บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 ส่วนประกอบของน้ำเลือด

จากการเตรียมน้ำเลือดโดยใช้ 4.56% ไตรโซเดียมซิเตรทไดไฮเดรท 1 ส่วน ป้องกันการแข็งตัวของเลือด 9 ส่วน โดยปริมาตร หมุนเหวี่ยงที่ 8,600xg พบว่าเลือดประกอบด้วยส่วนเซลล์อัดแน่น 36-38% และน้ำเลือดสีเหลือง 62-64% โดยปริมาตร น้ำเลือดที่มี 0.456% ไตรโซเดียมซิเตรทมี pH 7.8-7.9 ประกอบด้วยโปรตีนที่มีคาร์โบไฮเดรตเฉลี่ย 2.5% ประมาณ 5.5 – 7.8% โดยน้ำหนัก/ ปริมาตร (w/v) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ โปรตีนที่ละลายใน 0.9% NaCl แต่ไม่ละลายน้ำประมาณ 13% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด และโปรตีนที่ละลายได้ทั้งใน 0.9% NaCl และน้ำ มีอยู่ประมาณ 87% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด (มีอยู่ 4.785 – 6.786/ น้ำเลือด 100 มล.) โดยโปรตีนที่ละลายน้ำมีคาร์โบไฮเดรต 1.7% เมื่อใช้ glucose เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ และมากกว่า 50% ของโปรตีนที่ละลายน้ำเป็น albumin (ประมาณจากความหนา ความเข้มของสีของโปรตีนช่องที่ 4 ของรูปที่ 9, ช่องที่ 4 ของรูปที่ 10 และช่องที่ 4 ของรูปที่ 11)

3.2 ผลได้ของการสกัดแยกอัลบูมิน

ผลได้ของการสกัดแยกโปรตีนในน้ำเลือดออกเป็นส่วน ๆ ตามวิธีที่ 1 และ 2 เป็นไปตามตารางที่ 1 คือ ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ มากกว่าศูนย์จนถึง 50% (>0 – 2.05 M) pH7.4 ประมาณ 47% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด แบ่งออกเป็น โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 11.75% และโปรตีนที่ละลายน้ำ 35.25% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด (ประมาณ 90% ของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำเลือดตกตะกอนในช่วงนี้และประมาณ 40.5% ของโปรตีนที่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำเลือดตกตะกอนในช่วงนี้) โดยโปรตีนที่ละลายน้ำมีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 1.6% เมื่อใช้ glucose เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ มีอัลบูมินผสมอยู่กับ prealbumin และ globulin (ช่องที่ 5 รูปที่ 9 ช่องที่ 4 ของรูปที่ 10 และช่องที่ 5 ของรูปที่ 11)

ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 60 – 65% (2.46 – 2.665 M) pH7.1 มีสีเหลือง ประมาณ 32.5% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด แบ่งออกเป็น โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 1.04% ของโปรตีนในน้ำเลือด และโปรตีนที่ละลายน้ำ 31.46% ของโปรตีนในน้ำเลือด โดยโปรตีนที่ละลายน้ำมีสีเหลือง มีปริมาณโปรตีนเป็น 97% ของ BSA fractionV ประกอบด้วยอัลบูมินเป็นส่วนใหญ่ (ช่องที่ 7 ของรูปที่ 9 และ ช่องที่ 6 ของรูปที่ 10)

ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 65 – 70% (2.255 – 2.9725 M) pH6.9 มีสีเหลือง ประมาณ 17% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด แบ่งออกเป็น โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 0.2% ของโปรตีนในน้ำเลือด และโปรตีนที่ละลายน้ำ 16.8% ของโปรตีนในน้ำเลือด โดยโปรตีนที่ละลายน้ำมีสีเหลือง มีปริมาณโปรตีนเป็น 97% ของ BSA fractionV มีคาร์โบไฮเดรต 1.7% เมื่อใช้ glucose เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน (ช่องที่ 7 ของรูปที่ 9)

ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 70 – 72.5% (2.86 – 2.9725 M) pH 6.8 มีสีขาว ประกอบด้วย โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำน้อยมาก ๆ และโปรตีนที่ละลายน้ำประมาณ 0.499% ของโปรตีนในน้ำเลือด มีสีขาว ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 2.8%

ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 72.5% pH6.8 มีสีเหลือง ประมาณ 50% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด ประกอบด้วย โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 1.25% ของโปรตีนในน้ำเลือด และโปรตีนที่ละลายน้ำ มีสีเหลือง มีคาร์โบไฮเดรต 1.6% ของโปรตีนในน้ำเลือด ส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน (ช่องที่ 6 ของรูปที่ 9 , ช่องที่ 5 ของรูปที่ 10)

ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 55 – 60%) (2.255 – 2.46 M) pH5 ประมาณ 49.6% ของโปรตีนในน้ำเลือด มีสีเหลือง ประกอบด้วย โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ 1.2% และโปรตีนที่ละลายน้ำ 48.4% ของโปรตีนในน้ำเลือด (ประมาณ 90% ของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำเลือดตกตะกอนในช่วงนี้ และประมาณ 55.6% ของโปรตีนที่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำเลือด ตกตะกอนในช่วงนี้) โดยโปรตีนที่ละลายน้ำมีปริมาณโปรตีนประมาณ 96% ของ BSA fractionV ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 1.7%
ส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน (ช่องที่ 7 ของรูปที่ 11) มีสีเหลือง, (ช่องที่ 5 ของรูปที่ 12) เข้มกว่า BSA fraction V ที่ซื้อมาใช้ (ช่องที่ 4 รูปที่ 12) เล็กน้อย

ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ มากกว่า 60 - 65% (>2.46 – 2.665 M) pH4.7 มีสีเหลือง ประมาณ 2.6% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด ประกอบด้วย โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ 0.04% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด และโปรตีนที่ละลายน้ำ 2.56% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด (ประมาณ 0.3% ของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำเลือดตกตะกอนในช่วงนี้และเพียง 2.9% ของโปรตีนที่ละลายน้ำทั้งหมดในน้ำเลือด ตกตะกอนในช่วงนี้) โดยโปรตีนที่ละลายน้ำส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน (ช่องที่ 8 ของรูปที่ 11) มีสีเหลือง, (ของที่ 6 ของรูปที่ 12) เข้มกว่า BSA fractionV ที่ซื้อมาใช้ (ช่องที่ 4 รูปที่ 12) เล็กน้อย แต่มีคาร์โบไฮเดรตต่ำกว่า คือ โปรตีนนี้ (ช่องที่ 6 ของรูปที่ 2) มีคาร์โบไฮเดรต 1.7% เมื่อใช้ glucose เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ในขณะที่ BSA fractionV มีคาร์โบไฮเดรต 2.9%

ตะกอนในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ มากกว่า 65 – 72.5% (>2.665 – 2.9725 M) pH4.5 ประมาณ 0.24% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด ประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 0.001% และโปรตีนที่ละลายน้ำประมาณ 0.239% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 1.7% โดยโปรตีนที่ละลายน้ำส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน (ช่องที่ 9 ของรูปที่ 11) มีสีเหลืองอ่อนกว่า (ของที่ 7 ของรูปที่ 12) BSA fractionV

ตะกอนในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 50 – 72.5% (2.255 – 2.9725 M) pH4.5 มีสีเหลือง ประมาณ 52.5% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด ประกอบด้วย โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 1.260% ของโปรตีนในน้ำเลือด และโปรตีนที่ละลายน้ำ 51.24% ของโปรตีนในน้ำเลือด โดยโปรตีนที่ละลายน้ำส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน (ช่องที่ 6 ของรูปที่ 11) มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 1.7% เมื่อใช้ glucose เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ

ตารางที่ 1 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในน้ำเลือดที่ตกตะกอน ที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ และ pH ต่าง ๆ

