไปตรวจสอบโครงสร้างได้ผลดังนี้



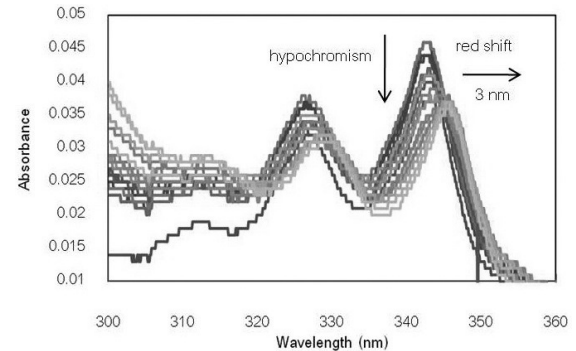
ภาพที่ 3 โครงสร้างของ d-biotinyl-1(1-pyrene) methylamide (Py-biotin)

ไฟไบโอตินมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวอมเหลือง จุดหลอมเหลว 176–180 องศาเซลเซียส NMR spectrum: ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 7.8–8.2 (9H), 7.1 (5H), 5.0 (1H), 4.1 (1H), 3.8 (1H), 3.3 (2H), 2.2 (2H), 1.8–2.1 (6H) และ Mass spectrum: m/z 456.4 (M^+) ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 342 นาโนเมตร ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของไฟไบโอติน มีค่าเท่ากับ $1.05 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ สำหรับสเปกตรัมการคายแสงของไฟไบโอติน พบว่าให้ค่าการคายแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 376 นาโนเมตร ซึ่งความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 นาโนเมตร

การศึกษาการจับ โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีของ Py-biotin

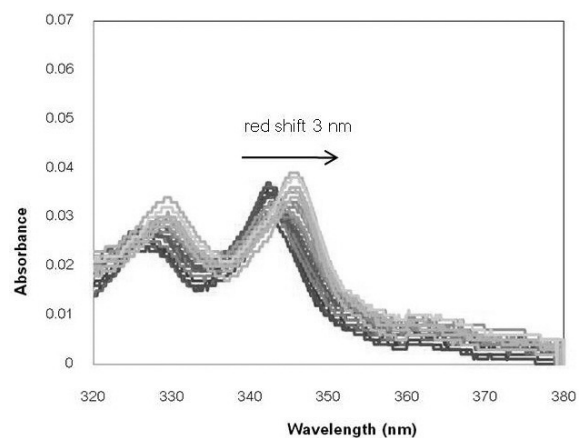
1. การศึกษาการจับ (Binding) ของไฟไบโอติน กับเอวิตินและสเตรปตาวิติน โดยการวัดการดูดกลืนแสง

การเติมสารละลายโปรตีนเอวิติน ลงในสารละลายไฟไบโอติน (ความเข้มข้น 4.19 ไมโครโมลาร์) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่ความยาวเพิ่มขึ้น (Red Shift) ประมาณ 3 นาโนเมตร และมีสเปกตรัมที่ลดต่ำลง (Hypochromism) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟไบโอติน (4.19 ไมโครโมลาร์) กับเอวิติน (0–1.5 ไมโครโมลาร์)

การเติมสารละลายโปรตีนสเตรปตาวิติน ลงในสารละลายไฟไบโอตินเข้มข้น 4.6 ไมโครโมลาร์ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของสเปกตรัมไปที่ความยาวเพิ่มขึ้นประมาณ 3 นาโนเมตร และมีสเปกตรัมที่ลดต่ำลง ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟไบโอติน (4.6 ไมโครโมลาร์) กับสเตรปตาวิติน (0–1.7 ไมโครโมลาร์)

จากการนำค่าการดูดกลืนแสงในภาพที่ 4 และภาพที่ 5 ไปคำนวณหาค่าคงที่การจับ (K_b) โดยใช้ Scatchard Equation ได้ค่า K_b สำหรับไฟไบโอติน กับเอวิดิน เท่ากับ $1.0 \times 10^6 M^{-1}$ และค่า K_b สำหรับ

ไฟไบโอตินกับสเตรปตาวิดิน เท่ากับ $6.79 \times 10^5 M^{-1}$ จากค่าที่ได้จะพบว่า ไฟไบโอติน สามารถจับกับโปรตีน เอวิดินได้ดีกว่าสเตรปตาวิดิน ประมาณ 1.5 เท่า ค่าคงที่การจับที่ได้สรุปในตารางที่ 1

