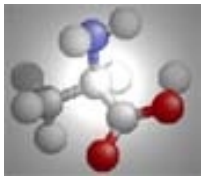
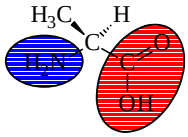
กรดอะมิโน, เป็ปไตด์และโปรตีน (Amino acid, peptides and Proteins)



โปรตีน (proteins) เป็นโมเลกุลชีวภาพ (biomolecules) ที่เกิดขึ้นในอวัยวะของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีหลายชนิดและมีหน้าที่ทางชีวภาพแตกต่างกันออกไป อย่างเช่น เคราติน (keratin) ของผิวหนังและเล็บ, ไฟโบรอิน (fibroin) ในไหมและใยแมงมุม และ DNA polymerase ที่ช่วยเร่งการสังเคราะห์ DNA ในเซล ซึ่งทั้งหมดนี้ก็เป็นโปรตีน ถ้าไม่คำนึงถึงลักษณะภายนอกและหน้าที่แล้ว โปรตีนทุกชนิดจะเกิดจากกรดอะมิโน (amino acids) จำนวนหลายๆ หน่วยมาเชื่อมต่อเข้าด้วยกันจนเป็นโซ่ยาว (long chains)

ดังชื่อที่เรียกขาน "*กรดอะมิโน (amino acid)*" ซึ่งก็เป็นการบอกเป็นนัยว่าสารประกอบนี้เป็นสารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ ซึ่งประกอบด้วยหมู่อะมิโน (amino; $–NH_2$) ที่มีคุณสมบัติเป็นเบส และหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl; -COOH) ที่มีคุณสมบัติเป็นกรด



Alanine

ประโยชน์ของกรดอะมิโนก็คือเป็น building block สำหรับโปรตีน (protein) ซึ่งเกิดจากการที่กรดอะมิโนมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเป็ปไตด์ (peptide) ซึ่งก็คือพันธะเอมีด (amide) นั่นเอง โดยทั่วไปกรดอะมิโนสามารถจำแนกได้เป็นประเภทย่อยๆ ดังนี้คือ

- **ไดเป็ปไตด์ (dipeptides)** : เกิดจากกรดอะมิโน 2 ตัวมาเชื่อมต่อกัน โดยหมู่ $–NH_2$ ของกรดอะมิโนตัวหนึ่งไปเกิดพันธะเป็ปไตด์กับหมู่ –COOH ของกรดอะมิโนอีกตัวหนึ่ง

- **ไตรเป็ปไตด์ (tripeptides)** : เกิดจากกรดอะมิโน 3 ตัวมาเชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะเป็ปไตด์ 2 พันธะ

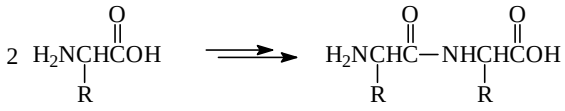
.

.

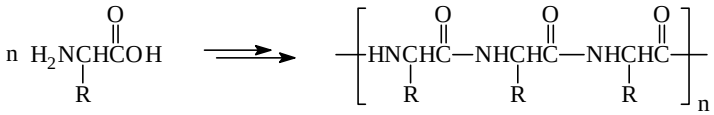
.

- **โพลีเป็ปไตด์ (polypeptides)** : เกิดจากกรดอะมิโนหลายๆ ตัวมาเชื่อมต่อเป็นโซ่ยาว แต่จำนวนหน่วยของกรดอะมิโนจะมีน้อยกว่า 50 หน่วย

- **โปรตีน (proteins)** : **โพลีเป็ปไตด์สายยาว (long chain)** ที่มีจำนวนหน่วยของกรดอะมิโนจะมีมากกว่า 50 หน่วยขึ้นไป



ไดเป็ปไตด์ (มีพันธะเอมีดเพียง 1 พันธะ)

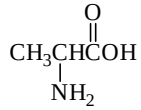
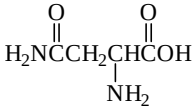
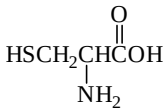
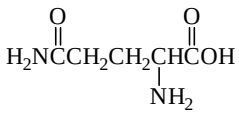
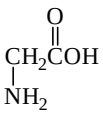
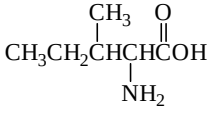


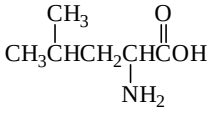
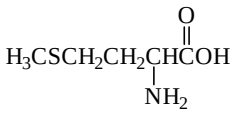
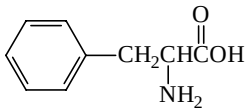
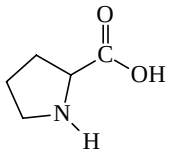
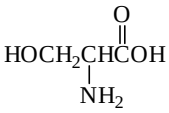
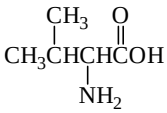
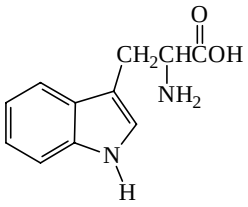
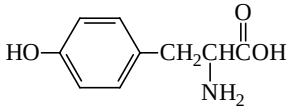
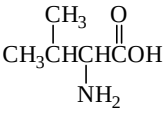
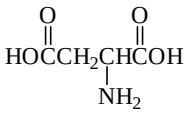
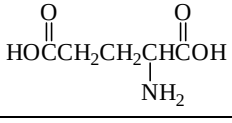
โพลีเป็ปไตด์ (มีพันธะเอมีดหลาย ๆ พันธะ)

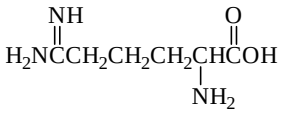
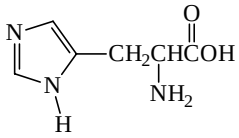
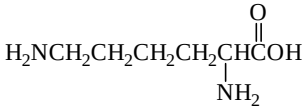
1. โครงสร้างและการเรียกชื่อ (Structure and name)

กรดอะมิโนชนิด α (α-amino acid) คือ กรดอะมิโนที่มีหมู่อะมิโนต่ออยู่กับอะตอมคาร์บอนที่อยู่ถัดจากหมู่คาร์บอนิล (C=O) กรดอะมิโนที่พบโดยทั่วๆ ไปจะมีทั้งสิ้น 22 ชนิด แต่ที่ร่างกายใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนมีเพียง 20 ชนิดเท่านั้น (ดูได้จากตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 โครงสร้างของกรดอะมิโน 20 ชนิดที่พบโดยทั่วไปในโปรตีน (กรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อสารอาหารของมนุษย์จะมีเครื่องหมาย * กำกับไว้)

ชื่อ	**อักษรย่อ**	**มวลโมเลกุล**	**โครงสร้าง**	Isoelectric point	pK_a **α**-COOH	pK_a **α**-NH_3^+
กรดอะมิโนที่เป็นกลาง (Neutral amino acids)						
Alanine	Ala (A)	89		6.00	2.34	9.69
Asparagine	Asn (N)	132		5.41	2.02	8.80
Cysteine	Cys (C)	121		5.07	1.96	10.28
Glutamine	Gln (Q)	146		5.65	2.17	9.13
Glycine	Gly (G)	75		5.97	2.34	9.60
Isoleucine*	Ile (I)	131		6.02	2.36	9.60

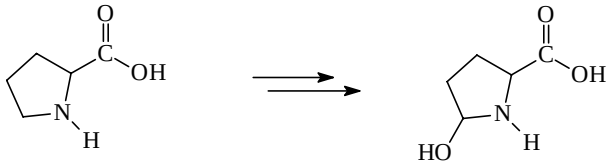
ชื่อ	อักษรย่อ	น้ำหนักโมเลกุล	โครงสร้าง	Isoelectric point	pK_a α-COOH	pK_a α-NH_3^+
Leucine*	Leu (L)	131		5.98	2.36	9.60
Methiomonine*	Met (M)	149		5.74	2.28	9.21
Phenylalanine*	Phe (F)	165		5.48	1.83	9.13
Proline	Pro (P)	115		6.30	1.99	10.60
Serine	Ser (S)	105		5.68	2.21	9.15
Threonine*	Thr (T)	119		5.60	2.09	9.10
Trypophan*	Try (W)	204		5.89	2.83	9.39
Tyrosine	Tyr (Y)	181		5.66	2.20	9.11
Valine*	Val (V)	117		5.96	2.32	9.62
กรดอะมิโนที่เป็นกรด (Acidic amino acids)						
Aspartic acid	Asp (D)	133		2.77	1.88	9.60
Glutamic acid	Glu (E)	147		3.22	2.19	9.67

ชื่อ	อักษรย่อ	น้ำหนักโมเลกุล	โครงสร้าง	Isoelectric point	pK_a α-COOH	pK_a α-NH_3^+
กรดอะมิโนที่เป็นเบส (Basic amino acids)						
Arginine*	Arg (R)	174		10.76	2.17	9.04
Histidine*	His (H)	155		7.59	1.82	9.17
Lysine*	Lys (K)	146		9.74	2.18	8.95

จากโครงสร้างที่แสดงไว้ในตารางจะพบว่ากรดอะมิโนจำนวนถึง 19 ตัวใน 20 ตัว จะที่เป็น 1° amine (RNH_2) ส่วนกรดอะมิโนที่เหลืออีกหนึ่งตัว ซึ่งก็คือ proline จะเป็น 2° amine (RNH_2) โดยอะตอมไนโตรเจนและอะตอมคาร์บอนชนิด α จะเป็นส่วนหนึ่งของวงแหวน pyrrolidine