สภาวะที่ทำให้ตกตะกอนที่ 25°C		คิดเป็นเปอร์เซนต์ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำเลือด		
ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$	pH	ตะกอนทั้งหมด สี (ก)	ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ สีขาว (ข)	ส่วนที่ละลายน้ำ สี (ค) (% CH_2O)
0 – 50%	7.4	47% สีขาว	11.75%	35.2% สีขาว (1.6%)
> 50 – 65%	7.1	32.5% สีเหลือง	1.04%	31.46% สีเหลือง (1.6%)
> 65 – 70%	6.9	17% สีเหลือง	0.2%	16.8% สีเหลือง (1.7%)
> 70 – 72.5%	6.8	0.5% สีขาว	น้อยมาก	ประมาณ 0.5% สีขาว (2.8%)
50 – 72.5%	6.8	50% สีเหลือง	1.25%	48.75% สีเหลือง (1.6%)
> 55 – 60%	5.0	49.6% สีเหลือง	1.2%	48.4% สีเหลือง (1.7%)
> 60 – 65%	4.7	2.6%	0.04%	2.56% สีเหลือง (1.7%)
> 65 – 72.5%	4.5	0.24%	0.001%	0.239% สีเหลืองอ่อน (1.7%)
> 50 – 72.5%	4.5	52.5% สีเหลือง	1.26%	51.24% สีเหลือง (1.7%)

% CH_2O หมายถึง % คาร์โบไฮเดรทในกลัยโคโปรตีน เมื่อใช้ glucose เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ

สี (ก) หมายถึง สีของตะกอนทั้งหมด

สีขาว (ข) หมายถึง สีของตะกอนส่วนที่ไม่ละลายน้ำ

สี (ค) หมายถึง สีของโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำหลังจากทำให้แห้ง

การทำให้ตะกอน ที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65% pH7.1 มีระดับความบริสุทธิ์ของอัลบูมินเพิ่มขึ้น โดยการนำตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65% pH7.1 (จากน้ำเลือด 1,000 มล.) มาละลายน้ำกลั่น 250 มล. แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในอัตรา 31.5 กรัม ต่อสารละลาย 100 มล. หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย ปรับ pH ให้เป็น 5.1 แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ พร้อมทั้งคนที่ 25°C จนกระทั่งเริ่มเกิดตะกอนแล้วเติม ต่ออีกจนถึงระดับความอิ่มตัว 60% หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย นำตะกอนที่ได้มาละลายน้ำกลั่น 125 มล. แล้วทำให้ตกตะกอนซ้ำในช่วง pH5.1 – 4.8 ระดับความอิ่มตัว $(NH_4)_2SO_4$ 60% แยกตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ ให้ผลดังตารางที่ 2 ทำให้ได้ตะกอนที่มีสีขาวของอัลบูมินบริสุทธิ์ มีน้ำหนักโมเลกุล 66000 ดาลตัน ประมาณ 6% ของโปรตีนในน้ำเลือด

ตารางที่ 2 ตะกอน ที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65%

ครั้งที่	ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$	สีของผลได้ (%ของโปรตีนในน้ำเลือด)	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%ของ BSA fractionV)	ปริมาณโปรตีน (% ของ BSA fractionV)	ระดับความบริสุทธิ์ของอัลบูมิน
1	> 50 65% pH7.1	สีเหลือง (32.5%)	53	97	ต่ำกว่า BSA fractionV
2	250 มล. (ก) 60% sat pHI	เหลืองอ่อน			
3	125 มล. (ก.1) 60% sat pHI	ขาว (6%)	29	103	สูงกว่า BSA fractionV (MW66kDa)
4	ส่วนเหลือของ 2 65% sat pHI	ขาว (0.7%)	55	101	สูงกว่า BSA fractionV
5	ส่วนเหลือของ 3 65% sat pHI	ขาว (1.2%)	50	102	ใกล้เคียงกับ BSA fractionV
1*	> 65 - 70% pH6.9	เหลือง (17%)	58	97	ต่ำกว่า BSA fractionV
2*	125 มล. (ก) 60% sat pHI	ขาว (1.7%)	32		สูงกว่า BSA fractionV (MW66kDa)
3*	ส่วนเหลือของ 2* 65% sat pHI	ขาว (0.2%)	60	101	ต่ำกว่า BSA fractionV

pHI หมายถึง pH5.1 – 4.8

2(ก) หมายถึง ตะกอนที่ตกในระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65% pH7.1 (จากน้ำเลือด 1 ลิตร) ละลายน้ำ 250 มล. ทำให้ตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60% pH 5.1 - 4.8

3(ก.1) หมายถึง ตะกอนจาก 2 ละลายน้ำ 125 มล. ทำให้ตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60% pH 5.1 – 4.8