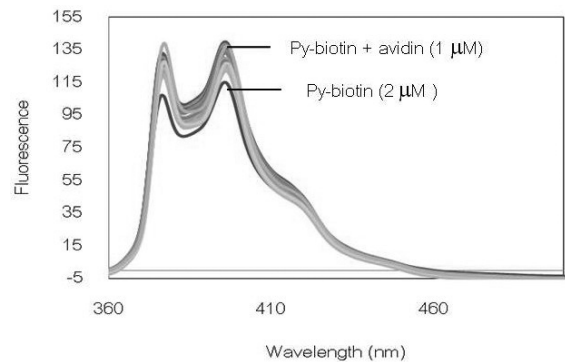
ตารางที่ 1 แสดงค่าคงที่ของการจับ (K_b) ของไฟไบโอติน เมื่อจับกับเอวิดินและสเตรปตาวิดิน

ตัวจับกับโปรตีน	ไฟไบโอตินกับเอวิดิน	ไฟไบโอตินกับสเตรปตาวิดิน
$K_b (M^{-1})$	1.00×10^6	6.79×10^5

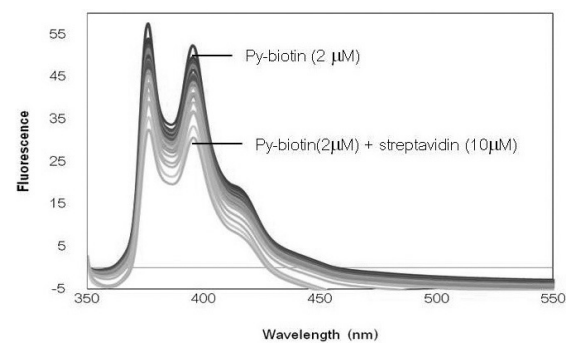
2. การศึกษาการจับของไฟไบโอตินกับเอวิดิน และสเตรปตาวิดิน โดยการวัดการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์

จากการศึกษาถึงผลต่อการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟไบโอติน (เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์) ขณะจับอยู่กับโปรตีนเอวิดิน (ภาพที่ 6) และสเตรปตาวิดิน (เข้มข้น 0-10 ไมโครโมลาร์) (ภาพที่ 7) พบว่าค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence Intensity) ของไฟไบโอติน จะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการเติมเอวิดิน (ความเข้มข้น 0, 0.005, 0.01 และ 0.015 ไมโครโมลาร์) และลดลงในช่วงความเข้มข้นของเอวิดินเป็น 2 ถึง 0.10 ไมโครโมลาร์หลังจากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอีกครั้ง ที่ความเข้มข้นของเอวิดิน 0.2 ถึง 1.0 ไมโครโมลาร์ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงแรกของการเติมเอวิดิน โมเลกุลของไฟไบโอติน ไม่ได้อยู่ในบริเวณที่เป็นตำแหน่งจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยา เมื่อความเข้มข้นของเอวิดินเพิ่มขึ้นจะทำให้ไทโรซีน (Tyrosine) หรือทริปโตเฟน (Tryptophan) ในเอวิดินไปบดบังหรือยับยั้งการคายแสงของหมู่ไพรีน จึงทำให้ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลง สำหรับค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ นั้นจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสเตรปตาวิดินเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 8) ซึ่งเหตุผลจะคล้ายกับการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ในกรณีของไฟไบโอตินจับอยู่กับเอวิดิน เข้มข้น 0.02 ถึง 0.10 ไมโครโมลาร์ เนื่องจาก

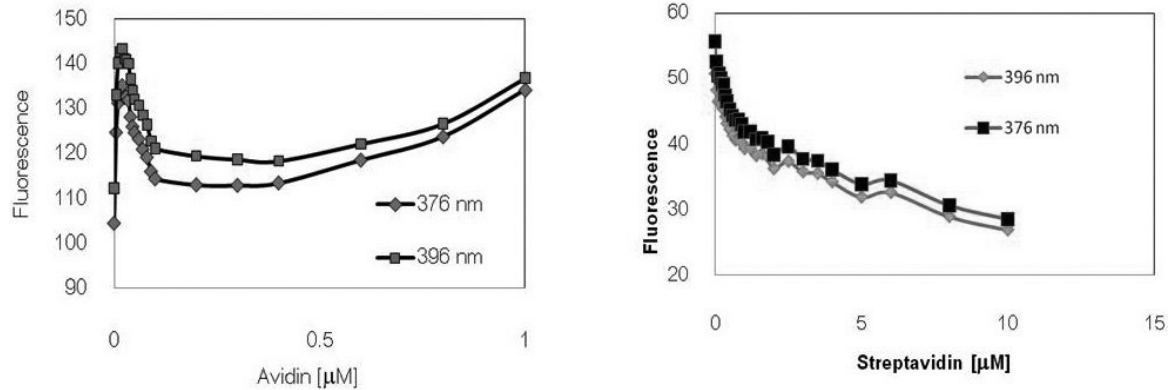
ในกรณีของไฟไบโอตินกับเอวิดิน มีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า K_{sv} ได้ ผลการศึกษาทางฟลูออเรสเซนซ์ในการจับกับโปรตีนแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 6 สเปกตรัมการคายแสงของไฟไบโอติน (2 ไมโครโมลาร์) ในกรณีที่จับอยู่กับเอวิดิน



