

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การวิจัยเพื่อพัฒนาชุดปฏิบัติการวิชาชีวเคมี 2

THE RESEARCH FOR DEVELOPING THE LABORATORY
EXPERIMENT ON BIOCHEMISTRY II

รองศาสตราจารย์กุศลีวรรณ บุญยะรัตน์

พ.ศ. 2545

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันราชภัฏพิษณุสังคม

ประกาศคณูปการ

งานวิจัยเพื่อพัฒนาบทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2 ประสบความสำเร็จได้ด้วยดีตามวัตถุประสงค์ เพราะได้ความรุณจากคณะผู้สอนวิชาปฏิบัติการชีวเคมี 2 นักศึกษาที่มีส่วนร่วมกระบวนการวิจัย โปรแกรมวิชาเคมี และสำนักวิจัยและบริการวิชาการ สถาบันราชภัฏพิษลังกรณ์ ผู้ทำวิจัยต้องกราบขอบพระคุณทุกท่านที่ให้การสนับสนุนโดยตลอด

ฤทธิวรรณ บุญยะรัตน์

สารบัญ

หน้า

ประกาศคุณปการ

สารบัญ

สารบัญตาราง

บทกัดย่อ

Abstract

บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
1.6 แผนการดำเนินงาน	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 การสอนแบบปฏิบัติการ	4
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	7
3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	7
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	7
3.3 การสร้างเครื่องมือ	7
3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ	8
3.5 การรวบรวมข้อมูล	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	11
4.1 เจตคติของผู้เรียนต่อการใช้บทปฏิบัติการ	11
4.2 ผลการทดสอบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษา	26
4.3 ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ ๕ สรุปผลและข้อเสนอแนะ	28
5.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	28
5.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	28
5.3) สรุปผลการวิจัย	28
5.4 ข้อเสนอแนะ	29
บรรณานุกรม	30
ภาคผนวก	31
ภาคผนวก ก การหาประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ	32
ภาคผนวก ข เครื่องมือวิจัย	48
ภาคผนวก ค บทปฎิบัติการ	50

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1.1 รายละเอียดและระยะเวลาในการดำเนินงาน	3
ตาราง 3.1 ชื่อบทปฎิบัติการในรายวิชาปฎิบัติการชีวเคมี 2	8
ตาราง 4.1 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อวัตถุประสงค์ของบทปฎิบัติการ	11
ตาราง 4.2 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อความซัดเจนของข้อตอนในการใช้บทปฎิบัติการ	12
ตาราง 4.3 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อโอกาสการใช้เครื่องมือในการใช้บทปฎิบัติการ	13
ตาราง 4.4 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อความสนุกเพลิดเพลินของการทดลองในบทปฎิบัติการ	14
ตาราง 4.5 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อการเรียนรู้โดยใช้ความคิดและเหตุผลของบทปฎิบัติการ	15
ตาราง 4.6 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อวิธีการนำเสนอเนื้อหาของบทปฎิบัติการในด้านความง่าย กระชับ ^{และชัดเจน}	16
ตาราง 4.7 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อความเข้าใจในเนื้อหาของบทปฎิบัติการ	17
ตาราง 4.8 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อความยากของเนื้อหาของบทปฎิบัติการ	18
ตาราง 4.9 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อความยาวของเนื้อหาของบทปฎิบัติการ	19
ตาราง 4.10 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อความยากของศัพท์ที่ใช้ในบทปฎิบัติการ	20
ตาราง 4.11 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ตอรูปภาพประกอบในบทปฎิบัติการที่ทำให้เกิดความเข้าใจในบทปฎิบัติการ...	21

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตาราง 4.12 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อคำาณของบทปฎิบัติการและความสามารถตอบคำาณในบทปฎิบัติการ ...	22
ตาราง 4.13 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อความเข้าใจคำาสั่งหรือคำาชี้แจงในบทปฎิบัติการและความสามารถในการ ปฏิบัติตามคำาสั่งหรือคำาชี้แจง	23
ตาราง 4.14 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อเวลาที่กำหนดของบทปฎิบัติการ	24
ตาราง 4.15 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเขตติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่าง ต่อแบบประเมินตนเองของบทปฎิบัติการ	25
ตาราง 4.16 ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า t ของผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน ของนักศึกษาก่อนและหลังการใช้บทปฎิบัติการ	26
ตาราง 4.17 ประสิทธิภาพและความก้าวหน้าในการใช้บทปฎิบัติการ	27

ชื่อเรื่อง	การวิจัยเพื่อพัฒนาบทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2
ผู้วิจัย	รศ.ดร.คิริณ พุฒิยะรัตน์
สาขาวิชาที่ทำการวิจัย	เคมี
ทำการวิจัยเสร็จเรียบร้อย	2545

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาบทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2 ซึ่งเน้นทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ และเปิดโอกาสให้ใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์อย่างเต็มที่ โดยได้ทำการสร้างบทปฎิบัติการขึ้น 5 ชุด เนื้อหาของบทปฎิบัติการสอดคล้องกับหลักสูตรสถาบันราชภัฏพุทธศึกษา 2543 ในรายวิชาปฎิบัติการชีวเคมี 2 และได้นำบทปฎิบัติการนี้ทดลองใช้กับนักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมีกลุ่มตัวอย่างในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จำนวน 51 คน เพื่อทดสอบเจตคติ ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษา และประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยคือ บทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2 แบบสอบถามวัดเจตคติ และแบบประเมินตนเองก่อนและหลังการใช้บทปฎิบัติการ การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลสอบถามวัดเจตคติของนักศึกษาที่มีต่อนบทปฎิบัติการทุกชุด พบว่า นักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมี กลุ่มตัวอย่างในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม มีเจตคติที่คิดต่อบทปฎิบัติการในทุก ๆ ด้าน อยู่ในระดับดี ($3.50 - 4.49$) เช่น วัตถุประสงค์ชัดเจน เนื้อหากระชับ และชัดเจน ทำให้เกิดการเรียนรู้อย่างใช้ความคิดและเหตุผล และเปิดโอกาสให้ใช้เครื่องมืออย่างเต็มที่ ผลการวิเคราะห์ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษาพบว่า ผลสัมฤทธิ์ของนักศึกษา ก่อนและหลังการใช้บทปฎิบัติการทุกชุดมีความแตกต่างกัน โดยหลังการใช้บทปฎิบัติการ นักศึกษามีการเรียนรู้ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 สำหรับประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการแต่ละชุดอยู่ในเกณฑ์กำหนด $E_1 : E_2 = 75 : 75$ โดยมีค่าเบี่ยงเบนได้ $\pm 5\%$ เมื่อ E_1 เป็นคะแนนเฉลี่ยร้อยละ 75 ของคะแนนจากรายงานผลการศึกษาบทปฎิบัติการ E_2 เป็นคะแนนเฉลี่ยร้อยละ 75 ของคะแนน จากคะแนนประเมินตนเองเมื่อสิ้นสุดการดำเนินกิจกรรมในบทปฎิบัติการแต่ละชุด

Research Title : The Research for Developing the Laboratory Experiment on Biochemistry II

Author : Assoc. Prof. Reudeewan Bunyarat

Field : Chemistry

Research Year : 2002

Abstract

The purpose of this research is to develop the laboratory experiment on Biochemistry II which designed to improve students' scientific skills are provided in order to enhance students' opportunities to utilize the scientific equipment. Through this process, five laboratory experiments were constructed. The contents of all laboratory experiment corresponded to Rajabhat Institute curriculum 2000 cover Biochemistry Laboratory II.

Population in this study was 51 Rajabhat undergraduates. This study was separated into three parts, firstly participants' attitude, secondly, participants' achievements and finally, the efficiency of the laboratory experiment. The tools were, Biochemistry Laboratory II, attitude questionnaire and pre-test and post-test. SPSS for Window was used to analyze the data.

The findings showed that participants had positive attitude towards all laboratory experiments. Logical thinking was achieved through the process of laboratory experiment interaction. All laboratory experiments helped create students ability to utilize the installed scientific equipment. Participants gained more knowledge from studying all laboratory experiments at the level of 0.05 statistically significant. The efficiency of all laboratory experiments were in the criteria $E_1 : E_2 = 75 : 75$. This was accepted for the error $\pm 5\%$ where E_1 was the 75% average score from laboratory experiment study report E_2 was the 75% average score from the post-test.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเรียนภาคปฏิบัติการนับว่าเป็นหัวใจสำคัญในการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์ เพราะนอกจากจะทำให้เข้าใจภาคทฤษฎีได้อย่างลึกซึ้งแล้ว การปฏิบัติการยังช่วยกระตุ้นให้นักศึกษาเกิดจินตนาการและความคิดสร้างสรรค์ในการทางกระบวนการและวิธีการต่าง ๆ หรือมีความคิดที่สมเหตุสมผลทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งมีเจตคติที่ดี

สภาพปัจจุบันที่เป็นอยู่ต้องยอมรับว่าการจัดการเรียนการสอนภาคปฏิบัติการ วิชาเคมีในสถานบันราษฎร์ยังไม่ทันกับความก้าวหน้าใหม่ ๆ ซึ่งเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถใช้การทดลองเพื่อให้ผู้เรียนเกิดความคิดรวบยอดในเรื่องต่าง ๆ ได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ขาดปัจจัยสนับสนุนหลาย ๆ ด้านรวมทั้งบทปฏิบัติการที่จะใช้เป็นแนวทางในการจัดการเรียน การสอนภาคปฏิบัติการให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวด้วย ข้อพเจ้ายังเน้นถึงความสำคัญในเรื่องนี้ ประกอบกับทางสถาบันได้รับการสนับสนุนจากโครงการพัฒนาการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ในสถาบันราชภัฏ ในเรื่อง อุปกรณ์ เครื่องมือ และวัสดุวิทยาศาสตร์เพิ่มมากขึ้น จึงได้คิดวิจัยเพื่อพัฒนาบทปฏิบัติการวิชาชีวเคมี 2

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อสร้างบทปฏิบัติการวิชาชีวเคมี 2 สำหรับนักศึกษาระดับปริญญาตรี
- เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการให้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งแบ่งเป็นสามด้าน คือ
 - เจตคติของผู้เรียนต่อการใช้บทปฏิบัติการให้อยู่ในระดับดี ($3.50 - 4.49$)
 - ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษาภายหลังการใช้บทปฏิบัติการ มีความรู้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05
 - ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด $E_1/E_2 = 75/75$ โดยมีค่าเบี่ยงเบนได้ $\pm 5\%$

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. มีบทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2
2. บทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2 ได้รับการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพทั้งสามด้าน ดือ
 - 1) เจตคติของผู้ใช้บทปฎิบัติการ
 - 2) ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษา
 - 3) ประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. สร้างบทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2 จำนวน 5 ชุด ได้แก่
 - 1) บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์
 - 2) บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต
 - 3) บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน
 - 4) บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด
 - 5) บทปฎิบัติการ เรื่อง กรณีศึกษา
2. ทดลองใช้บทปฎิบัติการเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการเป็นรายบุคคล รายกลุ่ม และทดสอบภาคสนาม ณ สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม ทั้งนี้รวมทั้งการทดสอบวัดเจตคติของผู้เรียนต่อการใช้บทปฎิบัติการ และทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษา ภายหลังการใช้บทปฎิบัติการ
3. กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ นักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จำนวน 51 คน

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. บทปฎิบัติการ หมายถึง บทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2 ที่ผู้จัดสร้างขึ้น จัดเป็น 5 บทปฎิบัติการ ได้แก่ ปฏิบัติการเรื่องเอนไซม์ คาร์บอไฮเดรต โปรตีน ลิพิด กรณีศึกษา
2. แบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน หมายถึง แบบทดสอบที่ใช้วัดความรู้ ความสามารถในการเรียนวิชาชีวเคมี 2 ในเนื้อหาที่สอดคล้องกับบทปฎิบัติการ
3. ประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ หมายถึง เกณฑ์มาตรฐานที่ใช้ในการประเมิน ประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ ซึ่งใช้สัญลักษณ์ E_1 / E_2 และในการวิจัยครั้งนี้กำหนดเกณฑ์ไว้ 75/75 โดย

75 ตัวแรก หมายถึง ประสิทธิภาพของกระบวนการเรียนรู้จากบทปฐบัติการ

75 ตัวหลัง หมายถึง ประสิทธิภาพของผลลัพธ์การเรียนรู้ของผู้เรียน

4. ความก้าวหน้าในการเรียน หมายถึง ค่าของ การพัฒนาในการเรียนรู้ซึ่งได้จากการศึกษาความแตกต่างระหว่างคะแนนก่อนเรียนและหลังเรียนโดยใช้ค่าที (T-test) และคะแนนหลังเรียนต้องสูงกว่าคะแนนก่อนเรียนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.6 แผนการดำเนินงาน