2*(ก) หมายถึง ตะกอนที่ตกในระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 65 – 70% pH6.9 (จากน้ำเลือด 1 ลิตร) ละลายน้ำ 125 มล. ทำให้ตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60% pH5.1 – 4.8

การทำให้ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65% pH4.7 มีระดับความบริสุทธิ์ของอัลบูมินเพิ่มขึ้น โดยการนำตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65% pH4.7 (จากน้ำเลือด 1,000 มล.) มาละลายน้ำกลั่น 300 มล. แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในอัตรา 31.5 กรัม ต่อสารละลาย 100 มล. หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย ปรับ pH ให้เป็น 5.1 แล้วเติม $(NH_4)_2SO_4$ พร้อมทั้งคนที่ 25°C จนกระทั่งเริ่มเกิดตะกอนแล้วเติม ต่ออีกจนมี หมุนเหวี่ยงแยกตะกอนออกจากสารละลาย นำตะกอนที่ได้มาละลายน้ำกลั่น 100 มล. แล้วทำให้ตกตะกอนซ้ำในช่วง pH5.1 – 4.8 ระดับความอิ่มตัว $(NH_4)_2SO_4$ 60% แยกตะกอนที่ได้ไปวิเคราะห์ ให้ผลดังตารางที่ 3 ได้อัลบูมินบริสุทธิ์มีสีขาว น้ำหนักโมเลกุล 66000 ดาลตัน ประมาณ 6% ของโปรตีนในน้ำเลือด

ตารางที่ 3 การทำให้ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65% pH4.7 มีระดับความบริสุทธิ์ของอัลบูมินเพิ่มขึ้น

ครั้งที่	ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$	สีของผลได้ (%ของโปรตีนในน้ำเลือด)	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%ของ BSA fractionV)	ปริมาณโปรตีน (%ของ BSA fractionV)	ระดับความบริสุทธิ์ขอุงอัลบูมิน
1	> 50 – 65% pH4.7	เหลือง (49.6%)	59	96	ต่ำกว่า BSA fractionV
2	300 มล. (ก1) 60% sat pHI				
3	100 มล. (ก2) 60% sat pHI	ขาว (6%)	42	102	สูงกว่า BSA fractionV (MW66kDa)
4	ส่วนเหลือของ 2 และ3 65% sat pHI	ขาว (1.6%)	32	99	ต่ำกว่า BSA fractionV

pHI หมายถึง pH5.1 – 4.8

2(ก1) หมายถึง ตะกอนที่ตกในระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 50 – 65% pH4.7 (จากน้ำเลือด 1 ลิตร) ละลายน้ำ 300 มล. ทำให้ตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60% pH5.1 – 4.8

3(ก.1) หมายถึง ตะกอนจาก 2 ละลายน้ำ 100 มล. ทำให้ตกตะกอนที่ระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ 60% pH 5.1 – 4.8

3.3 ต้นทุนของการเตรียมผลิตภัณฑ์

ต้นทุนของการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่มีระดับโปรตีน 96-97% ของ BSA fraction V (ช่องที่ 5,6,7 ในรูปที่ 12) คิดเป็น 11% ของ BSA fraction V รหัส A2153 (10 กรัม 40.50 เหรียญ) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงต้นทุนของการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่มีระดับโปรตีน 96-97% ของ BSA fraction V

ค่าใช้จ่าย	จำนวนเงิน (บาท)
ค่าน้ำมันรถในการเดินทางไปเก็บตัวอย่างเลือด 1,720 มล. ประมาณ	34.00
ค่าโซเดียม ซิเตรท ไดไฮเดรต 7.9 กรัม	5.00
ค่าหมุนเหวี่ยงที่ 7,500 รอบ/นาที 4°C 10 นาที 3 ครั้ง , กินไฟ 1.2 หน่วย $(NH_4)_2SO_4$	3.00
ผง SO_4 393 กรัม ราคา	134.00
ค่าถุงไดอะลัยซิส 2 ฟุต	57.00
parafilm ผูกหัวท้ายถุง	2.00
น้ำกลั่น 6 ลิตร	18.00
HCl	1.00
ค่าไฟฟ้าการหมุนเหวี่ยง	5.00
ค่าไฟในการคนระหว่างไดอะลัยซิส	20.00
ค่าไฟฟ้าในการ Freeze dry	150.00
ค่าบรรจุขวดพลาสติก ขวดละ 5 กรัม 5 ขวด ขวดละ 2 กรัม 1 ขวด	60.00
รวม	**489.00**