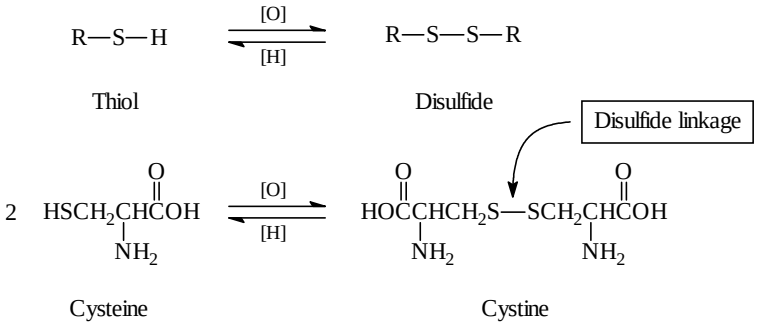
สำหรับกรดอะมิโนอีก 2 ตัวซึ่งร่างกายไม่ได้ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่

- Hydroxyproline (มีมากใน collagen) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จาก proline



Proline Hydroxyproline

- Cystine (พบในโปรตีนทั่วๆ ไป) ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จาก crysteine ซึ่งหมู่ thiol (-SH) ของ crysteine สามารถเปลี่ยนให้เป็น disulfides ได้โดยใช้ oxidizing agent อย่างอ่อน การเปลี่ยนแปลงนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้โดยใช้ reducing agents อย่างอ่อนเช่นเดียวกัน



ในหัวข้อถัดไปเราจะได้เห็นว่าการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ disulfide ระหว่างหน่วยของ cysteine ในสายโซ่โปรตีน จะมีบทบาทต่อโครงสร้างและรูปร่างของโปรตีนโดยรวมอย่างไร

จากตารางที่ 1 ถ้าเราพิจารณาถึงความแตกต่างของโซ่กิ่ง (side chain) เราสามารถแบ่งกรดอะมิโนออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

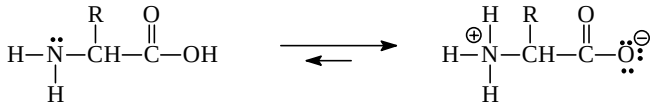
- กรดอะมิโนที่เป็นกลาง (neutral amino acids) ได้แก่ กรดอะมิโนที่มีโซ่กิ่งเป็นไฮโดรคาร์บอน (aliphatic หรือ aromatic)
- กรดอะมิโนที่เป็นกรด (acidic amino acids) ได้แก่ กรดอะมิโนที่มีโซ่กิ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก (carboxylic group; -COOH)
- กรดอะมิโนที่เป็นเบส (basic amino acids) ได้แก่ กรดอะมิโนที่มีโซ่กิ่งเป็นหมู่อะมิโน (amino group; -NHR)

กรดอะมิโนที่จำเป็น (Essential amino acids)

โดยทั่วไปแล้วกรดอะมิโนสามารถสังเคราะห์ได้โดยสิ่งที่ชีวิต ไม่ว่าพืชหรือสัตว์ อย่างไรก็ตามในสัตว์ชั้นสูงบางประเภทขาดความสามารถในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางตัวที่ร่างกายจำเป็นต้องนำไปใช้ในการสร้างโปรตีน ดังนั้นสัตว์ชั้นสูงเหล่านั้นจึงต้องได้รับกรดอะมิโนเหล่านั้นทางสารอาหาร สำหรับมนุษย์ในวัยผู้ใหญ่มีความต้องการกรดอะมิโนที่จำเป็นดังกล่าว 8 ตัว ดังรายชื่อที่มี * ในตารางที่ 1

กรดอะมิโนเป็นเสมือนไอออนคู่ขั้ว (Amino acid as a dipolar ion)

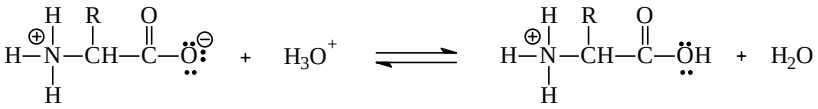
เนื่องจากกรดอะมิโนมีทั้งหมู่ที่มีคุณสมบัติที่เป็นกรดและเป็นเบสอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ดังนั้นจึงสามารถเกิดปฏิกิริยากรด-เบสภายในโมเลกุล (internal acid-base reaction) ขึ้นได้ โดยจะเกิดเป็น**ไอออนคู่ขั้ว** (dipolar ion) หรือ Zwittterion (ในภาษาเยอรมัน Zwitter = "*hybrid*")



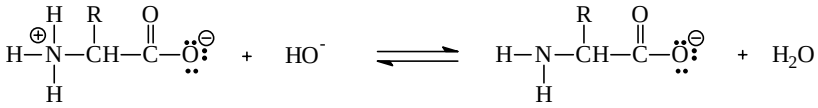
Zwitterion

กรดอะมิโนยังมีคุณสมบัติเป็น amphoteric กล่าวคือสาทารถทำปฏิกิริยาได้กับทั้งกรดและเบสดังสมการ

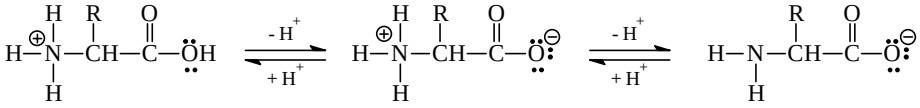
- ในสารละลายที่เป็นกรด



- ในสารละลายที่เป็นเบส



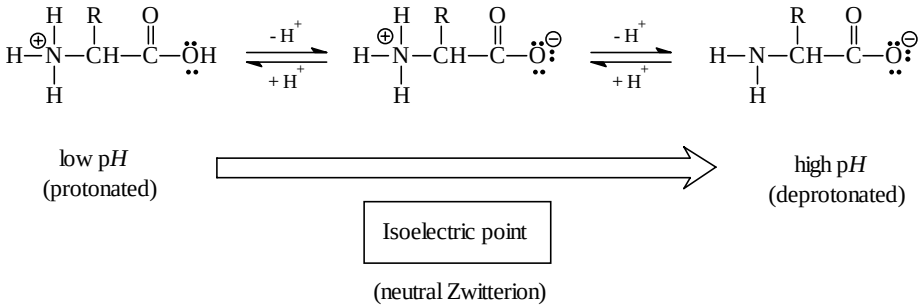
เมื่อกรดอะมิโนอยู่ในน้ำแล้วจะเกิดสมดุล (equilibrium) ขึ้นระหว่าง dipolar และรูปที่มีประจุลบกับรูปที่มีประจุบวก (anionic กับ cationic form)



Cationic form | Dipolar ion (Zwitterion) | Anionic form

<u>Isoelectric point</u>

Isoelectric point เป็น pH ของสารละลายที่ทำให้กรดอะมิโนปรากฏอยู่ในรูป neutral dipolar หรือ neutral Zwitterion form

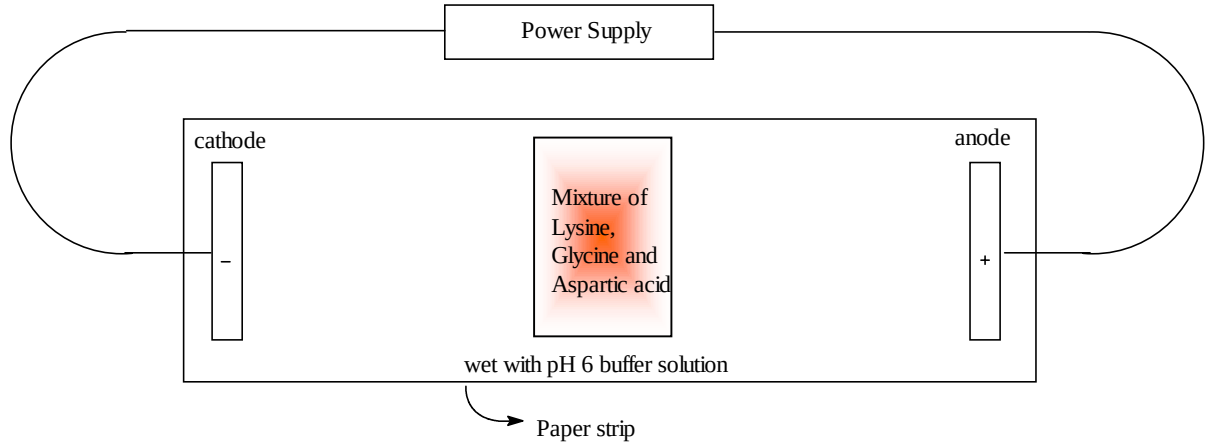


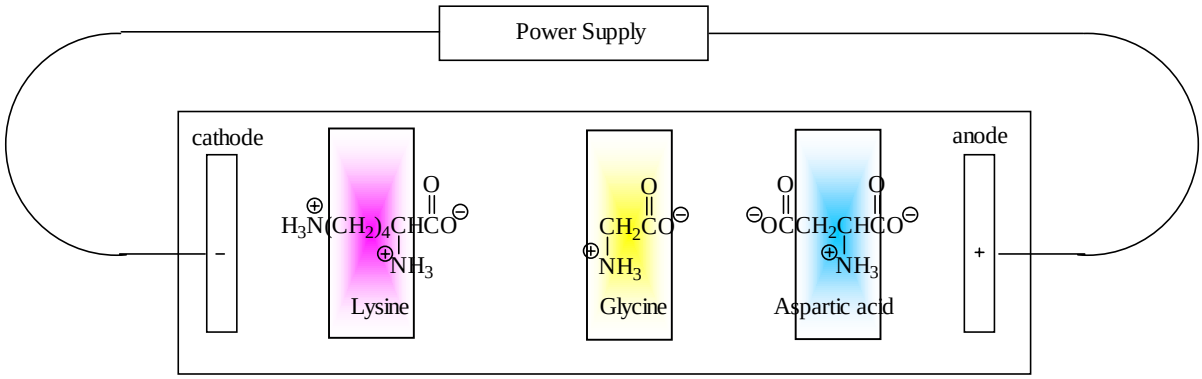
Isoelectric point ของกรดอะมิโนแต่ละตัวจะไม่เท่ากันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้าง ถ้า side chain ของกรดอะมิโนเป็นกลาง (สำหรับกรดอะมิโนที่เป็นกลางทั้ง 15 ตัว) จะทำให้ isoelectric point ของกรดอะมิโนนั้นมีค่าเกือบเป็นกลาง 5.0 – 6.5 (แต่ไม่ใช่ค่าที่ใกล้เคียงกับ 7 เพราะในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายความเป็นกรดของ carboxylic group จะมีมากกว่าความเป็นเบสของ amino group)