ตาราง 1.1 รายละเอียดและระยะเวลาในการดำเนินงาน

รายการ	ระยะเวลาในการดำเนินงาน											
	ปี 2544						ปี 2545					
	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ก.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.
1. วิเคราะห์เนื้อหา	↔											
2. เขียนเค้าโครง บทปฎิบัติการ	↔	→										
3. เขียนบทปฎิบัติการ	↔	→										
4. สร้างและจัดทำอุปกรณ์	↔	→										
5. ทดลองรายบุคคล	↔	→										
6. ประเมินผลการทดลอง	↔	→										
7. ปรับปรุงบทปฎิบัติการ	↔			↔			↔					
8. ทดลองรายกลุ่ม	↔			↔			↔					
9. ประเมินผลการทดลอง	↔			↔			↔					
10. ปรับปรุงบทปฎิบัติการ	↔			↔			↔					
11. ทดลองภาคสนาม	↔			↔			↔					
12. ประเมินผลการทดลอง	↔			↔			↔					
13. ปรับปรุงบทปฎิบัติการ	↔			↔			↔					
14. รวมรวมข้อมูลและ วิเคราะห์ข้อมูลพร้อม พิมพ์เผยแพร่	↔			↔			↔					

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อเป็นพื้นฐาน การวิจัยในรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 การสอนแบบปฏิบัติการ (Laboratory approach)

การสอนแบบปฏิบัติการ มีวัตถุประสงค์ที่ต้องการให้นักเรียน 2 ประการ คือ การเรียนรู้เทคนิคปฏิบัติการ และการเข้าใจกระบวนการเสาะแสวงหาความรู้ตามหลักวิทยาศาสตร์ ซึ่งวัตถุประสงค์ข้อนี้มีความสำคัญพื้นฐานต่อการเรียนการสอนวิทยาศาสตร์เป็นอย่างยิ่ง ดังนั้น การเรียนภาคปฏิบัติการจึงเป็นโอกาสที่ดีที่สุดสำหรับให้นักศึกษาเข้าใจเรื่องนี้ มีเหตุผลสำคัญ ๆ ที่ทำให้เราคิดว่าการพัฒนาการเรียนการสอนควรเป็นการเรียนการสอนที่เน้นกระบวนการ เนื่องจาก ประการที่หนึ่ง ความก้าวหน้าและเพิ่มพูนของวิทยาการต่าง ๆ ที่มีอยู่มากทุก ๆ วัน วิธีสอนที่จะนำวิทยาการเหล่านี้มาให้ผู้เรียนรับรู้ได้ในเวลาที่เท่าเดิมนั้น คือ การสอนที่ต้องเน้นกระบวนการเสาะแสวงหาความรู้ ประการที่สอง เป็นการสอนให้ผู้เรียน กิดเป็น ทำเป็น และแก้ปัญหาเป็น เพื่อให้ผู้เรียนพร้อมที่จะรับสถานการณ์ในปัจจุบันและอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สิปปันท์ เกตุทัต (สัญลักษณ์ เที่ยมตอน, 2543) กล่าวว่า จุดอ่อนของ การศึกษาไทยไปเน้นองค์ความรู้ องค์ความรู้คัลลาย ๆ กับของซึ่งมนุษย์รู้อยู่แล้ว วิธีการหาความรู้ สำคัญยิ่งกว่าองค์ความรู้มหภาค

ลาวัลย์ พลกถ้า (2523) ได้ให้อธิบายว่า การสอนแบบปฏิบัติการเป็นวิธีการสอน ที่ผู้เรียนได้เรียนจากการปฏิบัติการจริง เป็นการเรียนจากประสบการณ์ตรง นักเรียนได้ทดลอง ปฏิบัติ เสาหาข้อมูล ค้นหาวิธีการและกระบวนการด้วยตนเอง การสอนแบบปฏิบัติการ มีลักษณะสำคัญ คือ ใช้วัสดุอุปกรณ์ที่เป็นรูปธรรม มีการจดบันทึกข้อมูล ทักษะกระบวนการทาง วิทยาศาสตร์ทั้งหมดนักเรียนเป็นผู้กระทำ ส่งเสริมปฏิสัมพันธ์ นักเรียนเรียนตามความสามารถ ส่งเสริมความคิดสร้างสรรค์ การเรียนการสอนที่มีผู้เรียนเป็นศูนย์กลาง นักเรียนมีหน้าที่ในการ ปฏิบัติกิจกรรมที่ครูเสนอแนะไว้ อันนำไปสู่การค้นพบ กฎ สูตร ข้อมูลด้วยตนเอง ครูเป็น

ผู้จัดสื่อการเรียน แนะนำและอำนวยความสะดวกให้ และลาวลัย พลกัลฯ "ได้สรุปคุณค่าของ การสอนแบบปฏิบัติการ ไว้ดังนี้"

1. ช่วยให้นักเรียนเกิดข้อสรุปในเรื่องนั้น ๆ เกิดจินตนาการและความคิดสร้างสรรค์ ในการหากระบวนการและวิธีการต่าง ๆ
2. จากกิจกรรมที่ปฏิบัติจริง ทำให้เกิดข้อสรุปในเรื่องนั้น ๆ เกิดความเข้าใจอย่าง ถ่องแท้ ทำให้เกิดความสามารถในการถ่ายโยงการเรียนรู้
3. ผู้เรียนเป็นศูนย์กลาง ผู้เรียนทำกิจกรรมตลอดเวลา
4. การเรียนแบบปฏิบัติการทำให้ผู้เรียนไม่เคร่งเครียด ทำให้ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อ วิชา
5. เปิดโอกาสในการนำปัญหาต่าง ๆ มาให้นักเรียนคิด เร้าให้เกิดความกระตือรือร้น ในการแก้ปัญหา

ยุพิน พิพิธกุล (2523) "ได้เสนอข้อคิดของวิธีการสอนแบบปฏิบัติการ ไว้ดังนี้"

1. นักเรียนสนใจ เพราะได้ทำสิ่งต่าง ๆ ด้วยตนเอง
2. การเรียนแบบรูปธรรมไปสู่namธรรม และการเรียนโดยการกระทำ
3. ผู้เรียนเข้าใจเนื้อหาวิชาได้ชัดเจนขึ้นและสามารถกันพนความจริงด้วยตนเอง
4. ผู้เรียนมีอิสระในการทำงานและมีพัฒนาการเป็นรายบุคคล ทำให้เกิดความ เชื่อมั่นในตนเอง
5. ผู้เรียนประสานงานกันและแลกเปลี่ยนความคิดกันเมื่อทดลองเป็นกลุ่ม
6. เมื่อผู้เรียนทดลองแล้วประสบผลสำเร็จทำให้มีกำลังใจในการเรียน
7. ผู้เรียนจะใช้มือได้คล่องแคล่วขึ้น เพราะจะต้องจับเครื่องมือหรือวัสดุ
8. ผู้เรียนเข้าใจเนื้อหาวิชาบางเรื่อง ได้ติ่งสุดจากการเรียนปฏิบัติการ

ลูเนตตา และคณะ (Lunetta and others, 1981) "ได้กล่าวถึงความสำคัญของกิจกรรม ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ว่า เป็นกิจกรรมที่มีส่วนช่วยให้ผู้เรียนมีความเข้าใจในธรรมชาติของ วิทยาศาสตร์ ช่วยส่งเสริมพัฒนาการทางทางสติปัญญา ช่วยให้ผู้เรียนเกิดมโนทัศน์ทางวิทยาศาสตร์ และช่วยให้มีเจตคติที่ดีต่อวิทยาศาสตร์"

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จอห์น ดิวอี้ (John Dewey) อ้างถึงใน Kutek (1988) จากผลการศึกษาวิจัยของ จอห์น ดิวอี้ พบว่าการเรียนรู้เกิดจากการกระทำ (learning by doing) เช่น ได้กระทำการบ้านวัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ ได้ฝึกฝนทักษะทางสมองโดยการสังเกต ทดลอง ลองผิดลองถูก ได้คิด ได้แก้ปัญหา ได้ทำความเข้าใจ และสร้างภาพโดยรวม พร้อมทั้งได้ใช้ความสามารถของตนเอง ค้นพบและตรวจสอบความรู้

มาเชล ชันเดอร์เบิร์ก (Marshall Sunberd) และ โจเซฟ อาร์มสตรอง (Joseph Armstrong) (1991) ได้ทำการสำรวจการใช้บทปฏิบัติการในการสอนชีววิทยาของมหาวิทยาลัย แห่งรัฐในสหรัฐอเมริกา จำนวน 76 แห่งพบว่า บทปฏิบัติการที่จะทำให้ผู้เรียนได้รับประสบการณ์ กีฬากับเทคนิค ได้ทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ได้ความคิดรวบยอดและได้อารมณ์ คือ บทปฏิบัติการในเชิงวิจัย เช่นผู้สอนให้ข้อมูลแก่ผู้เรียน และให้ผู้เรียนแก้ปัญหาเอง เป็นต้น ปฏิบัติการลักษณะนี้จะเป็นสิ่งที่ท้าทายให้ผู้เรียนมีลักษณะอย่างรู้อย่างเห็น สร้างความคิดสร้างสรรค์ เกิดทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ และสิ่งสำคัญคือทำให้เกิดความมั่นใจในตนเอง

นิตยา บุญทัน (2541) ได้ศึกษาผลการใช้ชุดปฏิบัติการที่สร้างขึ้นเพื่อพัฒนาทักษะ ด้านการคิดและสร้างโครงงานวิทยาศาสตร์โดยเปรียบเทียบคุณภาพของโครงงานวิทยาศาสตร์ ของนักเรียนที่เรียนโดยใช้ชุดปฏิบัติการและที่เรียนโดยครูเป็นผู้แนะนำ กลุ่มตัวอย่างเป็นนักเรียน โรงเรียนวัดโนนท้ายพায়พ จำนวน 30 คน วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS ผลการวิจัยพบว่า ชุดปฏิบัติการสามารถพัฒนาทักษะด้านการคิดและสร้างโครงงานวิทยาศาสตร์ได้ และคุณภาพ ของโครงงานวิทยาศาสตร์ของนักเรียนที่สอนโดยใช้ชุดปฏิบัติการมีคุณภาพดีกว่าโครงงาน วิทยาศาสตร์ของนักเรียนที่สอนโดยครูเป็นผู้แนะนำ

อุไรวรรณ วิจารณกุล (2543) ได้ทำการสร้างบทปฏิบัติการ ในวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ จำนวน 10 บทปฏิบัติการ และทดลองใช้กับนักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม จำนวน 39 คน เพื่อวิจัยเปรียบเทียบผล ของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการวิชาพันธุศาสตร์จุลินทรีย์ต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทาง พันธุศาสตร์ ทักษะ และทัศนคติของนักศึกษาโดยเปรียบเทียบระหว่างก่อนเรียนและหลังเรียน พบว่า ภายหลังการใช้บทปฏิบัติการแล้ว นักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์มีความคิดรวบยอด ในหลักการที่สำคัญทางพันธุศาสตร์จุลินทรีย์สูง มีทัศนคติที่ดีในทางบวกต่อวิชาพันธุศาสตร์ จุลินทรีย์ และมีทักษะทางปฏิบัติการทดสอบสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับ $P < .01$

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

บทปฎิบัติการที่สร้างขึ้น ได้นำไปทดลองใช้กับนักศึกษา โปรแกรมวิชาเคมีระดับปริญญาตรี ในสถาบันราชภัฏพิษลังกรณ ชั้นปีที่ 2 ปีการศึกษา 2545 จำนวน 28 คน และชั้นปีที่ 3 ปีการศึกษา 2545 จำนวน 23 คน

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. บทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2
2. แบบสอบถามวัดเจตคติ
3. แบบประเมินตนเองก่อนและหลังการใช้บทปฎิบัติการ

3.3 การสร้างเครื่องมือ

1. สร้างบทปฎิบัติการวิชาชีวเคมี 2

การสร้างบทปฎิบัติการ มีขั้นตอนดังนี้

1) วิเคราะห์เนื้อหา

ผู้จัดได้นำหัวข้อเรื่องในรายวิชาปฎิบัติการชีวเคมี 2 ตามหลักสูตรสถาบันราชภัฏ พุทธศักราช 2543 มาจัดทำเป็นบทปฎิบัติการ ได้ทั้งหมด 5 ชุด รายละเอียดของบทปฎิบัติการ แสดงดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 ชื่อบทปฎิบัติการในรายวิชาปฎิบัติการชีวเคมี 2

บทปฎิบัติการ
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรณีวิกฤติ

- 2) เขียนเก้าโครงงบทปฎิบัติการ
- 3) เขียนบทปฎิบัติการซึ่งประกอบด้วย
- ก. จัดระเบียบโครงสร้างเนื้อหา
 - ข. กำหนดกิจกรรม
 - ค. เขียนแบบประเมินตนเองก่อนเรียน พร้อมให้ผู้มีประสบการณ์ตรวจสอบคุณภาพ
 - ง. เขียนแบบประเมินตนเองหลังเรียน พร้อมให้ผู้มีประสบการณ์ตรวจสอบคุณภาพ
- 4) สร้างและจัดทำอุปกรณ์

2. สร้างแบบสอบถามวัดเจตคติ

แบบสอบถามวัดเจตคติ เป็นการตรวจสอบความพอใจของผู้เรียนต่อประเด็นต่าง ๆ ของบทปฎิบัติการ แบบสอบถามดังกล่าวใช้ตามแบบของ พล คำปังสุ และคณะทำงาน (2543) รายละเอียดของแบบสอบถาม แสดงดังภาพนูก ข.