ต้นทุนในการเตรียมโปรตีน 27 กรัม รวม 489.00 บาท ประมาณ 11% ของราคาซื้อ BSA fractionV รหัส A2153 27 กรัม (109.35 เหรียญสหรัฐ เท่ากับ 109.35 x 40 = 4,374 บาท) และประมาณ 4% เมื่อซื้อผ่านตัวแทนจำหน่ายภายในประเทศ (1 เหรียญสหรัฐ ประมาณ 100 บาท)

ต้นทุนของการสกัดการทำให้อัลบูมินบริสุทธิ์ 3 กรัม,ละลายใน 0.9% sodium chloride, 0.05% sodium azide ให้มีความเข้มข้น 1 มก/มล , การบรรจุโดยการฉีดสารละลายผ่านแผ่นกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร (µm) จำนวน 3,000 หลอด ลงสู่หลอด หลอดละ 1 มล. (รูปที่ 13) ประมาณ 1.8% ของโปรตีนมาตรฐาน รหัส P0914 จาก sigma (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงต้นทุนของการสกัดการทำให้อัลบูมินบริสุทธิ์

ค่าใช้จ่าย	จำนวนเงิน (บาท)
ค่าสกัดในข้อ 3.10.1 จำนวน	427.00
ค่าน้ำกลั่น	5.00
ค่า $(NH_4)_2 SO_4$ 230 กรัม	79.00
ค่าไฟฟ้าในการหมุนเหวี่ยง	5.00
ค่า MHCl	1.00
ค่าตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS – 10% PAGE	200.00
ค่า Sodium azide 1.5 กรัม	51.00
ค่า NaCl	5.000
ค่าการกรองแบคทีเรีย	3,000.00
ค่าหลอดบรรจุ 3,000 หลอดและ parafilm	4,000.00
รวม	7,773.00

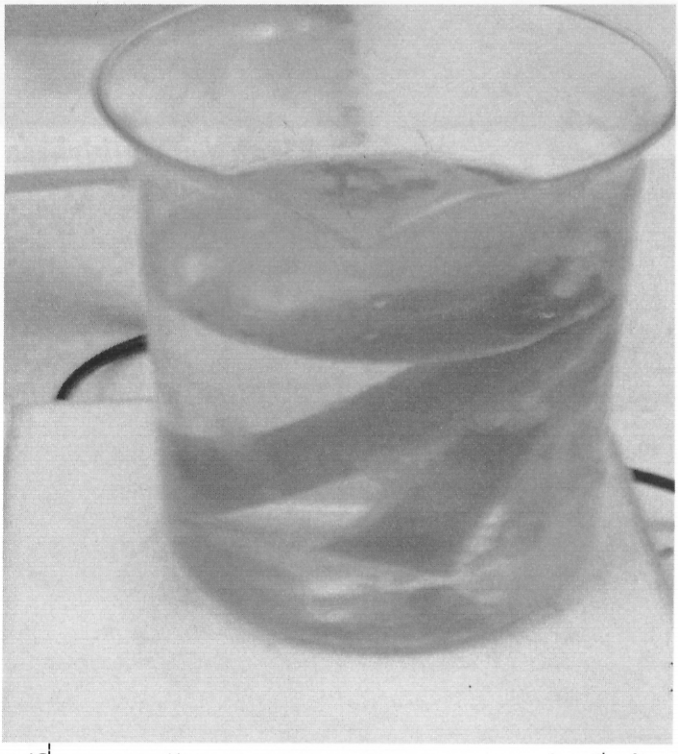
ต้นทุนในการเตรียม 7,773.00 บาท คิดเป็น 1.8% ของอัลบูมินรหัส P0914 (3000 หลอด 10,740 เหรียญสหรัฐ 429,600 บาท เมื่อคิด 1 เหรียญสหรัฐ เท่ากับ 40 บาท)