สำหรับกรดอะมิโนที่เป็นกรด (acidic amino acids) ทั้ง 2 ตัว (ดูตารางที่ 1) จะมีค่า isoelectric point ที่ p*H* ต่ำๆ ซึ่งจะทำให้หมู่ –COOH ในโซ่กิ่งไม่แตกตัว ส่วนกรดอะมิโนที่เป็นเบส (basic amino acids) ทั้ง 3 ตัวจะมีค่า isoelectric point ที่ p*H* สูงๆ ซึ่งจะทำให้ไม่เกิดการ protonation หมู่ $–NH_2$ ในโซ่กิ่งเช่นกัน

เราสามารถอาศัยข้อได้เปรียบของความแตกต่างระหว่างค่า isoelectric point ของกรดอะมิโนแต่ละตัวมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาใช้ในการแยกกรดอะมิโน ซึ่งเทคนิคนี้เรารู้จักกันดีในนามของ Electrophoresis สำหรับวิธีการแยก

สามารถทำได้โดยใส่ของผสมของกรดอะมิโนลงไปบนกระดาษหรือ gel strip หลังจากนั้นจึงใส่กระแสไฟฟ้าที่ปลาย electrodes ที่ต่ออยู่ที่ปลายทั้งสองข้าง

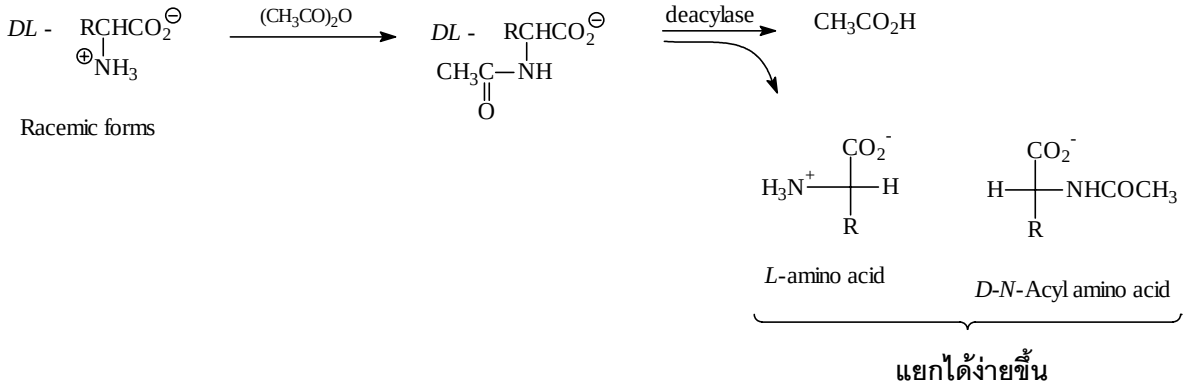




<u>การแยกอิแนนทิโอเมอร์ D และ L ของกรดอะมิโน (Resolution of DL-amino acids)</u>

สำหรับกรดอะมิโนเกือบทุกตัว (ยกเว้น glycine) ที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่ง α จะเป็น stereocenter ดังนั้นโดยปกติแล้วถ้าเราทำการสังเคราะห์กรดอะมิโนเหล่านี้เราจะได้ racemic mixture ถ้าเราต้องการ enantiomer ที่บริสุทธิ์แล้วเราจำเป็นต้องแยก enantiomers ทั้งสอง (resolution)

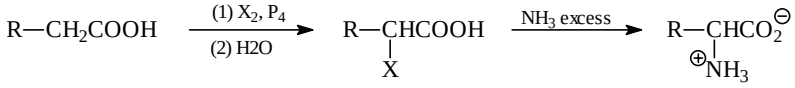
วิธีที่น่าสนใจและเป็นวิธีที่พิเศษสำหรับการแยกกรดอะมิโนคือการใช้เอนไซม์ (enzyme) ที่เรียกว่า deacylase เอนไซม์ดังกล่าวจะไปเร่งปฏิกิริยา (catalyse) การ hydrolysis ของ *N*-acylamino acid ในเซลล์สิ่งมีชีวิต เนื่องจาก active site ของเอนไซม์นี้เป็น chiral จึง hydrolyze ได้เฉพาะ *N*-acylamino acid ที่เป็น L-configuration เท่านั้น ดังนั้นเมื่อนำเอาเอนไซม์ดังกล่าว *N*-acylamino acid ที่ถูกเปลี่ยนแปลงทางด้าน racemic แล้ว จะทำให้อนุพันธ์ที่เป็น L-amino acid เท่านั้นที่ถูก hydrolyzed เป็นของผสมที่แยกได้ง่ายยิ่งขึ้น



Racemic forms

<u>การสังเคราะห์กรดอะมิโน</u> <u>(Synthesis of amino acids)</u>

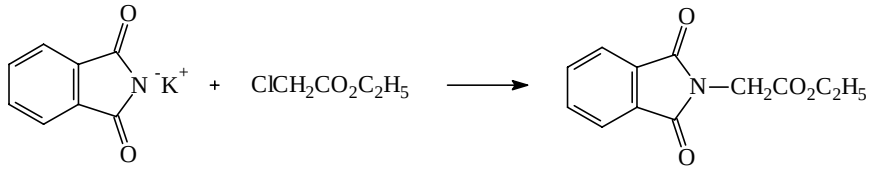
① <u>การทำปฏิกิริยา ammonolysis ของ α-halo acid โดยตรง (Direct ammonolysis of an α-halo acid)</u>



วิธีการนี้จะใช้น้อย เนื่องจากได้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ต่ำ

② <u>การทำปฏิกิริยา Modified Gabriel synthesis ของ amine (Modified Gabriel synthesis of amine)</u>

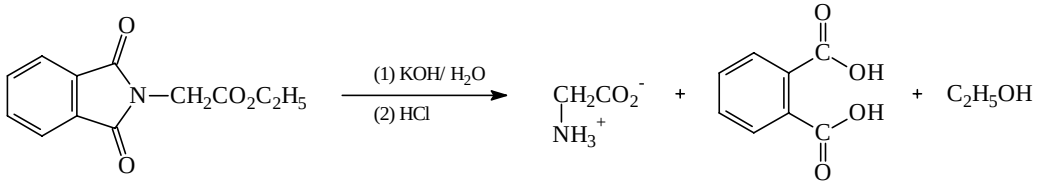
วิธีนี้เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Gabriel synthesis เป็นวิธีที่ใช้กันมากเนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์สูงและสามารถแยกผลิตภัณฑ์ได้ง่าย



Potassium phthalamide

Ethyl chloroacetate

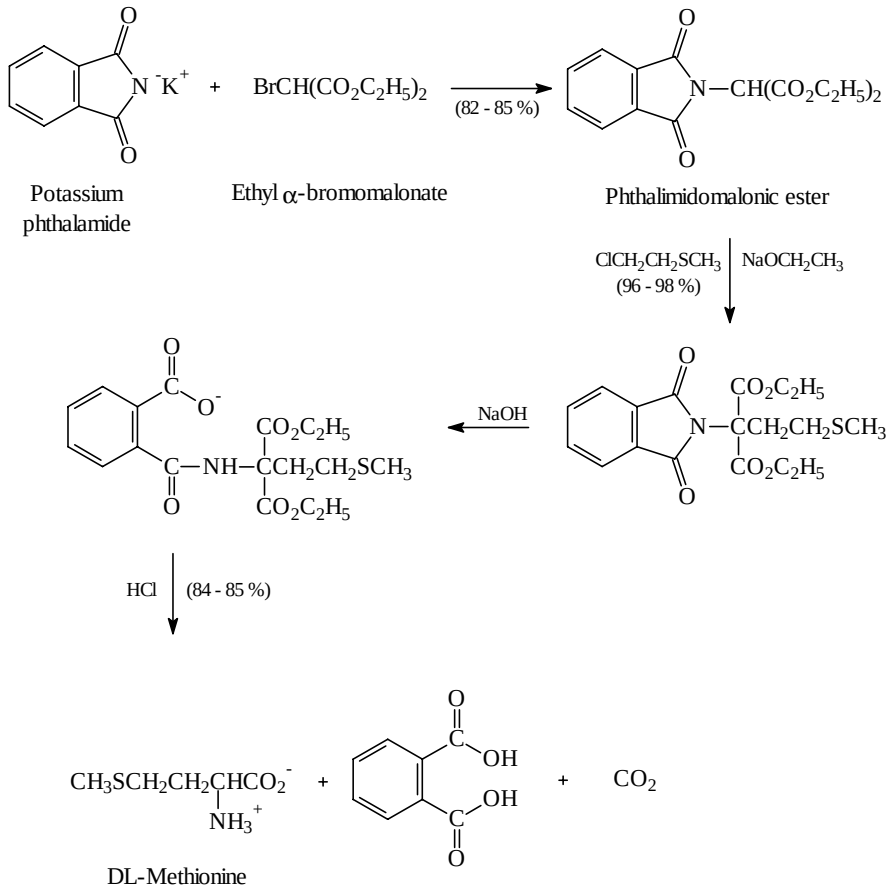
(97 %)