3. สร้างแบบประเมินตนเองก่อนและหลังการใช้นบทปฎิบัติการ

ชิ่งสร้างให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์เชิงพุทธิกรรมที่กำหนดไว้ในแผนการเรียน

4. สร้างแบบทดสอบวัดผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน

ชิ่งสร้างให้ครอบคลุมเนื้อหาที่กำหนดไว้ในแผนการเรียน พร้อมทั้งให้ผู้มี

ประสบการณ์ตรวจสอบคุณภาพ

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการใช้ตามแบบของชัยยงค์ พรมวงศ์ และ วาสนา ทวีกุลทรัพย์ (นิคม ทางเดิน และ กัน, 2544) มีขั้นตอนดังนี้

1. เกณฑ์การทดสอบประสิทธิภาพ

ก่อนทดสอบประสิทธิภาพ ได้กำหนดเกณฑ์ในการทดสอบไว้ดังนี้

1) การวัดเจตคติของผู้เรียนต่อการใช้บทปฎิบัติการ หากได้จากความพอใจของผู้เรียนที่ได้รับจากการเรียนจากบทปฎิบัติการในประเด็นต่าง ๆ

เกณฑ์การประเมินชั้นเลขคณิต จากการตอบแบบสอบถามวัดเจตคติใช้เกณฑ์ดังนี้

1.00 – 1.49 = ระดับต่ำ หรือไม่มี

1.50 – 2.49 = ระดับต่ำ

2.50 – 3.49 = ระดับปานกลาง

3.50 – 4.49 = ระดับดี

4.50 – 5.00 = ระดับดีมาก

การวิจัยครั้งนี้ ต้องการให้การทดสอบวัดเจตคติของผู้เรียนต่อการใช้บทปฎิบัติการอยู่ในเกณฑ์คือ (3.50 – 4.49)

2) การทดสอบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนหรือความก้าวหน้าในการเรียนของนักศึกษา หาได้จากผลต่างระหว่างแบบประเมินตนเองหลังเรียนและก่อนเรียน

เกณฑ์ที่ตั้งไว้ คือ หลังการใช้บทปฎิบัติการ นักศึกษามีการเรียนรู้ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

3) การทดสอบประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ คำนวณจากสูตร $E_1:E_2$

$$E_1 = \frac{\sum X/n}{A} \times 100$$

เมื่อ E_1 = ประสิทธิภาพของกระบวนการ

X = คะแนนรวมของรายงานผลการศึกษาบทปฎิบัติการ

A = คะแนนเต็มของรายงานผลการศึกษาบทปฎิบัติการ

n = จำนวนนักศึกษา

$$E_2 = \frac{\sum F/n}{B} \times 100$$

เมื่อ E ₂	=	ประสิทธิภาพของผลลัพธ์
F	=	คะแนนรวมของแบบประเมินตนเองหลังการใช้บทปฏิบัติการ
B	=	คะแนนเต็มของแบบประเมินตนเองหลังการใช้บทปฏิบัติการ
n	=	จำนวนนักศึกษา

เกณฑ์ที่ตั้งไว้คือ $E_1:E_2 = 75:75$ โดยมีค่าเบี่ยงเบนได้ $\pm 5\%$

2. ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพ

1) ทดลองใช้บทปฏิบัติการกับนักศึกษาเป็นรายบุคคล (1 : 1) ผู้สอน 1 คน กับนักศึกษา 1 คน โดยทดลอง 3 ครั้ง กับนักศึกษาปานกลาง นักศึกษาอ่อน และนักศึกษาเก่ง นำผลที่ได้มาเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด และทำการปรับปรุงแก้ไข ระหว่างเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม 2544 ณ โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิษณุลสสกรรม

2) ทดลองใช้บทปฏิบัติการกับนักศึกษาเป็นรายกลุ่ม (1:10) ผู้สอน 1 คน กับนักศึกษา 10 คน โดยเลือกนักศึกษาที่มีระดับสตดปัญญาคล้ายกัน นำผลที่ได้มาเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด และทำการปรับปรุงแก้ไข ระหว่างภาคเรียนที่ 2 ปีการศึกษา 2544 และภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2545 ณ โปรแกรมวิชาเคมี และวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิษณุลสสกรรม

3) ทดลองใช้บทปฏิบัติการกับนักศึกษาแบบภาคสนาม (1 : >40) ผู้สอน 1 คน กับนักศึกษามากกว่า 40 คน ซึ่งมีนักศึกษาคล้ายกัน นำผลที่ได้มาเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด และทำการปรับปรุงแก้ไข ระหว่างภาคเรียนที่ 2 ปีการศึกษา 2545 ณ โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิษณุลสสกรรม

3.5 การรวบรวมข้อมูล

1. ให้นักศึกษาทำแบบประเมินตนเองก่อนใช้บทปฏิบัติการ
2. นักศึกษาดำเนินกิจกรรมตามบทปฏิบัติการ และรายงานผลการศึกษาบทปฏิบัติการ (ตอบคำถามท้ายบทปฏิบัติการ)
3. ให้นักศึกษาทำแบบประเมินตนเองเพื่อสื้นสุดการดำเนินกิจกรรมในบทปฏิบัติการ
4. หลังจากสื้นสุดการเรียนให้นักศึกษาตอบแบบสอบถามตามวัดเขตคติที่มีต่อ
บทปฏิบัติการ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยจากการใช้แบบภูมิบัติการวิชาชีวเคมี 2 ผู้วิจัยได้นำเสนอเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เจตคติของผู้เรียนต่อการใช้แบบภูมิบัติการ ส่วนที่ 2 ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษา ส่วนที่ 3 ประสิทธิภาพของแบบภูมิบัติการ

4.1 เจตคติของผู้เรียนต่อการใช้แบบภูมิบัติการ

1. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อวัตถุประสงค์ของแบบภูมิบัติการ ในด้านความชัดเจน และ ความเข้าใจ ซึ่งผลที่ได้แสดงดังตาราง 4.1

ตาราง 4.1 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนก่อนถ้าอย่างต่อ
วัตถุประสงค์ของแบบภูมิบัติการ

แบบภูมิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 แบบภูมิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.74	.74	ดี
ชุดที่ 2 แบบภูมิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	3.86	.78	ดี
ชุดที่ 3 แบบภูมิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 4 แบบภูมิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.78	.76	ดี
ชุดที่ 5 แบบภูมิบัติการ เรื่อง กรณีวิเคราะห์	3.74	.74	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อวัตถุประสงค์ของแบบภูมิบัติการทุกชุด นั่นคือ วัตถุประสงค์
ของแบบภูมิบัติการทุกชุดมีความชัดเจนดีและเข้าใจง่าย

2. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อความชัดเจนของขั้นตอนในการใช้บทปฎิบัติการ แสดง

คั่งตาราง 4.2

ตาราง 4.2 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกับตัวอย่าง
ต่อความชัดเจนของขั้นตอนในการใช้บทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไชน์	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง การใบไสเดรต	3.70	.73	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.70	.73	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.74	.66	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดนิวคลีอิก	3.74	.74	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อความชัดเจนของขั้นตอนในการใช้บทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ
ขั้นตอนในการใช้บทปฎิบัติการทุกชุดมีความชัดเจนคือ

3. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อโอกาสการใช้เครื่องมือในการใช้บทปฎิบัติการ แสดงดังตารางที่ 4.3

ตาราง 4.3 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างค่อโอกาสการใช้เครื่องมือในการใช้บทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง การโนไไซเดรต	3.70	.73	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรดีน	3.78	.76	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.74	.66	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดนิวคลีอิก	3.83	.78	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อโอกาสการใช้เครื่องมือในการทดลองของบทปฎิบัติการทุกชุด นั้นคือ ผู้เรียนมีโอกาสใช้เครื่องมือในการทดลองของบทปฎิบัติการทุกชุดเป็นอย่างดี

4. เจตคติของผู้เรียนที่มีค่าความสนุกเพลิดเพลินต่อการทดลองในบทปฏิบัติการ
แสดงดังตาราง 4.4

**ตาราง 4.4 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อ
ความสนุกเพลิดเพลินของการทดลองในบทปฏิบัติการ**

บทปฏิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฏิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.68	.71	ดี
ชุดที่ 2 บทปฏิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	3.58	.67	ดี
ชุดที่ 3 บทปฏิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.52	.61	ดี
ชุดที่ 4 บทปฏิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.58	.67	ดี
ชุดที่ 5 บทปฏิบัติการ เรื่อง กรดนิวคลีอิก	3.72	.67	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่คิดค่าความสนุกเพลิดเพลินกับการทดลองของบทปฏิบัติการทุกชุด
นั้นคือ ผู้เรียนเกิดความสนุกเพลิดเพลินกับการทดลองของบทปฏิบัติการทุกชุดเป็นอย่างดี

5. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อการเรียนรู้โดยใช้ความคิดและเหตุผลของบทปฎิบัติการ
แสดงดังตาราง 4.5

ตาราง 4.5 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อ
การเรียนรู้โดยใช้ความคิดและเหตุผลของบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.78	.76	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง การใบไชเดรต	3.90	.78	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.82	.77	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.74	.74	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรณีวิเคราะห์	3.74	.74	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อการเรียนรู้โดยใช้ความคิดและเหตุผลของบทปฎิบัติการทุกชุด
นั้นก็อ ผู้เรียนเกิดการเรียนรู้อย่างใช้ความคิดและเหตุผลจากบทปฎิบัติการทุกชุดเป็นอย่างดี

6. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อวิธีการนำเสนอเนื้อหาของบทปฎิบัติการว่ามีความง่าย กระชับ และชัดเจน แสดงดังตาราง 4.6

ตาราง 4.6 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อ วิธีการนำเสนอเนื้อหาของบทปฎิบัติการในด้านความง่าย กระชับและชัดเจน

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.86	.78	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง การโน้มน้าวเดรต	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.74	.66	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.78	.76	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดไขมันคลีอิก	3.74	.74	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อวิธีการนำเสนอเนื้อหาของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ วิธีการนำเสนอเนื้อหาของบทปฎิบัติการทุกชุดทำให้เกิดความเข้าใจได้ง่าย มีความชัดเจนและกระชับดี

7. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อความเข้าใจในเนื้อหาของบทปฎิบัติการ แสดง

ดังตาราง 4.7

ตาราง 4.7 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อ
ความเข้าใจในเนื้อหาของบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.68	.73	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	3.70	.73	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.58	.67	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดไขมันสีอิก	3.66	.71	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อความเข้าใจเนื้อหาที่นำเสนอของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ
ผู้เรียนมีความเข้าใจเนื้อหาที่นำเสนอของบทปฎิบัติการทุกชุดเป็นอย่างดี

8. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อความยากของเนื้อหาของบทปฎิบัติการ แสดง

ดังตาราง 4.8

ตาราง 4.8 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อ
ความยากของเนื้อหาของบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.70	.67	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	3.56	.64	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.52	.61	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.68	.71	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดนิวคลีอิก	3.52	.61	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อความยากของเนื้อหาของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ ผู้เรียน
คิดว่าบทปฎิบัติการทุกชุดไม่ยากเกินกว่าที่จะทำให้เกิดความเข้าใจ

9. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อความยาวของเนื้อหาของบทปฎิบัติการ แสดง

ดังตาราง 4.9

ตาราง 4.9 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อ
ความยาวของเนื้อหาของบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.70	.73	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	3.52	.61	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.52	.61	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.50	.61	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดไขมันสัมภาระ	3.58	.67	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อความยาวของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ บทปฎิบัติการทุกชุด
มีความยาวเหมาะสมดี

10. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อความยากของศัพท์ที่ใช้ในบทปฎิบัติการ แสดง
ดังตาราง 4.10

**ตาราง 4.10 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างค่อ
ความยากของศัพท์ที่ใช้ในบทปฎิบัติการ**

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.66	.71	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	3.68	.68	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.70	.73	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.74	.74	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรณีวิกฤติอิก	3.72	.67	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อความยากของศัพท์ที่ใช้ของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ ผู้เรียน
มีความคิดว่าคำศัพท์ที่ใช้ของบทปฎิบัติการทุกชุดไม่ยากเกินไป