นอกจากนี้ ยังพบว่า ต้นทุนของการเตรียมอัลบูมิน น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน บรรจุในซองแบบซิปรูดปิด ใส่สารป้องกันความชื้น บรรจุขวด (รูปที่ 13) ประมาณ1% ของอัลบูมินรหัส A7517 น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน จาก sigma

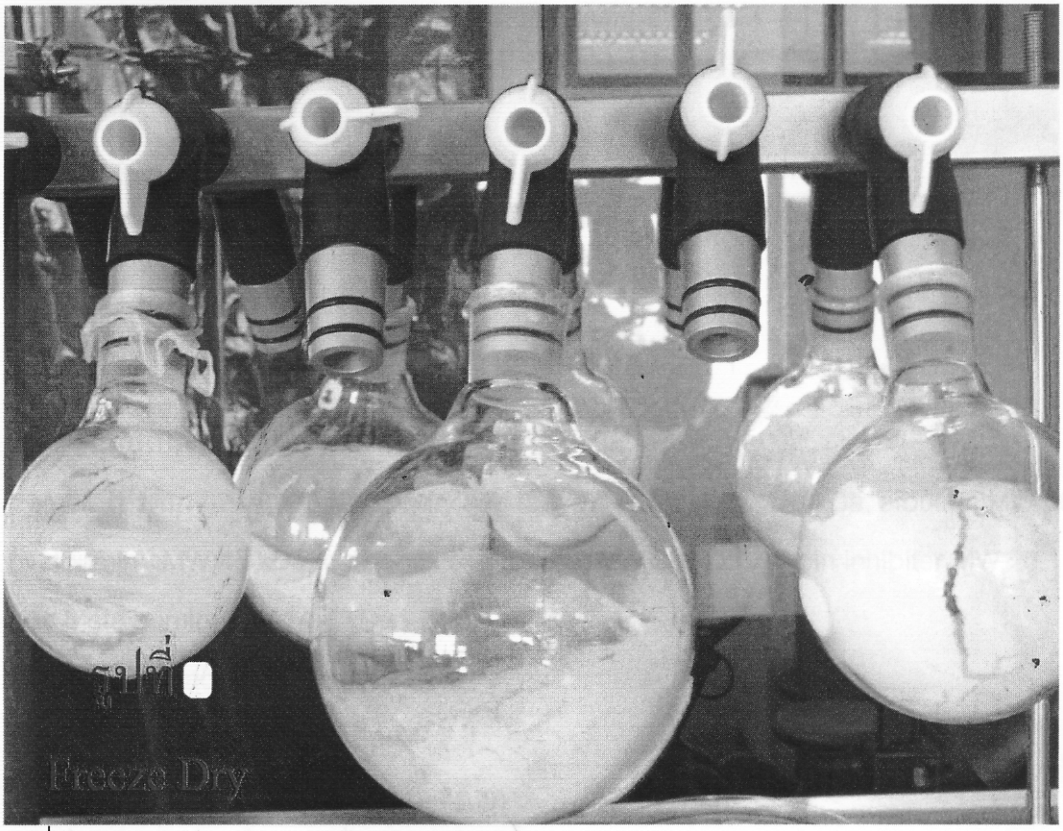
รูปที่ 4 น้ำเลือด (plasma)

รูปที่ 5 ตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 55 – 65% pH7.1และ > 55 – 70% pH6.9

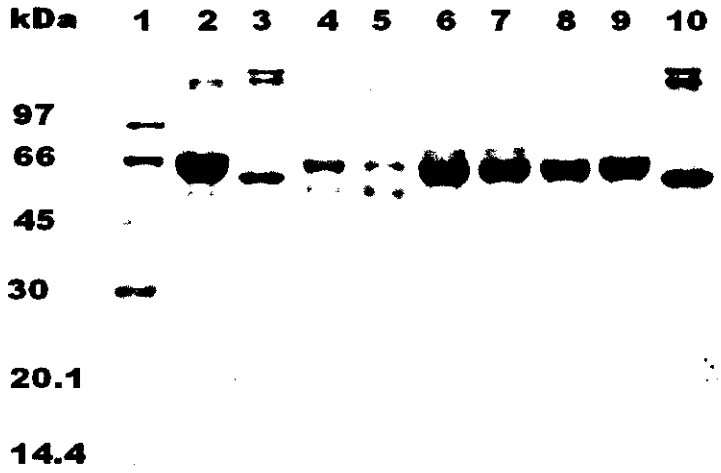
รูปที่ 6 สารละลายของตะกอนที่ตกในช่วงระดับความอิ่มตัวของ $(NH_4)_2SO_4$ > 55 – 60% pH 5.0 , ในช่วง > 60 – 65% pH4.7และ > 65 – 72.5% pH4.50