Glycine (85 %)

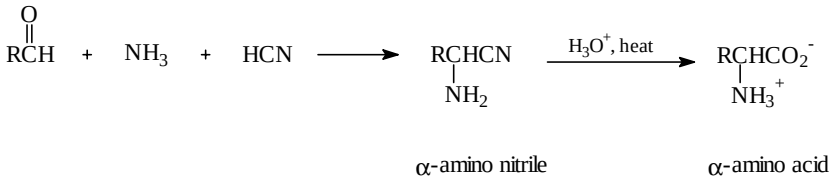
Phthalic acid

เราสามรถดัดแปลงวิธีการสังเคราะห์นี้โดยใช้ potassium phthalamide และ diethyl α-bromomalonate ในการเตรียม imido malonic ester ซึ่งวิธีการนี้ใช้ในการสังเคราะห์ methionine



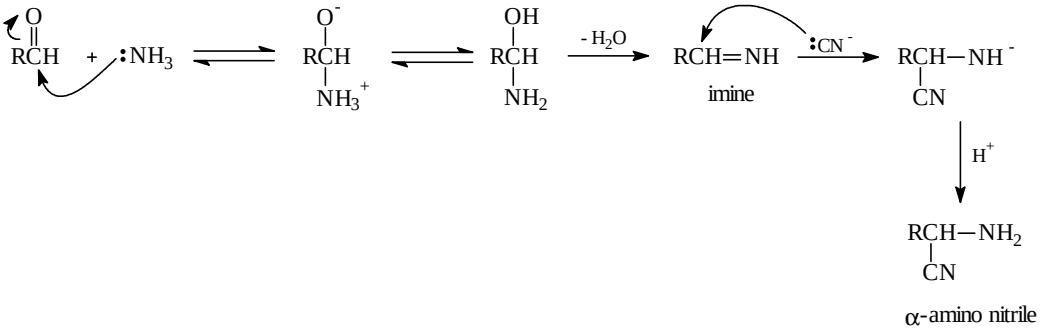
③ <u>การสังเคราะห์ของ Stracker (Stracker Synthesis)</u>

เมื่อนำเอา aldehyde มาทำปฏิกิริยากับ ammonia และ HCN จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็น α-amino nitrile และเมื่อทำปฏิกิริยา hydrolysis หมู่ nitrile จะทำให้ α-amino nitrile เปลี่ยนไปเป็น α-amino acid ดังสมการ



ในขั้นแรกของปฏิกิริยาอาจจะเกิดการสร้างสารประกอบ imine จาก aldehyde c]t ammonia แล้วตามด้วยปฏิกิริยา addition ของ HCN

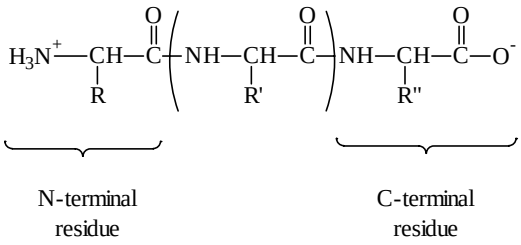
กลไกของปฏิกิริยา



ลำดับของกรดอะมิโนใน polypeptides และโปรตีน (Amino acid Sequence of Polypeptides and Proteins)

โพลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 2, 3, (4 – 10) หรือมากกว่า 10 หน่วยขึ้นไปเราจะเรียกว่า dipeptide, tripeptide, oligomer หรือ polypeptide ดังที่กล่าวไปแล้ว ส่วนโปรตีนจะประกอบไปด้วย polypeptide 1 โมเลกุลหรือมากกว่านั้น

polypeptide เป็นโพลิเมอร์เส้นตรง (linear polymer) โดยที่ปลายด้านหนึ่งของ polypeptide เหล่านี้จะเป็น amino acid residue ที่มีหมู่ – NH_3^+ เหลืออยู่ ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งจะมี amino acid residue ที่มีหมู่ – CO_2^- เหลืออยู่ ทั้งสองหมู่นี้เราจะเรียกว่า N-terminal และ C-terminal ตามลำดับ



เพื่อความสะดวก โดยทั่วไปเราจะเขียนโครงสร้างของ polypeptide และโปรตีนโดยให้ส่วน N-terminal amino acid อยู่ทางซ้ายมือ ส่วน C-terminal amino acid อยู่ทางขวามือ

ในการหากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ polypeptide หรือโปรตีน เราจะต้องหาน้ำหนักโมเลกุลด้วย ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี อาจจะเป็นวิธีทางเคมี, ultracentifugation, การกระเจิงแสง (light scattering), osmotic pressure, X-ray diffraction เมื่อเราทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว เราต้องสามารถหาสูตรโมเลกุลอย่างง่าย (molecular formular) ของ polypeptide หรือโปรตีนดังกล่าวได้ นั่นคือเราต้องทราบชนิดของกรดอะมิโนที่มีอยู่ใน polypeptide หรือโปรตีนนั้นๆ ขั้นต่อไปจะเป็นการหาลำดับ (sequence) ของกรดอะมิโนที่ต่อกัน ซึ่งเราจะต้องตรวจสอบโครงสร้างโคแวเลนซ์ (covalent structure หรือ primary structure ซึ่งก็คือพันธะ amide นั่นเอง) ของ polypeptide หรือโปรตีนดังกล่าว

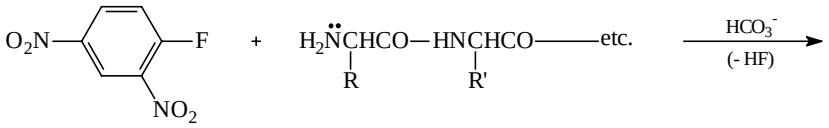
ถ้าเป็น tripeptide ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างกัน 3 ชนิด จะมีลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) ที่เป็นไปได้ 6 แบบ แต่ถ้าเป็น tetrapeptide จะมีถึง 24 แบบและถ้าเป็นโปรตีน ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างกัน 20 ชนิด และมีจำนวน 100 หน่วยจะมีการจัดลำดับที่เป็นไปได้ถึง $20^{100} = 1.27 \times 10^{130}$ แบบ

การหาลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence)ที่กล่าวถึงประกอบด้วย 2 วิธี คือ

1. การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ปลายทั้งสองข้าง (terminal residue analysis)
2. การไฮโดรไลซ์บางส่วน (partial hydrolysis)

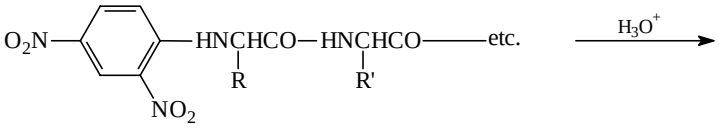
1. <u>การวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ปลายทั้งสองข้าง (terminal residue analysis)</u>

วิธีที่มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์ปลายที่เป็น N-terminal residue ของ polypeptide หรือโปรตีน เรียกว่า "**วิธีของ Sanger (Sanger Method)**" วิธีนี้เป็นวิธีที่มีพื้นฐานมาจากการใช้ 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) เมื่อนำเอา polypeptide มาทำปฏิกิริยากับ DNFB ในสารละลายที่เป็นเบสจะเกิดปฏิกิริยา nuclephilic aromatic substitution เกิดขึ้นกับส่วนปลายของ polypeptide ในด้านที่เป็น N-terminal residue โดยหมู่ 2,4-dinitrophenyl จะไปเกาะอยู่ที่อะตอมไนโตรเจน หลังจากที่ทำการแยกกรดอะมิโนเราจะสามารถตรวจสอบได้ว่าปลายที่เป็น N-terminal residue เป็นกรดอะมิโนประเภทไหน

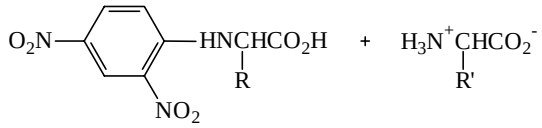


2,4-Dinitrofluorbenzene (DNFB)

Polypeptide



labeled polypeptide



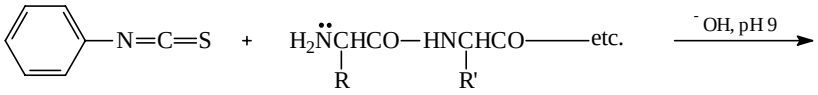
labeled N-terminal amino acid

Mixture of amino acids

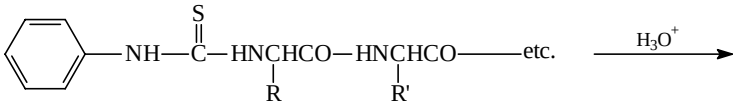
แยกแล้วทำการพิสูจน์ทราบ

ถึงแม้ว่า DNFB จะทำปฏิกิริยากับหมู่ $-NH_3^+$ ทุกๆ หมู่รวมถึงหมู่ amino ของ Lysine แต่จะมี N-terminal amino acid residue เพียงตัวเดียวที่จะถูก labeled ที่ตำแหน่ง α-amino group