ด้านนักวิทย์บริการสอดgnrnราชกัญพิบูรณ์ฯ

21

11. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อรูปภาพประกอบในบทปฎิบัติการ ที่ทำให้เกิดความเข้าใจบทปฎิบัติการ แสดงดังตาราง 4.11

ตาราง 4.11 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อรูปภาพประกอบในบทปฎิบัติการที่ทำให้เกิดความเข้าใจบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.68	.68	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์โนไซเดรต	3.70	.73	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.74	.74	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดไขมันคลอิก	3.76	.76	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อรูปภาพประกอบของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ รูปภาพประกอบของบทปฎิบัติการทุกชุดช่วยให้ผู้เรียนเกิดความเข้าใจดีขึ้น

๖๖๖ ๒๕๙
๗๗๖๖
๗.๑

146843

12. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อคำาณของบทปฎิบัติการและความสามารถตอบคำาณในบทปฎิบัติการ แสดงดังตาราง 4.12

ตาราง 4.12 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนก่อนคุ้มตัวอย่างต่อคำาณของบทปฎิบัติการและความสามารถตอบคำาณในบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.74	.66	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	3.74	.72	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.78	.76	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดนิวคลีอิก	3.76	.76	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อคำาณของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ คำาณของบทปฎิบัติการทุกชุดทำให้ผู้เรียนเกิดความเข้าใจได้ง่าย และผู้เรียนสามารถหาคำตอบได้

13. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อกำลังใจ ความเชื่อในบทปฎิบัติการและ
ความสามารถในการปฏิบัติตามคำสั่งหรือคำชี้แจง ในบทปฎิบัติการและ
ความสามารถในการปฏิบัติตามคำสั่งหรือคำชี้แจง แสดงดังตาราง 4.13

ตาราง 4.13 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อ
ความเชื่อในบทปฎิบัติการและความสามารถในการปฏิบัติตามคำสั่งหรือคำชี้แจง

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	3.70	.67	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.74	.74	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.76	.76	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดไขมันคลอิก	3.66	.71	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อกำลังใจ ความเชื่อในบทปฎิบัติการทุกชุด นั้นคือ กำลังหรือ
คำชี้แจงของบทปฎิบัติการทุกชุดทำให้ผู้เรียนเข้าใจได้ง่ายและสามารถปฏิบัติได้ดี

14. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อเวลาที่กำหนดของบทปฎิบัติการ แสดงดังตาราง 4.14

ตาราง 4.14 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนกลุ่มตัวอย่างต่อเวลาที่กำหนดของบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.66	.71	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง การใบไไซเดรต	3.58	.67	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.54	.64	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.56	.64	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดนิวคลีอิก	3.50	.61	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อเวลาที่กำหนดของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ เวลาที่กำหนดในการเรียนของบทปฎิบัติการทุกชุดมีความเหมาะสมสมดี ไม่มากเกินไปหรือน้อยเกินไป

15. เจตคติของผู้เรียนที่มีต่อแบบประเมินตนเองของบทปฎิบัติการ แสดง
ดังตาราง 4.15

ตาราง 4.15 ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเจตคติของผู้เรียนก่อนตัวอย่างต่อ
แบบประเมินตนเองของบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	Mean	S.D.	เจตคติ อยู่ในเกณฑ์
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	3.78	.76	ดี
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง การใบไฮเดรต	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	3.72	.67	ดี
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	3.74	.66	ดี
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดนิวคลีอิก	3.70	.73	ดี

ผู้เรียนมีเจตคติที่ดีต่อแบบประเมินตนเองของบทปฎิบัติการทุกชุด นั่นคือ แบบ
ประเมินตนเองของบทปฎิบัติการมีความเหมาะสมดี

4.2 ผลการทดสอบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษา

ถ้าใช้สัญลักษณ์ในการวิเคราะห์ข้อมูลเป็นดังนี้

- n = จำนวนนักศึกษากลุ่มตัวอย่าง
- \bar{X} = คะแนนเฉลี่ย
- S.D. = ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- t = ค่าสถิติ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ก่อนและหลังการใช้บทปฎิบัติการของนักศึกษาโปรแกรมวิชาเคมีกลุ่มตัวอย่าง ในสถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม แสดงดังตาราง 4.16

ตาราง 4.16 ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่า t ของผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษา ก่อนและหลังการใช้บทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	การทดสอบ	n	\bar{X}	S.D.	t
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	ก่อน	51	5.25	1.35	66.62*
	หลัง	51	15.76	2.08	
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง สาร์โนไไซเดรต	ก่อน	51	5.08	1.30	51.11*
	หลัง	51	16.31	1.37	
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	ก่อน	51	5.35	1.16	66.63*
	หลัง	51	16.00	0.87	
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	ก่อน	51	4.86	1.11	80.02*
	หลัง	51	16.37	1.13	
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรณีคลือิก	ก่อน	51	5.12	0.99	83.05*
	หลัง	51	16.45	1.10	

หมายเหตุ * หมายถึง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

จากตาราง 4.16 ผลการวิเคราะห์ผลการทดสอบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษาที่ถูกต้องย่าง ก่อนและหลังการใช้บทปฎิบัติการทุกชุด พบว่า มีความแตกต่างกัน โดยหลังการใช้บทปฎิบัติการนักศึกษามีการเรียนรู้ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

4.3 ประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพและความก้าวหน้าในการใช้บทปฎิบัติการ แสดงดังตาราง 4.17

ตาราง 4.17 ประสิทธิภาพและความก้าวหน้าในการใช้บทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ	ค่าประสิทธิภาพ $E_1 : E_2$	ความก้าวหน้าในการใช้ บทปฎิบัติการ
ชุดที่ 1 บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์	87.45 : 78.80	52.55 %
ชุดที่ 2 บทปฎิบัติการ เรื่อง คาร์บอไฮเดรต	89.70 : 81.55	56.15 %
ชุดที่ 3 บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรตีน	82.15 : 80.00	53.25 %
ชุดที่ 4 บทปฎิบัติการ เรื่อง ลิพิด	87.45 : 81.85	57.55 %
ชุดที่ 5 บทปฎิบัติการ เรื่อง กรดไขมันคลอิก	89.10 : 82.25	56.65 %

จากตาราง 4.17 เมื่อพิจารณาผลการทดสอบประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการทุกชุด พบว่า อัตรากำหนดคือ $E_1 : E_2 = 75 : 75$ โดยมีค่าเบี่ยงเบนได้ $\pm 5\%$ เมื่อ E_1 เป็นคะแนนเฉลี่ยร้อยละ 75 ของคะแนนจากรายงานผลการศึกษาบทปฎิบัติการ E_2 เป็นคะแนนเฉลี่ยร้อยละ 75 ของคะแนนจากแบบประเมินตนเอง เมื่อสิ้นสุดการดำเนินกิจกรรมในบทปฎิบัติการ ความก้าวหน้าของการใช้บทปฎิบัติการทุกชุดอยู่ในช่วง 52.55 % – 57.55 %

บทที่ 5

สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

5.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างบทปฏิบัติการวิชาชีวเคมี 2
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการให้เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งแบ่งเป็นสามด้าน คือ
 - 1) เจตคติของผู้เรียนต่อการใช้บทปฏิบัติการอยู่ในระดับดี ($3.50 - 4.49$)
 - 2) ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษาภายหลังการใช้บทปฏิบัติการ มีความรู้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05
 - 3) ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด $E_1 : E_2 = 75 : 75$ โดยมีค่าเบี่ยงเบนได้ $\pm 5\%$

5.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. บทปฏิบัติการวิชาชีวเคมี 2
2. แบบสอบถามวัดเจตคติ
3. แบบประเมินตนเองก่อนและหลังการใช้บทปฏิบัติการ

5.3 สรุปผลการวิจัย และอภิปราย

1. ผลการทดสอบวัดเจตคติของนักศึกษาถ้วนด้วยอย่างต่อการใช้บทปฏิบัติการทุกชุดพบว่า นักศึกษามีเจตคติที่ดีต่อบทปฏิบัติการในทุกด้าน อยู่ในระดับดี ($3.50 - 4.49$) เช่น
 - 1) วัตถุประสงค์ ขั้นตอนการใช้ การนำเสนอเนื้อหาของบทปฏิบัติการ มีความชัดเจนดี
 - 2) ผู้เรียนมีโอกาสใช้เครื่องมือในการทดลองเป็นอย่างดี
 - 3) เนื้อหาในบทปฏิบัติการมีความเหมาะสมและทำให้ผู้เรียนเกิดการเรียนรู้ โดยใช้ความคิดและเหตุผล
- 4) คำถ้าและคำสั่งหรือคำชี้แจงในบทปฏิบัติการมีความชัดเจนและปฏิบัติได้

5) แบบประเมินตนเองมีความเหมาะสม

2. ผลการทดสอบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักศึกษากลุ่มตัวอย่าง ก่อนและหลังการใช้บทปฏิบัติการ พบร่วงหลังการเรียนโดยใช้บทปฏิบัติการ นักศึกษามีการเรียนรู้ มีทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ และมีความสามารถใช้เครื่องมือสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

3. ค่าประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ ได้คำนวณโดยการหาราบประสิทธิภาพของกระบวนการ (E_1) และหาค่าประสิทธิภาพของผลลัพธ์ (E_2) และแปรความโดยเทียบกับเกณฑ์ที่กำหนด $E_1:E_2 = 75:75$ โดยมีค่าเบี่ยงเบนได้ $\pm 5\%$ พบร่วงประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการทุกชุดอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

5.4 ข้อเสนอแนะ

1. บทปฏิบัติการที่สร้างขึ้นนี้สามารถนำไปใช้กับนักศึกษาในสถาบันราชภัฏได้ เพราะทำให้เกิดการเรียนรู้อย่างใช้ความคิดและเหตุผล เกิดทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ และเปิดโอกาสให้ใช้เครื่องมือหลากหลายตั้งแต่เครื่องแก้ว จนถึงเครื่องมือวิจัยระดับสูง

2. บทปฏิบัติการวิชาชีวเคมี 2 ที่พัฒนาขึ้นนี้ ใช้สารเคมีไม่นานนัก ทำให้มีสิ่งปลิオง ประหยัด เหมาะสมจะนำไปใช้สำหรับการเรียนการสอน

3. ควรมีการสัมมนาวิเคราะห์บทปฏิบัติการ โดยคณะอาจารย์ที่ผ่านการสอนรายวิชานี้ มาแล้ว

บรรณานุกรม

คณะกรรมการปฏิรูปการเรียนรู้. **ปฏิรูปการเรียนรู้ ผู้เรียนสำคัญที่สุด.** กรุงเทพฯ :

วัฒนาพานิช. 2544.

พล กำปังสุ แและคณะทำงาน. **คู่มือการรวมรวมข้อมูล.** (โครงการประเมินชุดการสอน
วิชาฟิสิกส์พื้นฐาน) สถาบันราชภัฏเลย, 2543.

นิคม ทาเดงและคณะ. **สื่อการศึกษาพัฒนสรร.** พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช,
2544.

บุพิน พิพิธกุล. **การเรียนการสอนคณิตศาสตร์.** กรุงเทพฯ : บพิธการพิมพ์, 2523.

ลาวลัย พลกล้า. **การสอนคณิตศาสตร์แบบปฏิบัติการ.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ
ประจำปี 2523.

สัญญาลักษณ์ เทียมถอน. **การศึกษาไทยในสถานการณ์โลก.** พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี : มติใหม่,
2543.

สุจitra สุขุมานันท์. **การวิจัยเชิงปฏิบัติการ : ผลของการจัดกิจกรรมการเรียนคณิตศาสตร์แบบ
ปฏิบัติการในโรงเรียนที่จัดชั้นเรียนแบบรวมชั้น.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ
ประจำปี 2542.

สำนักงานมาตรฐานการศึกษา, สำนักงานสภาพัฒนาบ้านราชภัฏ. หลักสูตรสถาบันราชภัฏ
พุทธศักราช 2543. กรุงเทพฯ, 2543.

อุ่รวรรณ วิจารณกุล. **ผลของการเรียนการสอนเชิงปฏิบัติการในวิชาพัฒนาคณิตศาสตร์ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ ๑**
ต่อความคิดรวบยอดที่สำคัญทางพัฒนาคณิตศาสตร์ ทักษะ และทัศนคติของนักศึกษา
โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์. สำนักงานสภาพัฒนาบ้านราชภัฏ, 2543.

<http://www.hhmc.org/beyond Bio101/approach.htm>

Kutek, Gerald L. **Education and Schooling in America.** 2nd. ed., New Jersey : Prentice Hall,
1988.

Lunetta, V.N., A.Hofstein and G.Gidding. "Evaluating Science Laboratory Skills."

