บทคัดย่อ

การทดลองสกัดแยกอัลบูมินเพื่อใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยเก็บตัวอย่างเลือดซึ่งป้องกันการแข็งตัวด้วย 0.46% trisodium citrate หมุนเหวี่ยงที่ 8600 x g, 10 นาที แยกเม็ดเลือดออกได้น้ำเลือดที่มี pH 7.8 มีโปรตีนในช่วง 5.5 - 7.3% (w/v) เมื่อทำให้โปรตีนในน้ำเลือดตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 50% ที่ 25°C หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย พบว่าประมาณ 47% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือดตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 50% ส่วนใหญ่เป็นโกลบูลิน (globulin) แบ่งสารละลายที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน <u>ส่วนที่ 1</u> เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 65%, มี pH7.1 หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนที่ตก แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ ให้เป็น 70% pH6.9 หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนอีกครั้ง <u>ส่วนที่ 2</u> ปรับ pH เป็น 5.1 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในระดับความอิ่มตัว 60% pH5.0 หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน เพิ่ม $(NH_4)_2SO_4$ เป็น 65% pH4.7 ละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ กันในน้ำ ขจัด $(NH_4)_2SO_4$ ด้วยวิธีไดอะลัยซิส หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนที่ไม่ละลายออก ทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry, หาปริมาณคาร์โบไฮเดรทโดยวิธี phenol – H_2SO_4, ประมาณ 49% ของโปรตีนทั้งหมดตกตะกอนในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 70%; pH7.4 – 6.9 ประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายน้ำประมาณ 48 ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด โปรตีนมีสีเหลือง มีปริมาณคาร์โบไฮเดรทต่ำกว่าที่พบใน BSA fraction V จาก Sigma

เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอัลบูมินโดยวิธี SDS – 10% PAGE โปรตีนที่เตรียมได้มีโปรตีนใกล้เคียงกับ BSA fraction V ของ Sigma มากกว่า 80% ของโปรตีนที่ละลายน้ำเป็นอัลบูมิน นอกจากนี้พบว่าประมาณ 50% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือดตกตะกอนในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65 pH5.1 – 4.7 เป็นโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำ 48% ของโปรตีนทั้งหมด มีปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรทใกล้เคียงกับ BSA fraction V ของ Sigma โปรตีนที่เตรียมได้นี้นำไปใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจหาปริมาณโปรตีนของ unknown แทน BSA fraction V ของ Sigma ได้

เมื่อนำตะกอนที่ตกในระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65% มาละลายด้วยน้ำแล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ จนถึงระดับความอิ่มตัว 50% หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนจำนวนน้อยออกจากสารละลาย แล้วตกตะกอนอัลบูมินในสารละลายที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60% ช่วง isoeloctric pH5.1 – 4.8 ทำให้ได้โปรตีนที่มีระดับความบริสุทธิ์ของอัลบูมินสูงขึ้น เมื่อนำตะกอนนี้มาละลายและตกตะกอนซ้ำที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ และ pH ข้างต้น ทำให้ได้อัลบูมินบริสุทธิ์สีขาว ประมาณ 6% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือดน้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน จาก SDS – PAGE

Abstract

Fractionation and purification of albumin from bovine plasma were carried out using bovine blood collected using 0.46% tri-sodium citrate as anticoagulant. Bovine plasma was obtained by centrifuged at 86,000 x g 10 min. The plasma pH is 7.8 with 5.5 – 7.3% protein (w/ v). When ammonium sulfate was added to the plasma protein to 50% saturation, 47% of total protein mainly globulin was precipitated. Supernatant and precipitate were separated by centrifugation. The supernatant was divided into two portions. In the first portion ammonium sulfate was added to 65% saturation, pH of the solution was 7.1. The precipitate was separated by centrifugation, Protein in the supernatant was further precipitated by adding ammonium sulfate to 70%, pH 6.9 and centrifuged. The pH of the second portion of supernatant was adjusted to 5.1 and ammonium sulfate was added to 60% saturation and centrifuged. Ammonium sulfate in the supernatant was then increased to 65% saturation pH 4.7. Protein precipitates obtained at various concentrations of ammonium sulfate were dissolved in water and dialyzed to remove ammonium sulfate, centrifuged to get rid of insoluble protein. The soluble protein was freeze dried. Protein and carbohydrate determinations were performed using Lowry and Phenol – sulfuric methods, respectively. Approximately 49% of total protein was precipitated at > 50 – 70% saturated ammonium sulfate, pH 7.4 – 6.9 and 48% of the protein was water soluble. The protein is yellowish in color with lower content of carbohydrate than BSA fraction V from Sigma.

The purity of the albumin was checked by using SDS – 10% PAGE it was found that more than 80% of the water soluble protein prepared is albumin with approximately the same amount of protein and carbohydrate as those of BSA fraction V from Sigma.

When the protein precipitated in 50 – 65% saturated ammonium sulfate was dissolved in water and reprecipitated twice with 60% saturated ammonium sulfate isoelectric pH 5.1 – 4.8 the protein precipitated is with higher percentage albumin the albumin is whitish, and is about 6% of protein in plasma, Molecular weight of the protein is 66,000 dalton as judged from SDS – PAGE.