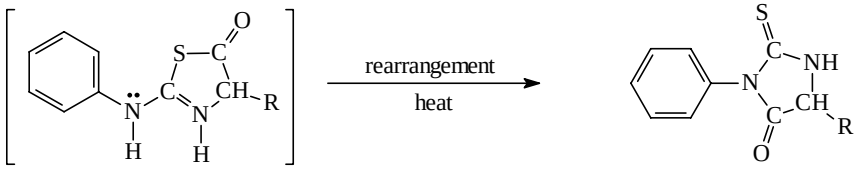
วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปลายที่เป็น N-terminal residue ของ polypeptide หรือโปรตีน เรียกว่า "**วิธีการสลายตัวของ Edmann (Edmann degradation)**" วิธีการนี้มีข้อดีกว่าวิธีของ Sanger ตรงที่ว่าวิธีนี้จะเอาเฉพาะ N-terminal residue ออกเท่านั้นและทิ้งส่วนที่เหลือให้เชื่อมติดกันอยู่เช่นเดิม วิธี Edmann จะเป็นการ label หมู่อะมิโนของ N-terminal residue ด้วย phenyl isothiocyanate ($C_6H_5N=C=S$)



Phenyl isothiocyanate Polypeptide

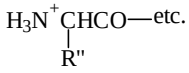


labeled polypeptide



Unstable intermediate

+



Polypeptide with one less amino residue

Phenylthiohydantoin

เมื่อนำเอา labeled polypeptide มาเติมกรดจะทำให้ N-terminal amino acid หลุดออกแล้วเกิดเป็น intermediate ที่ไม่เสถียร ซึ่งจะเกิดการจัดตัวใหม่ (rearrangement) ได้สารประกอบ phenylthiohydantoin เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งพิสูจน์ทราบได้โดยเปรียบเทียบกับ phenylthiohydantoin ที่เตรียมได้จากกรดอะมิโนต่างๆ

Polypeptide ที่เหลือจากการทำ Edmann degradation ในครั้งแรก จะนำไปทำการย่อยสลายตัวครั้งต่อๆ ไปได้อีก และสามารถทำได้อย่างอัตโนมัติโดยใช้เครื่องที่เรียกว่า Sequenator วิธีนี้กรดอะมิโนจะถูกพิสูจน์ทราบเป็นลำดับตามที่ถูกเอาออกมาจาก polypeptide ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้ได้กับ polypeptide ที่ประกอยด้วยกรดอะมิโนมากถึง 60 หน่วย

สำหรับ C-terminal residue สามารถพิสูจน์ทราบได้โดยเอนไซม์ย่อยที่มีชื่อว่า Carboxypeptidase เอนไซม์ดังกล่าวจะทำการย่อยเฉพาะพันธะเอมีดของ amino acid residue ที่มีหมู่ - COOH อิสระอยู่เท่านั้น และเกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระ แต่เอนไซม์นี้จะทำการ hydrlyze ไปอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงต้องทำการติดตามกรดอะมิโนที่หลุดออกมาเป็นฟังก์ชันของเวลา วิธีการนี้จะใช้ในการหาลำดับของกรดอะมิโนที่จำกัด (limited amino acid sequence) เท่านั้น เพราะเมื่อหาไปช่วงหนึ่งจะเกิดการสับสน

2. การไฮโดรไลซ์บางส่วน (partial hydrolysis)

จะเห็นได้ว่า polypeptide หรือโปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะใช้วิธี Edmann degradation หรือใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ Carboxypeptidase ไม่ได้ โชคดีที่เรามีเทคนิคอื่นที่เรียกว่า "**การไฮโดรไลซ์บางส่วน (partial hydrolysis)**" การใช้กรดหรือเอนไซม์จะทำให้เราสามารถ polypeptide เป็นส่วนย่อยๆ (fragment) ได้ หลังจากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Sanger หรือ Edmann degradation และใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ Carboxypeptidase ต่อไปได้ หลังจากที่เราได้ข้อมูลของส่วนย่อยๆ จึงนำมาต่อเป็นโมเลกุลใหญ่ๆ เพื่อให้ได้โครงสร้างของ polypeptide หรือโปรตีนที่นำมาศึกษาได้

เช่นจากการศึกษา pentapeptide เราทราบว่ามี (Val) 2 หน่วย Leucine (Leu) 1 หน่วย Histidine (His) 1 หน่วย และ Phenylalanine (Phe) 1 หน่วย ทำให้เราเขียนสูตรโมเลกุลอย่างง่าย (molecular formula) ได้ดังนี้

Val_2, Leu, His, Phe

เมื่อเราใช้ DNFB และ Carboxypeptidase ทำให้เราทราบว่า N-terminal residue เป็น Valine และ C-terminal residue เป็น Leucine ทำให้เราทราบลำดับคร่าวๆ ดังนี้

Val (Val, His, Phe) Leu

แต่เรายังไม่ทราบลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ตรงกลาง ถ้าเราใช้การไฮโดรไลซ์บางส่วนด้วยกรด (partial acid hydrolysis) เราจะได้ dipeptide ดังนี้

Val.His + His.Val + Val.Phe + Phe.Leu

จากจุดที่ซ้อนทับ (overlab) ของ dipeptide ทำให้เราทราบว่า pentapeptide ที่เรานำมาศึกษามีลำดับของกรดอะมิโนเป็นดังนี้

Val.His.Val.Phe.Leu

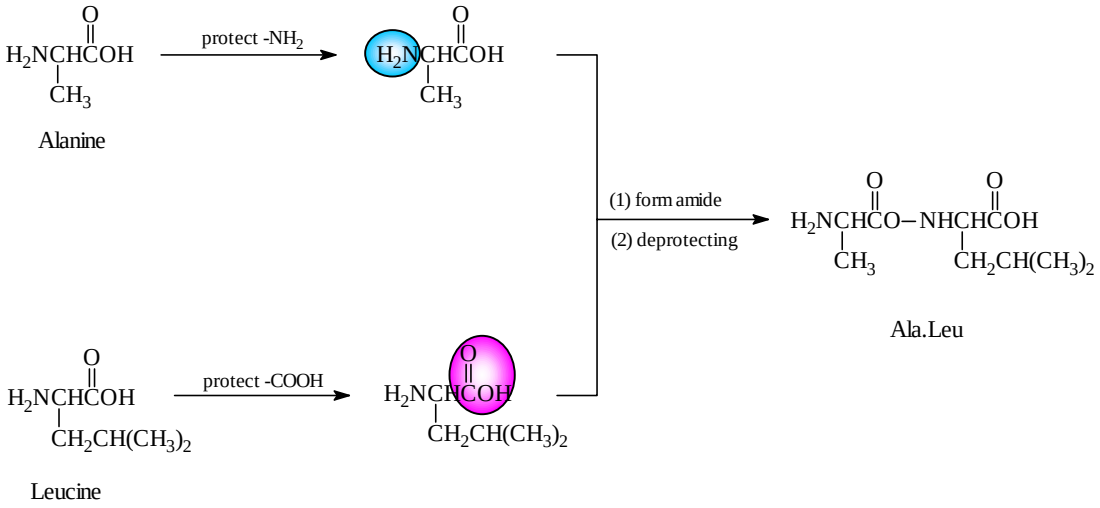
นอกจากนี้การทำไฮโดรไลซ์บางส่วนจะมีเอนไซม์จำเพาะบางชนิดที่ใช้ตัดพันธะ peptide หนึ่งๆ ในโปรตีนได้ เช่น

- **Trypsin** จะตัดเฉพาะพันธะ peptide ของหมู่ carbonyl ที่เป็นของ Lysine หรือ Arginine residue
- **Chrymotypsin** จะตัดเฉพาะพันธะ peptide ของหมู่ carbonyl ที่เป็นของ Alanine, Tyrosine และ Tryptophan นอกจากนี้ยังตัดของ Leucine, Methionine, Aspargine และ Glutamine residues ได้อีกด้วย

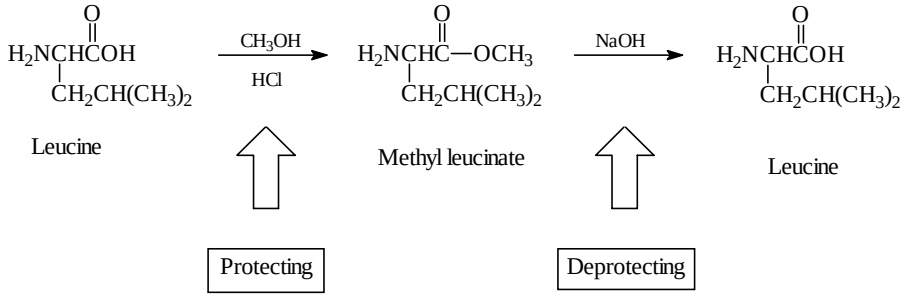
การสังเคราะห์ Peptides (Peptide Synthesis)