The Science Teacher. 48(7) : 22-25 ; January, 1981.

Nittaya Boontan. **Effects of Using Practice Packages to Promote Lower Secondary
School Students' Skills in Creating and Conducting Science Projects.**

Chiangmai : Chiangmai University, 1998.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การหาประสิทธิภาพของบทปฎิบัติการ

บทปฎิบัติการ เรื่อง เอนไซม์

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
1	7	16	18	9	81
2	5	15	17	10	100
3	7	17	19	10	100
4	7	15	19	8	64
5	6	16	18	10	100
6	6	17	17	11	121
7	7	17	18	10	100
8	7	18	18	11	121
9	5	17	17	12	144
10	4	15	17	11	121
11	5	16	18	11	121
12	3	15	16	12	144
13	5	17	17	12	144
14	3	14	16	11	121
15	6	16	18	10	100
16	7	16	19	9	81
17	5	15	16	10	100
18	5	15	17	10	100
19	6	15	19	9	81
20	4	14	16	10	100
21	4	15	18	11	121
22	6	15	18	9	81
23	3	14	18	11	121
24	4	14	17	10	100
25	7	18	20	11	121

คณที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
26	5	15	18	10	100
27	6	15	17	9	81
28	6	15	18	9	81
29	6	15	18	9	81
30	5	16	17	9	81
31	5	16	17	9	81
32	4	14	16	10	100
33	6	18	19	12	144
34	7	18	19	11	121
35	8	18	20	10	100
36	6	17	18	11	121
37	5	16	18	11	121
38	4	16	17	12	144
39	3	15	16	12	144
40	5	15	16	10	100
41	7	16	17	9	81
42	6	16	17	10	100
43	4	17	18	13	169
44	4	15	17	11	121
45	3	15	17	12	144
46	4	16	17	12	144
47	5	15	16	10	100
48	7	17	18	10	100
49	6	16	18	10	100
50	4	15	16	11	121
51	3	15	16	12	144
รวม	268	804	892	532	5612

หมายเหตุ : อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ก = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

$$\bar{X}_n = \frac{268}{51} = 5.25$$

$$\bar{X}_a = \frac{804}{51} = 15.76$$

$$\bar{X}_u = \frac{892}{51} = 17.49$$

$$E_1 = \frac{17.49}{20} \times 100 = 87.45$$

$$E_2 = \frac{15.76}{20} \times 100 = 78.80$$

$$\text{ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ} = E_1 / E_2 = \frac{87.45}{78.80} = 1.11$$

$$\text{ร้อยละความก้าวหน้า} = \frac{15.76 - 5.25}{20} \times 100 = 52.55$$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{n \sum D^2 - (\sum D)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{532}{\sqrt{\frac{(51 \times 5612) - (532)^2}{51-1}}}$$

$$t = 66.6250$$

บทปฎิบัติการ เรื่อง การโภชนาศ

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
1	5	16	18	11	121
2	5	16	18	11	121
3	4	16	19	12	144
4	6	16	17	10	100
5	6	15	17	9	81
6	6	14	17	8	64
7	5	13	17	8	64
8	4	16	16	12	144
9	3	15	16	12	144
10	7	14	17	7	49
11	6	13	18	7	49
12	6	16	16	10	100
13	5	15	15	10	100
14	4	16	17	12	144
15	3	17	18	14	196
16	4	16	18	12	144
17	5	18	18	13	169
18	6	18	19	12	144
19	6	18	18	12	144
20	5	16	17	11	121
21	7	16	17	9	81
22	5	17	18	12	144
23	4	16	18	12	144
24	3	16	18	13	169
25	6	18	20	12	144

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
26	6	19	19	13	169
27	5	15	17	10	100
28	5	17	18	12	144
29	2	14	18	12	144
30	4	15	19	11	121
31	3	17	19	14	196
32	6	17	19	11	121
33	5	17	18	12	144
34	4	18	19	14	196
35	3	16	18	13	169
36	5	16	18	11	121
37	4	16	18	12	144
38	5	17	19	12	144
39	6	18	19	12	144
40	6	18	19	12	144
41	6	18	19	12	144
42	5	16	17	11	121
43	7	18	19	11	121
44	7	18	20	11	121
45	8	18	20	10	100
46	7	17	18	10	100
47	6	17	18	11	121
48	6	17	18	11	121
49	5	16	19	11	121
50	4	15	16	11	121
51	3	15	17	12	144
รวม	259	832	915	573	6561

หมายเหตุ : อัตราและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ล = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

$$\bar{X}_n = \frac{259}{51} = 5.08$$

$$\bar{X}_a = \frac{832}{51} = 16.31$$

$$\bar{X}_u = \frac{915}{51} = 17.94$$

$$E_1 = \frac{17.94}{20} \times 100 = 89.70$$

$$E_2 = \frac{16.31}{20} \times 100 = 81.55$$

$$\text{ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ} = E_1 / E_2 = \frac{89.70}{81.55} = 1.10$$

$$\text{ร้อยละความก้าวหน้า} = \frac{16.31 - 5.08}{20} \times 100 = 56.15$$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{n \sum D^2 - (\sum D)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{573}{\sqrt{\frac{(51 \times 6561) - (573)^2}{51-1}}}$$

$$t = 51.1110$$

บทปฎิบัติการ เรื่อง โปรดีน

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
1	6	16	18	10	100
2	5	15	18	10	100
3	6	16	18	10	100
4	5	16	17	11	121
5	6	15	18	19	81
6	5	16	18	11	121
7	7	18	19	11	121
8	6	16	17	10	100
9	4	15	16	11	121
10	3	15	16	12	144
11	5	15	18	10	100
12	5	16	18	11	121
13	4	15	16	11	121
14	4	15	16	11	121
15	6	16	17	10	100
16	6	16	17	10	100
17	7	17	18	10	100
18	7	17	18	10	100
19	6	16	17	10	100
20	6	16	17	10	100
21	7	17	18	10	100
22	7	16	17	9	81
23	6	17	18	11	121
24	6	17	18	11	121
25	4	17	18	13	169

คันที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
26	4	17	19	13	169
27	4	17	16	13	169
28	5	15	18	10	100
29	5	16	18	11	121
30	5	16	17	11	121
31	6	17	17	11	121
32	6	17	18	11	121
33	6	16	18	10	100
34	7	15	16	8	64
35	7	16	17	9	81
36	7	16	18	9	81
37	6	16	18	10	100
38	4	15	17	11	121
39	4	15	18	11	121
40	4	16	17	12	144
41	3	16	18	13	169
42	3	16	18	13	169
43	4	15	18	12	144
44	5	15	17	10	100
45	5	15	17	10	100
46	6	16	17	10	100
47	4	15	17	11	121
48	6	15	17	9	81
49	7	18	17	11	121
50	6	18	19	12	144
51	5	16	19	11	121
รวม	273	816	838	544	5868

หมายเหตุ : อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ด = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

$$\bar{X}_n = \frac{273}{51} = 5.35$$

$$\bar{X}_a = \frac{816}{51} = 16.00$$

$$\bar{X}_u = \frac{838}{51} = 16.43$$

$$E_1 = \frac{16.43}{20} \times 100 = 82.15$$

$$E_2 = \frac{16.00}{20} \times 100 = 80.00$$

$$\text{ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ} = E_1 / E_2 = \frac{82.15}{80.00} = 1.03$$

$$\text{ร้อยละความก้าวหน้า} = \frac{16.00 - 5.35}{20} \times 100 = 53.25$$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{n \sum D^2 - (\sum D)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{544}{\sqrt{\frac{(51 \times 5868) - (544)^2}{51-1}}}$$

$$t = 66.6395$$

บทปฎิบัติการ เรื่อง สิพิດ

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
1	5	15	16	10	100
2	6	16	17	10	100
3	6	17	18	11	121
4	5	16	18	11	121
5	4	15	18	11	121
6	5	16	17	11	121
7	7	18	19	11	121
8	7	18	20	11	121
9	7	19	20	12	144
10	5	18	19	13	169
11	5	18	19	13	169
12	5	18	19	13	169
13	4	16	18	12	144
14	4	16	18	12	144
15	3	16	17	13	169
16	5	17	18	12	144
17	6	17	18	11	121
18	5	18	17	13	169
19	4	16	18	12	144
20	3	16	19	13	169
21	4	16	18	12	144
22	3	15	16	12	144
23	4	16	17	12	144
24	5	15	18	10	100
25	6	17	18	11	121

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
26	6	17	18	11	121
27	6	17	19	11	121
28	5	17	18	12	144
29	6	18	19	12	144
30	5	15	16	10	100
31	4	16	16	12	144
32	3	15	16	12	144
33	4	14	15	10	100
34	5	15	16	10	100
35	6	16	17	10	100
36	6	17	18	11	121
37	5	18	18	13	169
38	4	15	16	11	121
39	5	16	16	11	121
40	5	16	17	11	121
41	6	17	18	11	121
42	6	18	19	12	144
43	4	17	17	13	169
44	4	17	18	13	169
45	3	16	17	13	169
46	3	16	16	13	169
47	4	15	16	11	121
48	4	15	16	11	121
49	6	16	17	10	100
50	6	16	17	10	100
51	4	15	16	11	121
รวม	248	835	892	587	6809

หมายเหตุ : อักษรและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

ก = คะแนนก่อนเรียน

ด = คะแนนหลังเรียน

น = คะแนนกระบวนการ

$$\bar{X}_n = \frac{248}{51} = 4.86$$

$$\bar{X}_d = \frac{835}{51} = 16.37$$

$$\bar{X}_u = \frac{892}{51} = 17.49$$

$$E_1 = \frac{17.49}{20} \times 100 = 87.45$$

$$E_2 = \frac{16.37}{20} \times 100 = 81.85$$

$$\text{ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ} = E_1 / E_2 = \frac{87.45}{81.85} = 1.07$$

$$\text{ร้อยละความก้าวหน้า} = \frac{16.37 - 4.86}{20} \times 100 = 57.55$$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{n \sum D^2 - (\sum D)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{587}{\sqrt{\frac{(51 \times 6809) - (587)^2}{51-1}}}$$

$$t = 80.0289$$

บทปฎิบัติการ เรื่อง กรณีนิวคลีอิก

คณที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
1	5	16	18	11	121
2	5	15	18	10	100
3	4	17	17	13	169
4	4	17	17	13	169
5	6	16	18	10	100
6	6	15	18	9	81
7	5	16	18	11	121
8	5	18	18	13	169
9	4	16	17	12	144
10	3	15	17	12	144
11	4	14	18	10	100
12	5	16	18	11	121
13	6	18	18	12	144
14	5	18	17	13	169
15	5	15	17	10	100
16	5	16	17	11	121
17	6	17	18	11	121
18	6	17	18	11	121
19	6	17	19	11	121
20	4	16	18	12	144
21	4	16	17	12	144
22	5	15	18	10	100
23	5	15	18	10	100
24	5	16	18	11	121
25	5	17	18	12	144

คนที่	คะแนน ก่อนเรียน (20)	คะแนน หลังเรียน (20)	คะแนน กระบวนการ (20)	D	D*D
26	6	17	19	11	121
27	6	17	19	11	121
28	6	17	18	11	121
29	5	16	17	11	121
30	4	16	17	12	144
31	3	15	18	12	144
32	4	14	18	10	100
33	6	18	17	12	144
34	5	17	17	12	144
35	4	18	18	14	196
36	3	16	19	13	169
37	4	15	16	11	121
38	5	16	16	11	121
39	7	18	19	11	121
40	7	18	19	11	121
41	7	18	19	11	121
42	6	18	20	12	144
43	6	18	18	12	144
44	6	17	19	12	144
45	5	17	17	12	144
46	5	16	18	11	121
47	5	16	18	11	121
48	5	16	19	11	121
49	6	17	18	11	121
50	6	17	17	11	121
51	6	17	16	11	121
รวม	261	839	909	579	6621

หมายเหตุ : อัตราและความหมายที่ใช้กับสัญลักษณ์ทางสถิติ

\bar{x} = คะแนนก่อนเรียน

\bar{d} = คะแนนหลังเรียน

n = คะแนนกระบวนการ

$$\bar{X}_n = \frac{261}{51} = 5.12$$

$$\bar{X}_a = \frac{839}{51} = 16.45$$

$$\bar{X}_u = \frac{909}{51} = 17.82$$

$$E_1 = \frac{17.82}{20} \times 100 = 89.10$$

$$E_2 = \frac{16.45}{20} \times 100 = 82.25$$

$$\text{ประสิทธิภาพของบทปฏิบัติการ} = E_1 / E_2 = \frac{89.10}{82.25} = 1.08$$

$$\text{ร้อยละความก้าวหน้า} = \frac{16.45 - 5.12}{20} \times 100 = 56.65$$

$$t = \frac{\sum D}{\sqrt{\frac{n \sum D^2 - (\sum D)^2}{n-1}}}$$

$$t = \frac{579}{\sqrt{\frac{(51 \times 6621) - (579)^2}{51-1}}}$$

$$t = 83.0540$$

ภาคผนวก ฯ

เครื่องมือวิจัย

แบบบันทึกผลคะแนนประเมินบทปฎิบัติการ (สำหรับนักศึกษา)