รูปที่ 7 การขจัด$(NH_4)_2SO_4$ออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธีไดอะลัยซิส



รูปที่ 8 การทำให้โปรตีนแห้งโดยวิธี Freeze dry



<u>รูปที่ 9</u> แถบโปรตีนที่ได้จากการทำ SDS – 10%PAGE

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (phosphorylase MW 97 กิโลดาลตัน หรือ kDa, albumin.MW 66 kDa , ovalbumin MW 45 kDa, carbonic anhydrase MW 30 kDa , trypin inhibiter MW 20.1 kDa และ lactalbumin MW 14.4 kDa)

ช่องที่ 2 BSA fractionV ที่ซื้อมาใช้

ช่องที่ 3 และ 10 โปรตีนในน้ำเลือด

ช่องที่ 4 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของน้ำเลือด

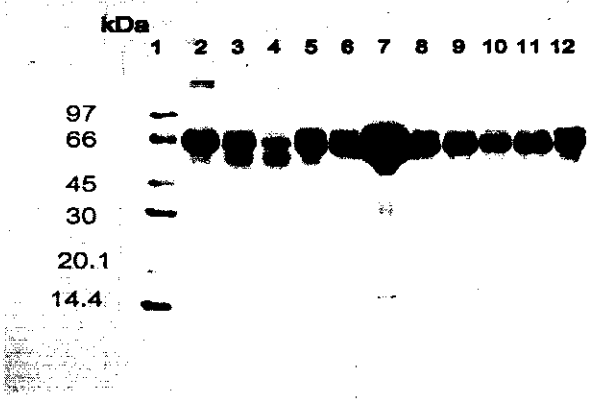
ช่องที่ 5 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง >0 – 50% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH7.4

ช่องที่ 6 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง > 50 – 72.5% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH6.8

ช่องที่ 7 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง > 60 – 65% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH7.1

ช่องที่ 8 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ได้จากการนำตะกอนที่ตกในช่วง > 60 – 65% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH7.1 มาละลายและตกตะกอนซ้ำในช่วง 60% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.1 – 4.8, 2 ครั้ง

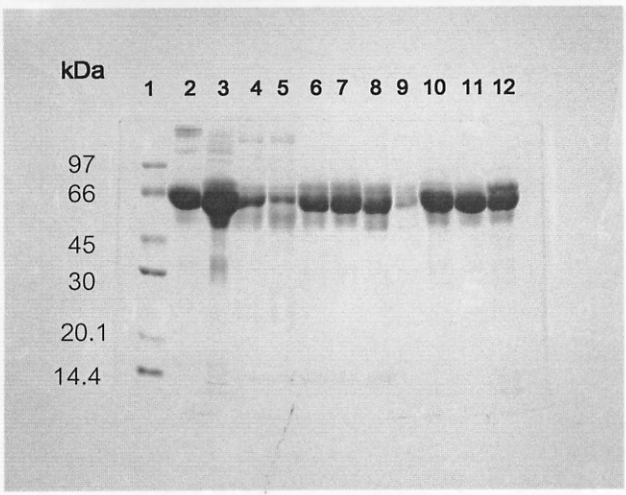
ช่องที่ 9 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ได้จากการนำตะกอนที่ตกในช่วง > 65 – 70% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH6.9 มาละลายและตกตะกอนซ้ำในช่วง 60% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.1 – 4.8, 2 ครั้ง



<u>รูปที่ 10</u> แถบโปรตีนในการทำ SDS – 10%PAGE

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน(phosphorylase MW 97 กิโลดาลตัน หรือ kDa, albumin MW 66 kDa , ovalbumin MW 45 kDa, carbonicanhydrase MW 30 kDa , Trypin inhibiter MW 20.1 kDa และ lactalbumin MW 14.4 kDa) , ตัวอย่าง carbonic anhydrase ช่องที่ 2 BSA fractionV ที่ซื้อมาใช้,ช่องที่ 3 โปรตีนในน้ำเลือด