จากการที่เราศึกษาหาลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีน หรือ polypeptide แล้ว เราอาจต้องการโปรตีน หรือ polypeptide ในปริมาณที่มากพอ เพื่อที่จะนำมาศึกษาทางด้าน biological valuation ของโปรตีน หรือ polypeptide ดังกล่าว การสังเคราะห์ peptide ถึงแม้จะเป็นเพียงแค่การสร้างพันธะเอมีดง่ายๆ ซึ่งเตรียมได้จากปฏิกิริยาระหว่าง amine กับ acid chloride แต่การสังเคราะห์ peptide ก็เป็นเรื่องที่ค่อนข้างซับซ้อนเนื่องจากเราต้องการโปรตีน หรือ polypeptide ที่มีลำดับของกรดอะมิโนที่แน่นอนและจำเพาะเจาะจงไม่ใช่แบบ random

วิธีแก้ปัญหาดังกล่าวอาจทำได้โดยวิธี protection ซึ่งเราสามารถบังคับให้เกิดปฏิกิริยาตามที่เราต้องการ โดยการ protect หมู่ amine และ หมู่ carboxylic ยกเว้นหมู่ที่เราต้องการให้เกิดปฏิกิริยา เช่น ถ้าเราต้องการให้ couple กันระหว่าง Alanine กับ Leucine เราสามารถ protect หมู่ amino ของ Alanine ได้และหมู่ carboxylic ของ Leucine ได้ดังสมการ



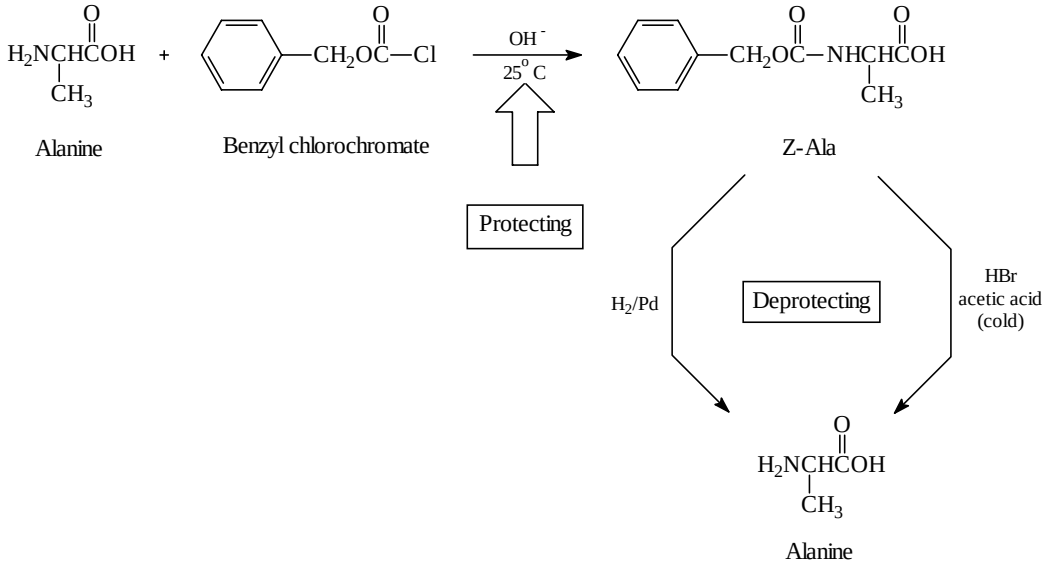
หมู่ carboxylic สามารถ protect ได้ง่ายๆ โดยเปลี่ยนให้เป็น methyl ester ซึ่งหมู่ ester ดังกล่าวสามารถกำจัด (remove) ออกได้โดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย NaOH



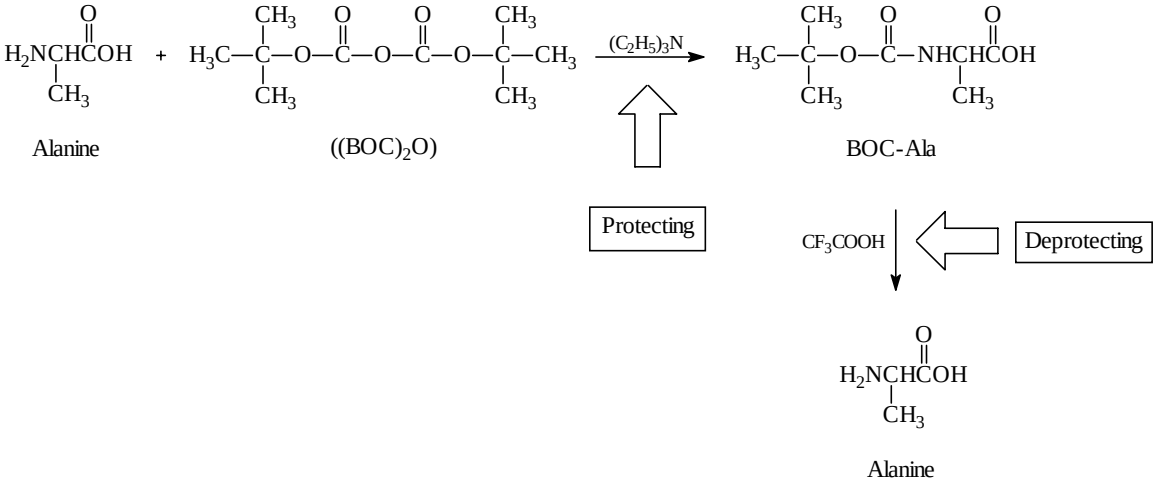
สำหรับหมู่ amino สามารถ protect ได้โดยใช้ benzyl chlorochromate หรือ di-*tert*-butyl carbonate ($(BOC)_2O$) ซึ่ง benzyl chlorochromate จะเปลี่ยนหมู่ amino ให้เป็นอนุพันธ์ benzyloxycarbonyl (ย่อเป็น Z-) amide และ di-*tert*-butyl carbonate จะเปลี่ยนหมู่ amino ให้เป็นอนุพันธ์ *tert*-butyloxycarbonyl (ย่อเป็น BOC-) amide การ

กำจัดเอาหมู่ Z ออกสามารถทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา catalytic hydrogenation ส่วนหมู่ BOC ออกก็สามารถทำได้ง่าย โดยทำปฏิกิริยากับกรดแก่ เช่น trifluoric acid (CF_3COOH)

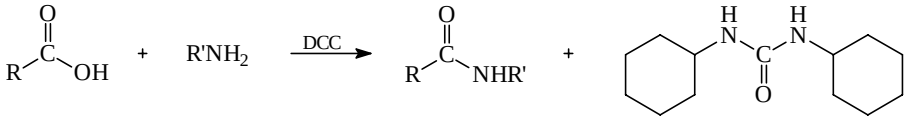
- เมื่อใช้ benzyl chlorochromate เป็น reagent



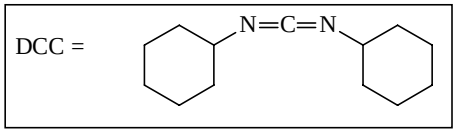
- เมื่อใช้ di-*tert*-butyl carbonate ($(BOC)_2O$) เป็น reagent



สำหรับการสร้างพันธะ peptide นั้นสามารถทำได้โดยนำเอากรดอะมิโนที่ protect แล้วมาทำปฏิกิริยากันโดยมี dicyclohexylcarbodiimide (DCC) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



Acid Amine Dicyclohexylurea

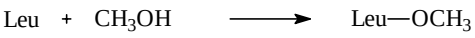


สำหรับกลไกในการเกิดปฏิกิริยานั้นค่อนข้างซับซ้อนจึงไม่ขอกล่าวในที่นี้

<u>สรุปขั้นตอนในการสังเคราะห์ polypeptide และโปรตีน</u>

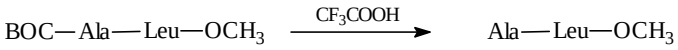
<u>ขั้นตอนที่ 1</u> เป็นการ protect หมู่ amino โดยเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ของ BOC-

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> เป็นการ protect หมู่ carboxylic โดยเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ของ methyl ester

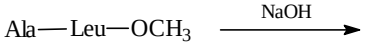


<u>ขั้นตอนที่ 3</u> นำเอากรดอะมิโนที่ได้รับการ protect แล้วทั้ง 2 ตัวมาต่อกัน (couple) โดยใช้ DCC

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> ทำการ remove หมู่ BOC- โดยทำปฏิกิริยากับกรดแก่

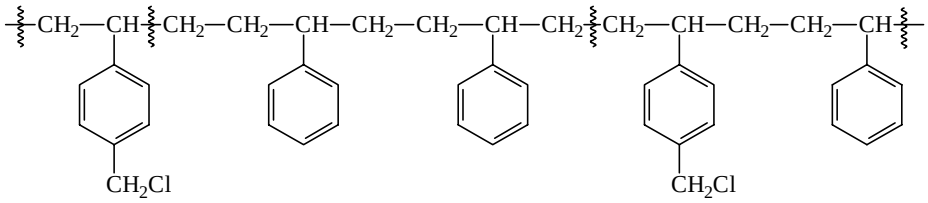


<u>ขั้นตอนที่ 5</u> ทำการ remove หมู่ methyl ester โดยทำปฏิกิริยากับบส



<u>การสังเคราะห์ Peptide แบบอัตโนมัติโดยใช้เทคนิค Merrifield Solid-Phase (Automated Peptide Synhtesis : Merrifield Solid-Phase Technique)</u>