คำชี้แจง : หลังจากนักศึกษาเรียนจบบทปฎิบัติการนี้แล้ว โปรดแสดงความคิดเห็นโดยทำเครื่องหมาย ในช่องที่ตรงกับความคิดเห็นของท่านมากที่สุด เพียงช่องเดียว

หัวข้อ	ระดับความคิดเห็น					
	5	4	3	2	1	\bar{X}
1. วัตถุประสงค์ของบทปฎิบัติการชัดเจน เข้าใจง่าย						
2. ขั้นตอนในการใช้บทปฎิบัติการบอกไว้ชัดเจน						
3. ท่านมีโอกาสใช้เครื่องมือในการทดลอง						
4. ท่านเกิดความสนุกเพลิดเพลินในการทดลอง						
5. บทปฎิบัติการนี้ช่วยให้ท่านเกิดการเรียนรู้ อย่างใช้ความคิดและเหตุผล						
6. การนำเสนอเนื้อหาง่าย กระชับ และชัดเจนดี						
7. ท่านเข้าใจเนื้อหาที่เสนอไว้ในชุดนี้ดี						
8. เนื้อหาไม่ยากเกินไป						
9. เนื้อหาไม่ยาวเกินไป						
10. สัพท์ที่ใช้ไม่ยากเกินไป						
11. รูปภาพประกอบช่วยให้ท่านเกิดความ เข้าใจดียิ่งขึ้น						
12. คำถานที่ใช้เข้าใจง่ายและสามารถหาคำอื่นได้						
13. คำสั่งหรือคำชี้แจงในบทปฎิบัติการเข้าใจง่าย และท่านปฏิบัติได้						
14. เวลาที่กำหนดให้พอดี ไม่มากหรือน้อยเกินไป						
15. แบบประเมินดูองเหมาะสม						

หมายเหตุ : 5 = มากที่สุด 4 = มาก 3 = ปานกลาง 2 = น้อย 1 = น้อยที่สุด

ภาคผนวก ค

ชุดปฏิบัติการวิชาชีวเคมี 2

ชุดปฏิบัติการวิชาชีวเคมี 2

BIOCHEMISTRY LABORATORY 2

รองศาสตราจารย์กิติวราณ บุญยะรังส์

โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สถาบันราชภัฏพิษณุโลก

คำนำ

ชุดปฏิบัติการวิชาชีวเคมีเล่มนี้ เรียบเรียงขึ้นเพื่อใช้ประกอบการเรียนการสอน
ภาคปฏิบัติการ ในรายวิชาปฏิบัติการชีวเคมี 2 (4023502) ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตของ
สถาบันราชภัฏ พุทธศึกษา 2543 โดยแบ่งการทดลองเป็น ๕ บทปฏิบัติการ ซึ่งปฏิบัติการเกี่ยว
กับเอนไซม์ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ลิพิด และกรดนิวคลีอิก

หวังว่าชุดปฏิบัติการนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเรียนการสอนในรายวิชาดังกล่าว

ฤทธิวรรณ บุญยะรัตน์

ธันวาคม 2545

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	๑
บทปฏิบัติการที่ ๑ ปฏิบัติการเรื่อง เอนไซม์	๑
บทนำ	๑
การทดลองที่ ๑.๑ การทดสอบเอนไซม์ยูโรเอส	๗
การทดลองที่ ๑.๒ วิธีหาอัตราความเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลส	๘
การทดลองที่ ๑.๓ ผลการเปลี่ยนแปลง pH และความเข้มข้นของซับสเตรต ต่อปฏิกิริยาเอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลส	๑๓
การทดลองที่ ๑.๔ การยับยั้งเอนไซม์โดยมีลักษณะสับประดิษฐ์	๑๖
บันทึกผลการทดลอง	๑๙
บทปฏิบัติการที่ ๒ ปฏิบัติการเรื่อง คาร์โบไฮเดรต	๓๘
บทนำ	๓๘
การทดลองที่ ๒.๑ แคแทบอลิชีนของซูโครสในสภาวะขาดออกซิเจน	๔๑
การทดลองที่ ๒.๒ การศึกษาปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ซักรซิเนตดีไซโอดิจินส...	๔๓
การทดลองที่ ๒.๓ การแยกและหาปริมาณไกลด์โคลเจนจากตับ	๔๕
บันทึกผลการทดลอง	๔๙
บทปฏิบัติการที่ ๓ ปฏิบัติการเรื่อง โปรตีน	๕๕
บทนำ	๕๕
การทดลองที่ ๓.๑ การแยกและศึกษาคุณสมบัติของไซโตโกรಮซีจากหัวใจหมู..	๕๕
การทดลองที่ ๓.๒ คุณสมบัติของฮีโมโกลบิน	๖๐
บันทึกผลการทดลอง	๖๘
บทปฏิบัติการที่ ๔ ปฏิบัติการเรื่อง ลิพิด	๗๖
บทนำ	๗๖
การทดลองที่ ๔.๑ การสกัดและวิเคราะห์ลิพิดที่ได้จากตับด้วยวิธี โกรมาโทกราฟี	๗๗
บันทึกผลการทดลอง	๘๑

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทปฏิบัติการที่ 5 ปฏิบัติการเรื่อง กรณีวินาศี	83
บทนำ	83
การทดลองที่ 5.1 การสกัด DNA จากเม็ดเลือดแดง ไก่	84
การทดลองที่ 5.2 การหาปริมาณ DNA ด้วยวิธีไดฟินิลามีน	86
การทดลองที่ 5.3 การหาความหนืดของ DNA	89
การทดลองที่ 5.4 การหาเบสส่วนประกอบของ DNA	92
การทดลองที่ 5.5 อะก้าโรสเจลอะลีกโตรโฟริซิส	94
บันทึกผลการทดลอง	104

บทนำ

ข้อแนะนำทั่วไปในการปฏิบัติการทางชีวเคมี

ข้อปฏิบัติ

เพื่อให้มีความเป็นระเบียบ ได้ผลการทดลองที่ถูกต้อง และป้องกันอุบัติเหตุอันอาจเกิดขึ้น ได้ในห้องปฏิบัติการ นักศึกษาต้องปฏิบัติตามกฎ ข้อแนะนำและข้อห้ามต่อไปนี้โดยเคร่งครัด

1. ก่อนเข้าห้องปฏิบัติการ ต้องอ่านและทำความเข้าใจในเรื่องที่จะทำการทดลอง อี่างดี และควรวางแผนการทำงานไว้เป็นขั้นตอน เพื่อให้สามารถทำการทดลองเสร็จภายในเวลาที่กำหนด

2. อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในห้องทดลองต้องแน่ใจว่าสะอาด และเมื่อเสร็จสิ้น การทดลองต้องคืนสิ่งของทุกชนิดในสภาพที่สะอาดเรียบร้อย

3. สารเคมีต่าง ๆ ที่เทอกจากขวดแล้วห้ามเทคืนลงในขวดเดิมเป็นอันขาด นอกจากนี้ห้ามสับเปลี่ยนจุกขวดน้ำยา ปีเปตต์ หลอดหยด ช้อนตักสาร ที่วางประจำไว้สำหรับแต่ละขวด เพราะจะทำให้สารเคมีที่อยู่ในขวดไม่บริสุทธิ์ พร้อมทั้งห้ามเคลื่อนย้ายขวดสารเคมีส่วนรวมออกจากที่วางไว้

4. ในการทดลองที่ใช้น้ำยาที่ร้ายแรงและเป็นพิษ เช่น คลอร์ฟอร์ม (chloroform) เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) ฯลฯ หรือการทดลองใด ๆ ที่ก่อให้เกิดแก๊สพิษ ควรทำในตู้ควัน

5. วัตถุที่เป็นของแข็งซึ่งไม่ใช้แล้ว เช่น ก้านไม้ขีดไฟ เศษกระดาษ หรือของแข็งอื่น ๆ ห้ามทิ้งลงในอ่าง ต้องทิ้งไว้ในที่ทิ้งเศษผงซึ่งเตรียมไว้ให้อีน ๆ

6. อย่าลืมทำความสะอาดโดยปฏิบัติการ อ่างน้ำ และบริเวณใกล้เคียงเมื่อเลิกทำการทดลอง

7. ก่อนออกจากห้องปฏิบัติการให้ตรวจสอบว่าได้ปิดก๊อกน้ำ ก๊อกแก๊ส ไฟฟ้า และพัดลมเรียบร้อยแล้ว

อุบัติเหตุและการป้องกัน

ในห้องปฏิบัติการ มีสารเคมีหลายชนิดที่เป็นพิษ ซึ่งจำเป็นต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ ดังต่อไปนี้

1. การปฏิบัติงานน้ำยาเคมี ต้องไม่ใช้ปากดูด เพราะน้ำยาเคมีหลายชนิด เช่น กรดเข้มข้น สารพิษใช้ยาในเด็กฯลฯ เป็นอันตรายถึงชีวิตได้ ให้ใช้ถุงยางสำหรับดูดน้ำยาเหล่านี้แทน

2. เวลาจุดตะเกียงในห้องปฏิบัติการ ควรระวังไม่ให้อุบัติสาร์ไวไฟ เช่น อีเทอร์ (ether) และแอลกอฮอล์ (alcohol) ฯลฯ สำหรับการจุดตะเกียงบุนเซ่น (bunsen burner) ให้จุดไม่มีขิด ก่อนแล้วจึงเปิดแก๊ส

3. เมื่อผิวนองถูกกรดหรือด่างที่เข้มข้นต้องรีบล้างด้วยน้ำมาก ๆ และทำให้เป็นกลางทันที ถ้าเป็นกรดให้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate ; Na_2CO_3) 2 ช้อนโต๊ะ ระยะน้ำ 473 cm^3 ถ้าเป็นด่างให้ล้างด้วยกรดแอดซีติก (acetic acid ; CH_3COOH) 2 เปอร์เซ็นต์

4. ถ้ากรดหรือไบรอมีน (bromine) เข้าตาให้ล้างด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate ; NaHCO_3) ถ้าด่างเข้าตาล้างด้วยสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์กรดโบริก (boric acid ; H_3BO_3)

5. ถ้าสารที่ร้อนหรืออันตรายเข้าตา ให้รีบล้างด้วยน้ำทันทีและลีบตาในน้ำสะอาดจำนวนมาก ๆ อย่างน้อย 2-3 นาทีก่อนนำส่งแพทย์

6. ถ้าถูกไฟลวกอย่าใช้น้ำล้าง ให้ใช้ยาทาแพลไฟไหม้ น้ำร้อนลวกแทน ตามที่กล่าวมานี้เป็นอุบัติเหตุเล็ก ๆ น้อย ๆ อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดอุบัติเหตุไม่ว่ากรณีใด ๆ จะต้องรายงานให้อาจารย์ทราบทันที

การทำความสะอาดเครื่องแก้ว

1. ล้างเครื่องแก้วทุกชนิดทันทีที่เสร็จการทดลอง หากปล่อยทิ้งไว้จนแห้งจะทำให้ล้างออกยาก

2. การล้างเครื่องแก้วด้วยผงซักฟอกและน้ำพร้อมใช้เบรนชัค เป็นวิธีที่ใช้กันตามปกติ และได้ผลดี เสร็จแล้วล้างด้วยน้ำก่อนล้างตามอีกรั้งหนึ่ง และผิงให้แห้ง

แต่หลอดทดลองเฉพาะสำหรับใส่สารที่จะวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ห้ามใช้เบรนล้างโดยเด็ดขาด พร้อมหั้งห้ามน้ำหลอดนี้ไว้ในน้ำเดือด ให้ใช้สามีพันปลาญี่ปุ่นในการทำความสะอาดแทน

3. เครื่องแก้วที่สำคัญกากน ไม่สามารถล้างออกด้วยผงซักฟอกพร้อมใช้ແປງช่วยแล้วให้แข็งแก้วไว้ในสารละลายของกรดไดโกรเมต (acid dichromate) ซึ่งประกอบด้วย โพแทสเซียมไดโกรเมต (potassium dichromate) 10 g กรดซัลฟิวริก (sulphuric acid) เป็นขัน 25 cm³ และน้ำกลั่น 75 cm³ อายุน้อย 1 ศีน ก่อนจะนำมาล้างด้วยผงซักฟอกอีกทีหนึ่งหลังจากล้างผงซักฟอกออกด้วยน้ำประปานะจะดีแล้ว ต้องล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งและผิงให้แห้ง

สิ่งของที่นักศึกษาต้องนำมา用เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. เสื้อกลุ่มปฏิบัติการ
2. ผ้าสำหรับเช็ดทำความสะอาดโต๊ะปฏิบัติการ
3. สมุดบันทึกผลการทดลอง