ภาพที่ 7 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของไฟไบโอติน (2 ไมโครโมลาร์) ในกรณีที่จับอยู่กับสเตรปตาวิดิน



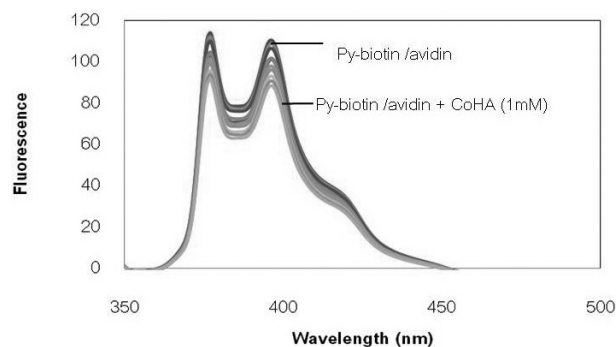
ภาพที่ 8 แสดงพบว่าค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่เปลี่ยนแปลงไปของไฟไบโอติน (2 ไมโครโมลาร์) ที่ความยาวคลื่น 376 และ 396 นาโนเมตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอวิดินหรือสเตรปตาวิติน

ตารางที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟไบโอติน เมื่อจับกับเอวิดินและสเตรปตาวิติน

พารามิเตอร์	ไฟไบโอตินกับเอวิดิน	ไฟไบโอตินกับสเตรปตาวิติน
การยับยั้งการคายแสง (Quenching)	ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์เพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้น 0-0.015 ไมโครโมลาร์ แล้วลดลงในช่วงความเข้มข้น 0.02 - 0.10 ไมโครโมลาร์	ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดลง
$K_{sv} (M^{-1})$	-	$8.57 \times 10^4 M^{-1}$

3. การศึกษาการยับยั้งการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟไบโอติน ในกรณีจับอยู่กับเอวิดินและสเตรปตาวิติน (10 ไมโครโมลาร์) โดยใช้เฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ เป็นตัวยับยั้งการคายแสง (Quencher) โดยการวัดการคายแสง

การยับยั้งการคายแสงของไฟไบโอติน โดยเฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ ในกรณีที่ไม่ได้จับกับโปรตีน และในกรณีที่จับอยู่กับโปรตีนเอวิดินและสเตรปตาวิติน พบว่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงสเปกตรัมการคายแสงของไฟไบโอติน (1.8 ไมโครโมลาร์) ในกรณีที่จับอยู่กับโปรตีนเอวิดิน ความยาวคลื่นที่ใช้ในการกระตุ้นเท่ากับ 342 นาโนเมตร

การศึกษาการคายแสงของไฟไบโอติน โดยใช้ เฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ เป็นตัวยับยั้ง การคายแสง (Quencher) เพื่อดูความสามารถของ เฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ ในการเข้าถึง ไฟไบโอตินขณะที่จับกับโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับ ความสามารถของเฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ ในการเข้าถึงไฟไบโอตินอิสระในบัฟเฟอร์ การที่ ไฟไบโอตินอยู่ภายในโปรตีนจะถูกป้องกันไม่ให้ เฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ เฮกซะมีน-โคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ เข้าถึง แต่ถ้าไฟไบโอติน อยู่ภายนอกหรือที่พื้นผิวโปรตีน จะทำให้เฮกซะมีน-

โคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ เข้าถึงได้ และส่งผลให้ ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ ของไฟไบโอตินลดลง ซึ่งเห็นได้จากสเปกตรัมการคายแสงของไฟไบโอติน (ความเข้มชน.8 ไมโครโมลาร์) ในกรณีที่จับอยู่กับ โปรตีนเอวิดิน หรือสเตรปตาวิดินจะเกิดการยับยั้ง การคายแสงได้น้อยกว่าในกรณีไฟไบโอตินอิสระ จากนั้นนำค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาว คลื่น 376 นาโนเมตร ไปคำนวณหาค่าคงที่การยับยั้ง การคายแสง (Quenching Constant, K_{sv}) ตาม สมการของ Stern-Volmer equation ($I_0/I = 1 + K_{sv} [Q]$) โดยค่า K_{sv} ที่คำนวณได้แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า K_{sv} ของไฟไบโอติน เมื่อไม่มีและมีการจับกับเอวิดินและสเตรปตาวิดิน