การสังเคราะห์ peptide ที่เป็นโซ่ขนาดยาวโดยการใส่กรดอะมิโนทีละตัวเป็นงานที่ต้องใช้เวลาและความอดทน ในปัจจุบันนี้มีวิธีการที่ง่ายกว่ามาก โดยการใช้เทคนิคที่เรียกว่า solid-phase method ซึ่งค้นพบโดย R. Bruce Merrifield แห่งมหาวิทยาลัย Rockefeller University วิธีนี้จะทำการสังเคราะห์ peptide บนเม็ดโพลิสไตรีน (polymer bead of polystyrene) ซึ่งเม็ดโพลิสไตรีนดังกล่าวจะถูกเตรียมโดยให้มีหมู่ chloromethyl (-CH_2Cl) 1 หมู่บนทุกๆ วงแหวนเบนซีน ตั้งแต่100 วงขึ้นไป



Chloromethylated polystyrene

จากวิธีการสังเคราะห์ที่ทำในสารละลายที่กล่าวไว้ในหัวข้อที่แล้วจะเห็นว่าหมู่ carboxyl จะถูก protect โดยเปลี่ยนให้เป็นหมู่ methyl ester แต่สำหรับวิธี solid-phase จะใช้อนุภาคโพลิเมอร์ที่เป็นของแข็ง (solid polymer particle) เป็นตัว protect โดยจะเปลี่ยนหมู่ carboxyl ให้เป็น ester ในการสังเคราะห์ peptide ด้วยวิธี solid-phase มี 4 ขั้นตอน ดังนี้ คือ

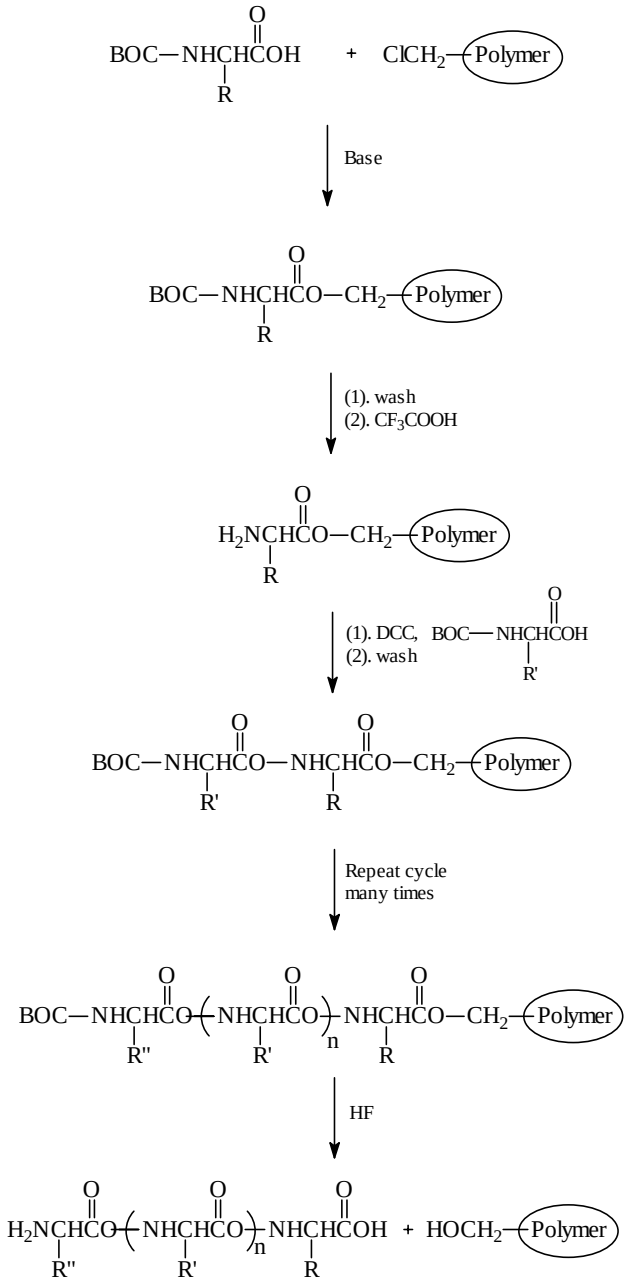
1. กรดอะมิโนที่ถูก protect ด้วย BOC จะถูกเชื่อมเข้ากับโพลิสไตรีนด้วยพันธะโคแวเลนซ์เกิดเป็นพันธะ ester (ปฏิกิริยา S_N2)

2. กรดอะมิโนที่ต่ออยู่กับโพลิสไตรีนจะถูกล้างเพื่อกำจัดรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออก แล้วนำมาทำปฏิกิริยาด้วย CF_3COOH เพื่อกำจัดหมู่ BOC- ออก

3. กรดอะมิโนตัวที่สองที่ถูก protect ด้วย BOC จะนำไป couple กับกรดอะมิโนตัวแรก โดยทำปฏิกิริยาโดยมี DCC อยู่ด้วย ซึ่งรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออกจะถูกล้างออกจากโพลิเมอร์ที่เป็นของแข็ง

เราจะทำการ deprotection, coupling และการล้างรีเอเจนต์ที่มากเกินพอออกเป็นวัฏจักรหลายๆ รอบ เพื่อเป็นการเติมกรด-อะมิโนทำให้ได้สาย peptide ที่ยาวขึ้น

4. หลังจากที่ได้ peptide ตามที่ต้องการแล้ว จะนำมาทำปฏิกิกริยากับ anhydrous HF เพื่อกำจัดหมู่ BOC ออกและเป็นการตัดพันธะ ester ออกจากโพลิเมอร์ ทำให้ได้ peptide อิสระ



<u>การจำแนกประเภทของโปรตีน</u> <u>(Classification of Protein)</u>

โปรตีนอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ตามองค์ประกอบ คือ

1. **โปรตีนอย่างง่าย** (simple proteins) โปรตีนชนิดนี้จะมีเฉพาะกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบเท่านั้น เช่น blood serum albumin
2. **โปรตีนเชิงซ้อน** (conjugated proteins) โปรตีนชนิดนี้จะเป็นโปรตีนที่มีทั้งส่วนที่เป็นกรดอะมิโนและส่วนที่ไม่ใช่กรด-อะมิโน เช่น คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates), ไขมัน (fats) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะพบอยู่ทั่วๆ ไปและพบมากกว่าโปรตีนอย่างง่าย (ดูตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 โปรตีนเชิงซ้อน (conjugated proteins) บางชนิด

ชื่อ	องค์ประกอบ
Glycoproteins	เป็นโปรตีนที่ต่ออยู่กับคาร์โบไฮเดรต ; เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ก็มี glycoproteins เคลือบอยู่
Lipoproteins	เป็นโปรตีนที่ต่ออยู่กับไขมัน (fats) และน้ำมัน (oils) ; โปรตีนเหล่านี้จะทำหน้าที่ลำเลียง chloresterol และไขมันต่างๆเข้าไปในร่างกาย
Metalloproteins	เป็นโปรตีนที่ต่ออยู่กับไอออนโลหะ (metal ions) ; ตัวอย่าง เช่น เอนไซม์ cytochrome oxidase ซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างพลังงานทางชีวภาพ (biological energy production)
Nucleoproteins	เป็นโปรตีนที่ต่ออยู่กับ RNA (ribonucleic acid) ; โปรตีนเหล่านี้จะพบใน ribosome ที่อยู่ในเซลล์
Phosphoproteins	เป็นโปรตีนที่ต่ออยู่กับหมู่ phosphate ตัวอย่าง เช่น casein ในนม ซึ่งมีหน้าที่เก็บสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

ถ้าจะแบ่งโดยอาศัยรูปร่างใน 3 มิติ เราสามารถแบ่งโปรตีนออกเป็น 2 ประเภท เช่นกัน

1. **โปรตีนเส้นใย (fibrous proteins)** โปรตีนเหล่านี้จะประกอบด้วยโซ่ polypeptide ที่จับตัวกันทางด้านข้าง โดยโปรตีนเหล่านี้จะมีคุณสมบัติที่แข็งและไม่ละลายน้ำ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางธรรมชาติโดยเป็นองค์ประกอบของโครงสร้าง เช่น collagen และ keratin (ดูตารางที 3)
2. **โปรตีนรูปทรงกลม (globular proteins)** โปรตีนเหล่านี้เกิดจากการขดตัว (coil) เพื่อที่จะอัดแน่นกันเกือบจะเป็นทรงกลม โปรตีนชนิดนี้จะละลายน้ำได้และเคลื่อนที่ไปกับเซลล์ เช่น เอนไซม์, ฮอร์โมน เป็นต้น (ดูตารางที 4)

ตารางที่ 3 โปรตีนเส้นใย (fibrous proteins) บางชนิด (ไม่ละลายน้ำ)

ชื่อ	องค์ประกอบ
Collagens	เป็นโปรตีนที่พบในหนังสัตว์, เส้นเอ็น (tendons) และเนื้อเยื่อที่ใช้เชื่อมต่อ (connective tissues)
Elastins	เป็นโปรตีนที่พบในหลอดเลือด, เอ็น (ligaments) และเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่จะต้องขยายตัวได้
Fibrinogens	เป็นโปรตีนที่พบในเลือด ; จำเป็นสำหรับการแข็งตัวของเลือด (blood clotting)
Keratins	เป็นโปรตีนที่พบที่ผิวหนัง, ขนสัตว์ (wool), ขนนก (feathers), เล็บเท้าสัตว์ (hooves), ไหม และเล็บ
Myosins	เป็นโปรตีนที่พบในกล้ามเนื้อ