การเขียนรายงานการทดลอง

เมื่อนักศึกษาได้ทำการทดลองเสร็จเรียบร้อยแล้ว จำเป็นที่จะต้องเขียนรายงานการทดลอง ซึ่งมีรูปแบบที่ใช้กันทั่วไปดังต่อไปนี้

1. บทนำ
2. วัตถุประสงค์ของการทดลอง
3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้
4. วิธีการทดลอง
5. ผลการทดลอง
6. วิจารณ์
7. สรุป

สำหรับการทดลองที่นักศึกษาทำในห้องปฏิบัติการนั้น ในหนังสือนี้จะบอกหัวข้อ 1 ถึง 4 ไว้แล้ว นักศึกษาจึงรายงานผลการทดลอง (ข้อ 5) ต่อไปได้เลย ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้
ผลการทดลอง ให้เขียนผลการทดลองในสมุดบันทึกหรือในแบบฟอร์มที่กำหนดให้ทันทีที่ทำการทดลองเสร็จ เพื่อป้องกันความผิดพลาดและสับสน การเขียนผลการทดลองนั้นให้เขียนสิ่งที่สังเกตเห็นจากการทดลองจริง ๆ ไม่ใช่เขียนสิ่งที่คาดว่าจะเห็นตามทฤษฎีที่กล่าวไว้ วิจารณ์ การวิจารณ์ผลการทดลองนั้น ไม่ควรเขียนสิ่งที่ซ้ำกับผลการทดลอง ควรถ้าศึกษาความรู้ทางทฤษฎีเข้าใจหายาประกอบอย่างย่อ ๆ ว่าผลการทดลองที่ทำได้ช่วยส่งเสริมหรือ

ขัดแย้งกับทฤษฎีอย่างไร ถ้าผลที่ได้ไม่ตรงกับทฤษฎีก็ควรศึกษาคำอธิบายที่น่าจะเป็นสาเหตุของ การขัดแย้งมาประกอบคำวิจารณ์ด้วย ข้อจำกัดของวัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้เป็นอย่างไร ตลอดจนข้อเสนอแนะ

สรุป ให้เขียนสรุปการทดลองอย่างย่อที่สุดว่า การทดลองนั้นบรรลุวัตถุประสงค์ หรือไม่ ถ้าไม่ ท่านคิดว่าเป็นพระอะไรให้บอกเฉพาะเหตุผลที่สำคัญ ท่านมีข้อเสนอแนะเพื่อ ปรับปรุงให้ดีขึ้นอย่างไรหรือไม่

บทปฎิบัติการที่ 1

ปฏิบัติการเรื่อง เอนไซม์

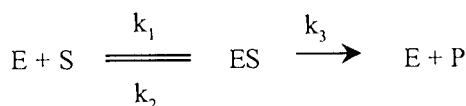
วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาจนศาสตร์ของเอนไซม์
- เพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

บทนำ

เอนไซม์ คือ โปรตีนที่เป็นตัวเร่งทางชีวภาพ (biological catalyst) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต ปฏิกิริยาเหล่านี้ทำให้สิ่งมีชีวิตเจริญเติบโตและสามารถซ่อนแซ่อนส่วนที่สักหรอได้ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญทำให้ชีวิตดำเนินอยู่ได้

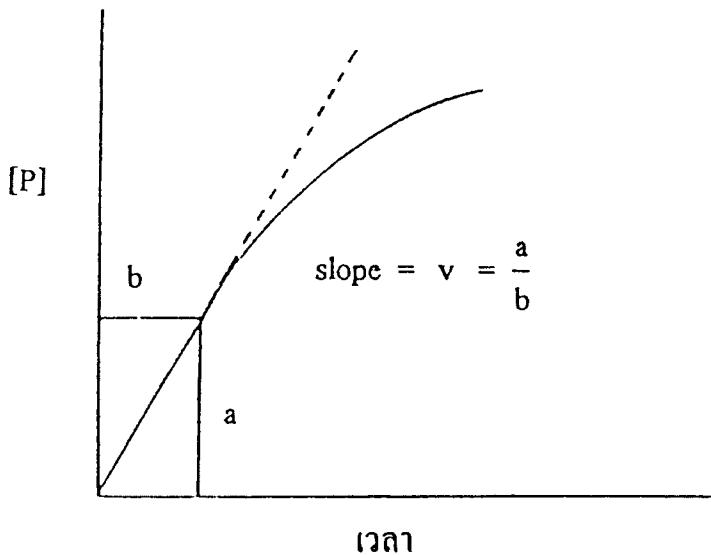
กลไกการทำงานของเอนไซม์ทั่วไปคือ เอนไซม์จะรวมตัวกับสารตั้งต้น หรือเรียกว่าซับสเตรต (substrate ; S) ได้เป็นสารเชิงซ้อนเอนไซม์ซับสเตรต (enzyme – substrate ; ES) ซึ่งมีพลังงานสูงกว่าซับสเตรตอย่างเดียว ทำให้ ES เกิดปฏิกิริยาให้ผลผลิต (product ; p) ได้เร็ว ปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังสมการ



จนศาสตร์ของเอนไซม์และปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

1. การวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยา

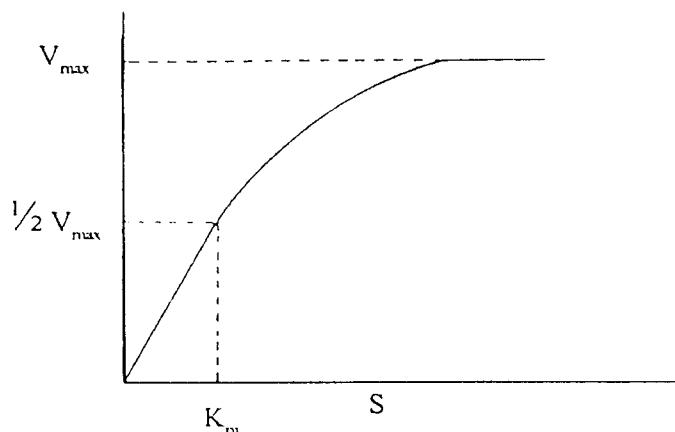
การวัดอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยทั่ว ๆ ไป อาจทำได้โดยวัดความเข้มข้นของซับสเตรตที่ลดลง หรือผลผลิตที่เกิดขึ้นที่ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง รูปที่ 1.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของผลผลิตกับเวลา สำหรับปฏิกิริยาเอนไซม์หรือปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง จะเห็นได้ว่า ระยะแรกจะได้เส้นตรง แสดงว่าปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ แต่ระยะหลังการเพิ่มปริมาณผลผลิตช้าลงเรื่อย ๆ และในที่สุดอาจหยุดเลย ดังนั้นการวัดอัตราความเร็วของปฏิกิริยาจะใช้ช่วงแรกของกราฟที่เป็นเส้นตรง ซึ่งเรียกว่า อัตราความเร็วเริ่มต้น (initial velocity ; v)



รูปที่ 1.1 การวัดอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

2. ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซับสเตรต

เมื่อกำหนดให้ปัจจัยต่าง ๆ ในการทดลองคงที่แล้ว คือ v เพิ่มปริมาณของซับสเตรตขึ้น พบว่าในช่วงแรกเมื่อความเข้มข้นของซับสเตรตยังต่ำอยู่ อัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตถึงระดับหนึ่ง จะทำให้ได้ความเร็วสูงสุด (maximum velocity ; V_{max}) อัตราเร็วไม่สามารถเพิ่มได้อีก แม้ว่าจะเพิ่มซับสเตรตอีกตาม ดังรูป



รูปที่ 1.2 ผลของการเปลี่ยนความเข้มข้นของซับสเตรตต่ออัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

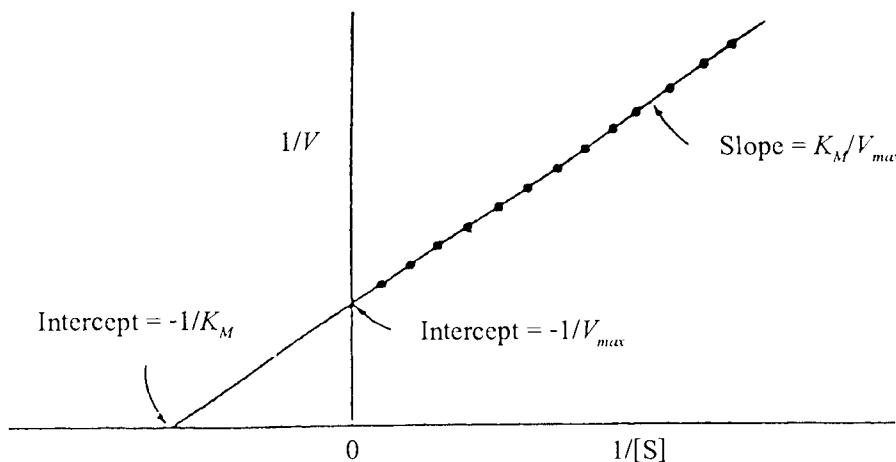
ลักษณะของกราฟเป็นแบบไฮเพอร์โบลาร์ (hyperbolar) ความเข้มข้นของซับสเตรตที่ให้ความเร็วสูงสุดนี้ เรียกว่า ความเข้มข้นอิ่มตัวของซับสเตรต ความเข้มข้นของซับสเตรตที่ทำให้ได้ความเร็วเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด เรียกว่า K_m หรือ ค่าคงที่ มิเคลลิสมเคน (Michaelis – Menten constant) เราสามารถเขียนสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า V , V_{max} , K_m และ $[S]$ (ความเข้มข้นของซับสเตรต) ได้ดังนี้

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

สมการนี้คือ สมการ มิเคลลิสมเคน(Michaelis – Menten equation) จากสมการของ มิเคลลิสมเคน เราเขียนเป็นส่วนกลับ (reciprocal) ของ v จะได้สมการอีกรูปหนึ่ง เรียกว่า สมการ ไลวีเวอร์เบอร์ก (Lineweaver – Burk equation) ดังนี้

$$\frac{1}{v} = K_m/V_{max} \cdot \frac{1}{[S]} + 1/V_{max}$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง $1/v$ กับ $1/[S]$ จะได้กราฟเส้นตรงมีค่าความลาด (slope) เท่ากับ K_m/V_{max} จุดตัด (entercept) บนแกนตั้งคือ $1/V_{max}$ และจุดตัดบนแกนนอนเป็น $-1/K_m$

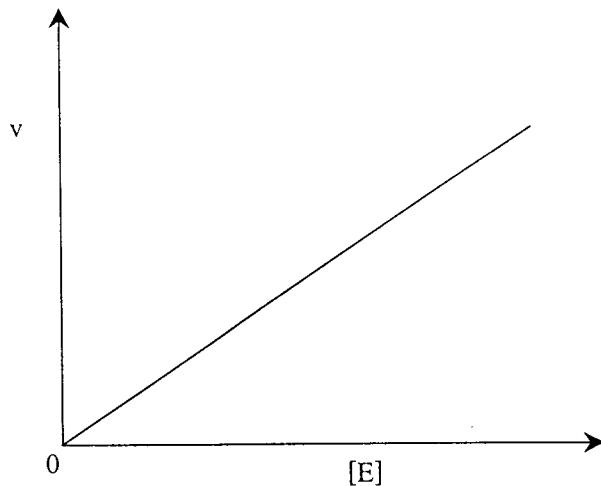


รูปที่ 1.3 กราฟของสมการ ไลวีเวอร์เบอร์ก

จากราฟเส้นตรงของ ไลวีเวอร์เบอร์ก ทำให้การหาค่า K_m และ V_{max} แน่นอนจากจุดตัดที่แกนนอนและแกนตั้ง

3. ผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนไซม์

เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของซับสเตรต อัตราความเร็วเริ่มต้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนไซม์ ดังรูป

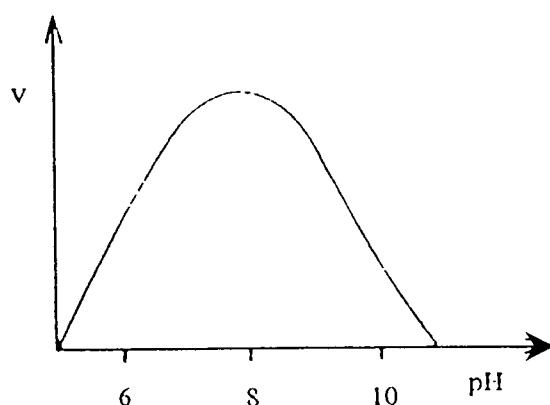


รูปที่ 1.4 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH

4. ผลของการเปลี่ยนแปลง pH

เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่า pH ที่ทำงานได้ดีที่สุด ค่า pH นี้เรียกว่า ค่า pH ที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) ส่วนใหญ่ pH ที่เหมาะสมที่สุดจะอยู่ระหว่าง pH 5 – pH 9 แต่อาจมีค่าต่ำมากหรือสูงมาก สำหรับเอนไซม์บางชนิด เช่น เพบซิน (pepsin) pH \approx 2 และคาโนน์ฟอสฟ่าเทส (alkaline phosphatase) \approx 10 เป็นต้น