ตัวชี้บ่งกับโปรตีน	ไฟไบโอตินอิสระ	ไฟไบโอตินกับเอวิดิน	ไฟไบโอตินกับสเตรปตาวิดิน
$K_{sv} (M^{-1})$	1.023×10^3	2.520×10^2	8.078×10^2

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าในกรณีไฟไบโอตินอิสระเฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ สามารถที่จะเข้าถึงไฟไบโอตินได้ดีกว่าในกรณีที่ไฟไบโอติน จับกับโปรตีนเอวิดินและสเตรปตาวิดิน ซึ่งดูได้จากค่า K_{sv} ของตัวชี้บ่งอิสระที่มากกว่า ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่า ในกรณีที่ไฟไบโอตินมีการจับกับโปรตีนเอวิดิน หมูไฟรีนในโมเลกุลของไฟไบโอติน ถูกฝังอยู่ในโปรตีนในบริเวณที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน ทำให้เฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ ไม่สามารถเข้าถึงหมูไฟรีนได้ ค่า K_{sv} จึงน้อยกว่า แต่การจับกับโปรตีนสเตรปตาวิดินจะจับที่บริเวณผิวด้านนอกของโปรตีนจึงทำให้ เฮกซะมีนโคบอลต์ (III) ไตรคลอไรด์ สามารถที่จะเข้าถึงไฟไบโอตินได้มากกว่า ค่า K_{sv} จึงใกล้เคียงกับค่า K_{sv} ของตัวชี้บ่งอิสระ (Free Probe)

สรุปและอภิปรายผล

ไฟรีนเป็นโมเลกุลที่สามารถดูดกลืนแสงได้ดี ในช่วงความยาวคลื่น 300-400 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่โปรตีนไม่มีการดูดกลืนแสง [8] ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีในการศึกษาการจับกับโปรตีน และไฟรีนมีสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (Absorption Extinction Coefficient) ที่สูง ประมาณ $1.05 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ ที่ 342 นาโนเมตร สามารถใช้สารในปริมาณที่น้อยๆ ในการตรวจสอบได้ การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟไบโอติน เมื่อจับกับเอวิดินและสเตรปตาวิดิน แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม (Micro-environment) ของหมูไฟรีนขณะจับกับโปรตีน ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งสเปกตรัมไปที่ความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น (Red Shift) ทั้งในไฟไบโอตินกับเอวิดิน และไฟไบโอตินกับสเตรปตาวิดิน การลดลงของการคายแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟไบโอตินเมื่อจับกับเอวิดินและเมื่อจับกับสเตรปตาวิดิน เกิดเนื่องมาจาก

การที่หมู่ไพรีนเกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่อยู่ภายในโปรตีน เช่น ทริปโตเฟน (Tryptophan) หรือไทโรซีน (Tyrosine) จึงทำให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของไฟไบโอดีนลดลง งานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อที่จะใช้ศึกษาถึงกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฟไบโอดีนกับเฮวิดอินหรือสเตรปตาวิดอิน รวมไปถึงการศึกษาการตัดโปรตีนโดยการกระตุ้นด้วยแสงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2553

เอกสารอ้างอิง

- [1] Kahne, D.; & Skill, W.C. (1988). Hydrolysis of Peptide Bond in Neutral Water. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 7529–7534.
- [2] Rana, T.M.; & Meares, C. F. (1991). Iron Chelate Mediated Proteolysis: Protein Structure Dependence. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 1859–1861.
- [3] Ettner, N.; et al. (1995). Proximity Mapping of the Tet Repressor-tetracycline-Fe²⁺ Complex by Hydrogen Peroxide Mediated Protein Cleavage. *Biochemistry.* 34(1): 22–31.
- [4] Hegg, E. L.; et al. (1999). Structure-Reactivity Studies in Copper(II)-Catalyzed Phosphodiester Hydrolysis. *Inorg. Chem.* 38(12): 2961–2968.
- [5] Diamandis, E.P.; & Christopoulos, T.K. (1991). The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. *Clinical Chemistry.* 37: 625–636.
- [6] Buranaprapuk, A; & Kumar, C.V. (2000). Protein Scissors: Role of Aromatic Residues on the Binding Affinity and Photocleavage of Efficiency of Pyrenyl Peptides. *Tetrahedron.* 56: 7019–7025.
- [7] Kumar, C.V.; & Buranaprapuk, A. (2002). Chiral Protein Scissors: High Enantiomeric Selectivity for Binding and its Effect on Protein Photocleavage Efficiency and Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(9): 5810–5815.
- [8] Buranaprapuk, A; et al. (2008). Chiral Protein Scissors Activated by Light: Recognition and Protein Photocleavage by a New Pyrenyl Probe. *J. Phys. Chem. B.* 112: 9258–9265.