ตารางที่ 4 โปรตีนรูปทรงกลม (globular proteins) บางชนิด (ละลายน้ำได้)

ชื่อ	องค์ประกอบ
Hemoglobin	เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งออกซิเจน
Immunoglobulins	เป็นโปรตีนที่ตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (immune response)
Insulin	เป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่ควบคุมการเผาผลาญกลูโคส
Ribonucleaus	เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์ RNA

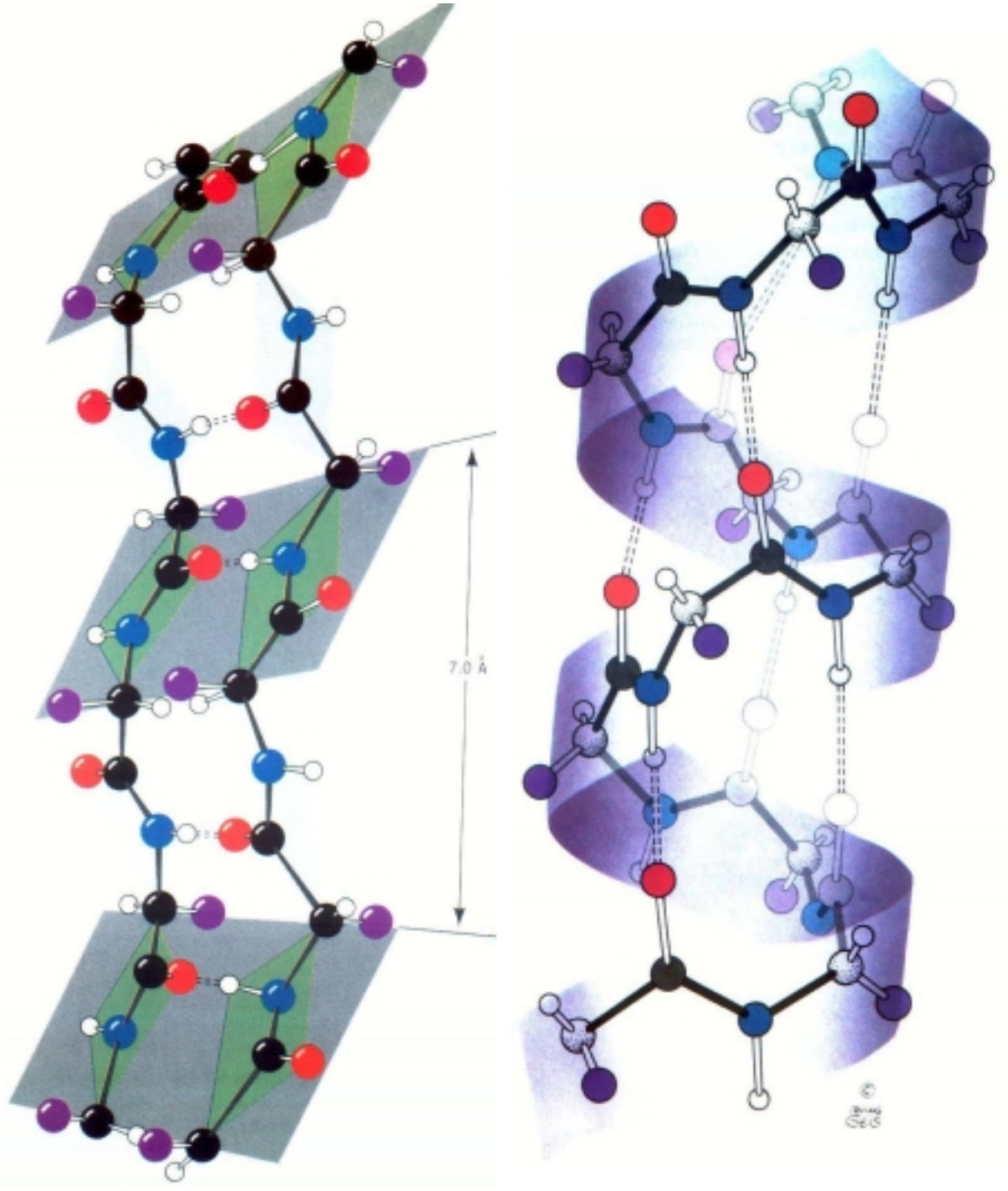
วิธีที่สามที่ใช้แบ่งประเภทของโปรตีนคือการแบ่งตามหน้าที่ จากตารางที่ 5 จะพบว่าโปรตีนมีบทบาทในเชิงชีวภาพอย่างหลายหลาก

ตารางที่ 5 หน้าที่ เชิงชีวภาพ (biological functions) บางชนิดของโปรตีน

ชนิด	หน้าที่และตัวอย่าง
เอนไซม์ (Enzyme)	โปรตีน เช่น chymotrypsin ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเชิงชีวภาพ (biological catalysts)
ฮอร์โมน (Hormones)	โปรตีน เช่น insulin ที่ควบคุมขบวนการในร่างกาย
โปรตีนปกป้อง (Protective proteins)	โปรตีน เช่น antibody ที่ต่อสู้กับการติดเชื้อ
โปรตีนสะสม (Storage proteins)	โปรตีน เช่น casein ทำหน้าที่เก็บสารอาหาร (nutrients)
โปรตีนโครงสร้าง (Structural proteins)	โปรตีน เช่น keratin, elastin และ collagen ที่สร้างโครงสร้างของสิ่งมีชีวิต
โปรตีนขนส่ง (transport proteins)	โปรตีน เช่น hemoglobin ทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนและสารอื่นๆ เข้าสู่ร่างกาย

โครงสร้างของโปรตีน (Protein Structure)

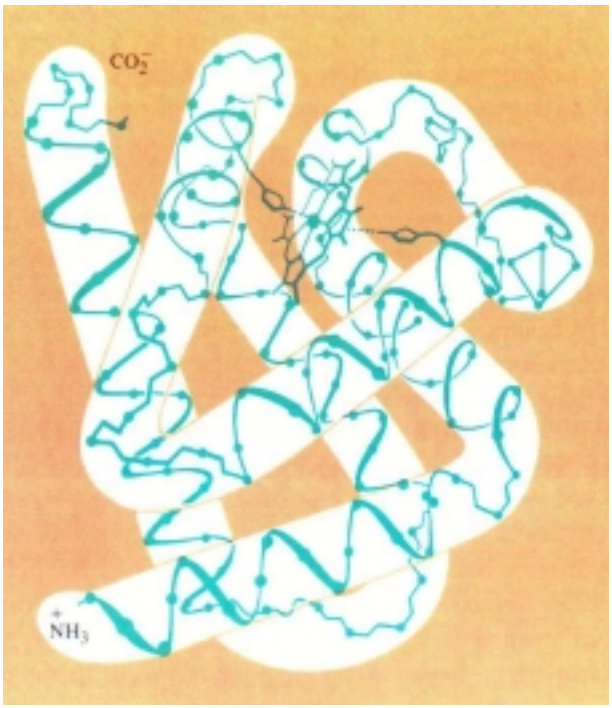
เนื่องจากโปรตีนเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุลอินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นถ้าจะพูดถึงคำว่า "*โครงสร้าง (Structure)*" จะกินความหมายกว้าง ความจริงแล้ว ในการอธิบายถึงโปรตีนนักเคมีจะกล่าวถึงโครงสร้างของโปรตีนใน 4 ระดับ โครงสร้างของโปรตีนที่ง่ายที่สุดคือ ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ต่ออยู่ด้วยกัน ซึ่งเราเรียกว่า **โครงสร้างปฐมภูมิ** (primary structure) ของโปรตีน โครงสร้างเป็นโครงสร้างที่เป็นระดับพื้นฐานที่สุดของโปรตีน แต่ยังมีสิ่งที่สำคัญต่อโครงสร้างของโปรตีนมากกว่าลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน คุณสมบัติทางเคมีของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับระดับโครงสร้างสูงขึ้นเช่นกัน วิธีที่โครงหลักของเป็ปไตด์ (peptide backbone) ม้วนโมเลกุลเพื่อให้เกิดโครงสร้างจำเพาะใน 3 มิติ ดังนั้น คำว่า **โครงสร้างทุติยภูมิ** (secondary structure) **จึงหมายถึงวิธีที่ส่วน** (segments) **ของ**โครงหลักของเป็ปไตด์ของสายโปรตีนถูกจัดตัวในรูปแบบปกติ (regular pattern) อันได้แก่ เฮลิก (halices), pleated sheets และ turns หรืออาจเรียกอีกอย่างว่า β-bend (ดูรูปที่ 1 (ก) และ (ข))



(ก) (ข)

<u>รูปที่ 1</u> (ก) b-pleated sheet หรือ b configuration ของโปรตีน (ข) a-halical structure ของ polypeptide

และ**โครงสร้างตติยภูมิ** (tertiary structure) **จึงหมายถึงวิธีการที่**โปรตีนทั้งโมเลกุลมาขดตัวในรูปร่างโดยรวมเป็น 3 มิติ การขดตัวนี้จะเกิดซ้อนทับ (superimposed) บนขดของ α-halixes (ดูรูปที่ 2)



รูปที่ 2 โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) : **3D-structure** ของ myoglobin

ส่วน**โครงสร้างตติยภูมิ** (Quaternary structure) **จะหมายถึงการที่โปรตีนหลายๆ โมเลกุลมาจับตัวเข้าด้วยกันเกิดเป็น** aggregate structure **ขนาดใหญ่**