ช่องที่ 4 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง >0 – 50% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH7.4,ช่องที่ 5 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง >50 – 72.5% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH6.8,ช่องที่ 6 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง >60 – 65% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH7.1,ช่องที่ 7 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ได้จากการทำตะกอนที่ตก,ช่องที่ 8, 9 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนหลังจากการสกัดอัลบูมินในช่องที่ 7 แล้วทำให้ตกตะกอนในช่วง >60 – 65% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.1 – 4.8,ช่องที่ 10 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง >65 – 70% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH7.07 – 6.9,ช่องที่ 11 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ได้จากการนำตะกอนที่ตกในช่วง > 65 – 70% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH6.9 มาละลายและตกตะกอนซ้ำในช่วง 60% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.1 – 4.8, 2 ครั้ง , ช่องที่ 12 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนหลังจากสกัดอัลบูมินในช่องที่ 11 และทำให้ตกตะกอนซ้ำที่ > 60 – 65% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.1 – 4.8



รูปที่ 11 แถบโปรตีนในการทำ SDS – 10%PAGE

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน (phosphorylase MW 97kDa albumin MW 66kDa, ovalbumin 45kDa, carbonic anhydrase 30kDa, trypsin inhibitor 20.1 kDa, lactalbumin MW 14.4kDa),ช่องที่ 2 BSA fraction V ที่ซื้อมาใช้,ช่องที่ 3 โปรตีนส่วนที่ละลายของตะกอนที่ตกในช่วง > 70 – 72.5% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH6.8,ช่องที่ 4 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของน้ำเลือด ช่องที่ 5 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง > 0 – 50% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH7.9 – 7.4, ช่องที่ 6 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง > 50 – 72.5% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH4.5, ช่องที่ 7 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง > 55 – 60% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5 , ช่องที่ 8 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง > 60 – 65% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH4.7, ช่องที่ 9 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง > 65 – 72.5% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH4.5, ช่องที่ 10 และ 11 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่สกัดซ้ำในช่วง 60% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.1 – 4.8 จำนวน 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง ตามลำดับ,

ช่องที่ 12 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนหลังจากการสกัดอัลบูมินในช่องที่ 10 และ 11 ทำให้ตกตะกอนแล้ว ในช่วง > 60 – 65% pH5.1 – 4.8

รูปที่ 12 แสดงถึงสีของผลผลิตที่ได้ เทียบกับน้ำเลือดและ BSA fractionV ที่ซื้อมาใช้

ช่องที่ 1 น้ำเลือด

ช่องที่ 2, 3 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำในเลือด

ช่องที่ 4 BSA fractionV ที่ซื้อมาใช้

ช่องที่ 5 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง >55 – 60% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.0 (ใช้แทน BSA fractionV ได้)

ช่องที่ 6 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง >60 – 65% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH4.7 (ใช้แทน BSA fractionV ได้)

ช่องที่ 7 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ตกในช่วง >65 – 72.5% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH4.5

ช่องที่ 8, 9 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่สกัดซ้ำในช่วง 60% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.1 – 4.8 จำนวน 1 ครั้ง และ 2 ครั้ง ตามลำดับ

ช่องที่ 10 โปรตีนส่วนที่ละลายน้ำของตะกอนที่ได้จากการนำตะกอนที่ตกในช่วง > 60 – 65% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH7.1 มาละลายและตกตะกอนซ้ำในช่วง 60% sat $(NH_4)_2SO_4$ pH5.1 – 4.8 , 2 ครั้ง (ใช้แทนอัลบูมินรหัส A2153 และน่าจะใช้แทนรหัส P0914 ได้)

รูปที่ 13 อัลบูมินที่เป็นผลผลิต 1 อัลบูมินที่มีระดับความบริสุทธิ์สูง 1 มก./ มล. 0.9% sodium chloride, 0.05% sodium azide (ใช้แทนรหัส P0914 ได้) และ (2) อัลบูมินน้ำหนักโมเลกุล 66,000 dalton บรรจุอยู่ในขวด (ใช้แทน A7517 ได้)