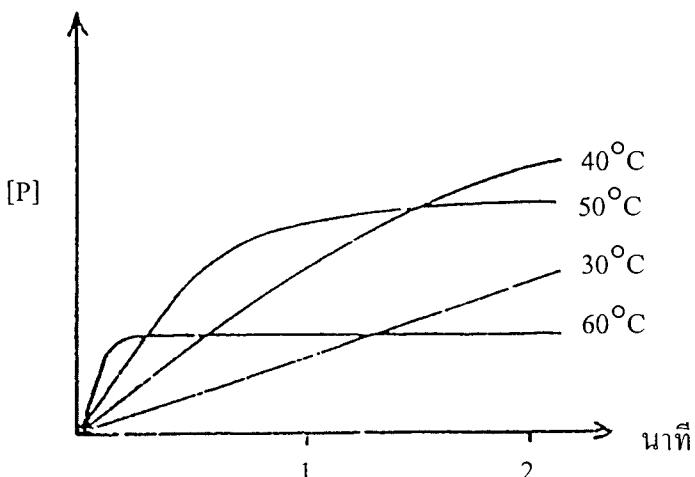
กราฟที่แสดงการเปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์กับ pH โดยมากจะมีลักษณะคล้ายรูประฆัง ดังรูป



รูปที่ 1.5 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH ต่ออัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

5. ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

สำหรับปฏิกิริยาเคมีทั่ว ๆ ไป เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจะเพิ่มอัตราความเร็วของปฏิกิริยา เพราะว่าที่อุณหภูมิสูงขึ้นทำให้โมเลกุลของสารที่ทำปฏิกิริยามีพลังงานมากขึ้น และจำนวนโมเลกุลที่มีพลังงานเพียงพอสำหรับเข้าสู่สภาพเปลี่ยนก็จะมากขึ้นด้วย แต่สำหรับปฏิกิริยาเอนไซม์ เอนไซม์ส่วนใหญ่จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิไม่เกิน $40 - 45^{\circ}\text{C}$ ทั้งนี้เพราะว่าที่อุณหภูมิสูง ๆ เอนไซม์จะถูกแปลงสภาพ (denature)



รูปที่ 1.6 กราฟแสดงอัตราความเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

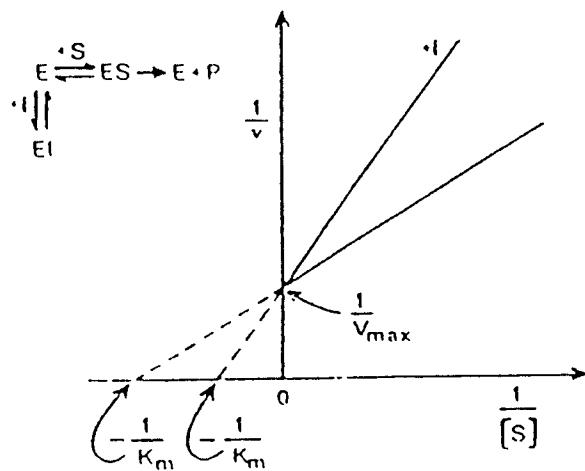
6. การขับยั้งปฏิกิริยา

สารบางชนิดทำให้ปฏิกิริยาเอนไซม์ดำเนินช้าลง หรือหยุดทำงาน เรียกว่าตัวขับยั้ง (inhibitor) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

ก. ตัวขับยั้งแบบไม่ทวนกลับ (irreversible inhibitor) ตัวขับยั้งประเภทนี้จะจับกับเอนไซม์โดยพันธะโคลเวเลนต์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถร่วงปฏิกิริยาได้ และไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพที่ร่วงปฏิกิริยาได้อีก

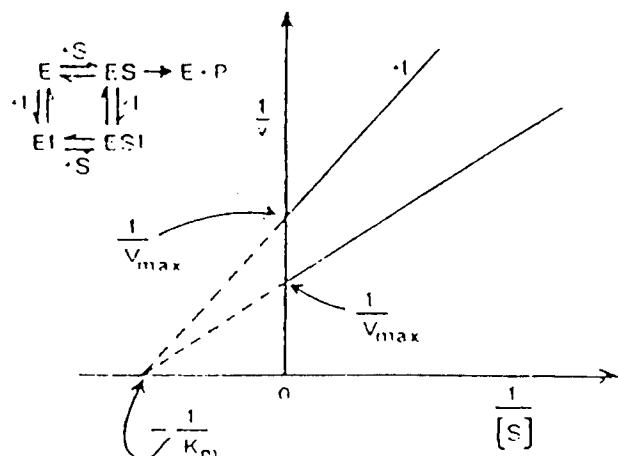
ข. ตัวขับยั้งแบบทวนกลับ (reversible inhibitor) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

- ตัวขับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ตัวขับยั้งชนิดนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับซับสเตรต จึงสามารถจับกับเอนไซม์ที่บริเวณร่วงได้ ทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างตัวขับยั้งกับซับสเตรต ในการที่จะจับกับเอนไซม์ที่บริเวณร่วงเดียวกัน มีผลทำให้ค่า K_m ของซับสเตรตสูงกว่าที่เป็นจริง แต่ไม่มีผลต่ออัตราความเร็วสูงสุด (V_{max}) ดังรูป



รูปที่ 1.7 กราฟจากสมการ ไลวีเวอร์เบอร์กของปฏิกิริยาเอนไซม์
เมื่อมีตัวบั้งขั้งแบบแข่งขัน

- ตัวบั้งขั้งแบบไม่แข่งขัน (non competitive inhibitor) ตัวบั้งขั้งชนิดนี้มีโครงสร้างไม่เหมือนซับสเตรต จึงไม่สามารถจับกับเอนไซม์บริเวณเร่งได้ แต่จะจับกับเอนไซม์บริเวณอื่น ถึงแม้ว่าจะมีซับสเตรตจับอยู่ ทำให้เกิดมิทั้งสารเชิงซ้อน EI และ ESI ซึ่งไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ เนื่องจากตัวบั้งขั้งประเภทนี้ไม่ได้จับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ จึงไม่มีผลต่อค่า K_m ของซับสเตรต แต่จะทำให้ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาไม่ค่าต่ำกว่าที่ควร ดังรูป

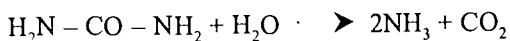


รูปที่ 1.8 กราฟจากสมการของ ไลวีเวอร์เบอร์ก ของปฏิกิริยาเอนไซม์
เมื่อมีตัวบั้งขั้งแบบไม่แข่งขัน

การทดลองที่ 1.1 การทดสอบเอนไซม์ยูเรอส (urease)

หลักการ

เอนไซม์ยูเรอสพบมากในถั่วบางชนิด เอนไซม์นี้ร่วงปฏิกิริยาการสลายตัวของยูเรีย คือบัน้ำให้เก๊สแอมโมเนียกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ดังสมการ



เมื่อแอมโมเนียละลายน้ำจะแตกตัวให้ NH_4^+ กับ OH^- ซึ่งจะทำให้สารละลายเป็นด่าง ในการทดลองนี้จึงทดสอบเอนไซม์ยูเรอสในแมล็ดถั่วโดยใช้ฟินอล์ฟทาลีนเป็นตัวบ่ง pH เพื่อสังเกตคุณภาพเพิ่มของ pH ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์

สารเคมี

- แมล็ดถั่วสด ๆ ควรใช้มีลักษณะเหลืองและเมล็ดแตกไม่สัด อาจเลือกใช้เมล็ดถั่วอื่น ๆ อีก 2 – 3 ชนิด เช่น ถั่วแดง ถั่วคำ ถั่วเขียว
- สารละลายยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์
- สารละลายฟินอล์ฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์

วิธีทดลอง

- นำเมล็ดถั่วแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบประมาณ 2 g บดให้ละเอียดแล้วเทลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นลงไป 8 cm^3 เข่าแรง ๆ 1 – 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 – 10 นาที ให้เศษถั่วนอนกัน เก็บสารละลายน้ำถั่วไว้สำหรับใช้เป็นสารละลายเอนไซม์
- เตรียมหลอดทดลองสองหลอดสำหรับน้ำถั่วแต่ละชนิด บรรจุด้วยสารละลาย

ดังในตาราง

สาร	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2
ยูเรีย	2 cm^3	-
น้ำกลั่น	-	2 cm^3
ฟินอล์ฟทาลีน	3 หยด	3 หยด
น้ำถั่ว	5 หยด	5 หยด

โดยเติมน้ำดื่มเป็นอันดับสุดท้าย เขย่าให้สมกันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วเปรียบเทียบสีในหลอดทดลองสำหรับถัวเดลชนิด บันทึกผลการทดลอง

3. นำน้ำดื่มแต่ละชนิดประมาณ 2 cm^3 ไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ต่อไปทดสอบเอนไซม์ยูเรออลามิโนทามิวีเดียม บันทึกผลการทดลองเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 2

ตอบคำถามต่อไปนี้

1. อธิบายสาเหตุที่ใช้หลอดที่ 2 เป็นหลอดเปรียบเทียบสี
2. จากผลการทดลองจะสรุปว่าถัวเดลชนิดไหนมีเอนไซม์ยูเรออลามิโนทามิวีเดียม
3. การต้มสารละลายเอนไซม์มีผลอย่างไรต่อความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา

การทดลองที่ 1.2 วิธีทดสอบความเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์แอลฟ้าอะมิเลส (α -amylase)

หลักการ

แบ่งประกอบด้วยพอลิเซ็กค่าไร์ดส่องชนิด คือ อะมิโลส (amylose) และอะมิโลเพกทิน (amylopectin) ทั้งสองชนิดมีหน่วยข่ายเป็นดีกูลโคส ในอะมิโลส ดีกูลโคสจะเชื่อมโยงกันด้วยพันธะแอลฟ้า (1, 4) เป็นเส้นยาวและตรง ส่วนในอะมิโลเพกทินจะมีสายดีกูลโคสชนิดแอลฟ้า (1, 4) หลาຍสายเชื่อมตอกันด้วยพันธะแอลฟ้า (1, 6) เอนไซม์แอลฟ้าอะมิเลสจากน้ำลายสามารถย่อยพันธะแอลฟ้า (1, 4) ในแบงได้ ทำให้เกิดผลผลิตเป็นмолโทส และกลูโคส

ในการวัดอัตราความเร็วของปฏิกิริยา อาจวัดจากอัตราความเร็วของการลดปริมาณแบง หรืออัตราความเร็วของการเพิ่มปริมาณмолโทสกับกลูโคส ในปฏิกิริยานี้ทั้งแบง มอลโทส และกลูโคสต่างไม่มีสี แต่สำหรับแบงเมื่อละลายในบัฟเฟอร์ สารละลายที่ได้จะชุนและทำให้แสงที่ผ่านเข้าไปกระจายออกมากในทิศทางต่าง ๆ จึงสามารถวัดการกระจายแสงได้โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (visible spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 400 nm ส่วนผลผลิตของปฏิกิริยา คือ มอลโทสกับกลูโคสไม่กระจายแสงและไม่ดูดกลืนแสง ต้องทำปฏิกิริยาทั้ง -3, 5- ได้ในโทรศัลไชเลต ให้สารสีน้ำตาลแดง ซึ่งจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm

สารเคมี

1. น้ำลาย เตรียมโดยล้างปากให้สะอาด เก็บน้ำลายในบีเกอร์ที่แห้ง ปิเปตต์น้ำลาย 1 cm^3 ทำให้เข้าจางด้วยน้ำกลั่น 9 cm^3 ผสมให้เข้ากันทั่ว ปิเปตต์น้ำลายที่เข้าจางนี้ 1 cm^3 ใส่ในกระบอกตวง แล้วเข้าจางด้วยน้ำกลั่นจนถึงขีด 50 cm^3 ผสมให้เข้ากันทั่วจะได้น้ำลายเข้าจาง $1 : 500$ เท่า

2. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 mol/dm^3 , pH 6.8 เตรียมโดยละลาย $\text{Na}_2\text{H PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 17.8 g (หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 35.8 g) และ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 13.8 g (หรือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.6 g) ในน้ำกลั่น 900 cm^3 แล้วทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 dm^3 ด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 mol/dm^3 - สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 mol/dm^3 , pH 6.8 เตรียมโดยผสมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 mol/dm^3 , pH 6.8 จำนวน 100 cm^3 , กับน้ำกลั่น 850 cm^3 ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.59 g . ลงไปแล้วทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 dm^3 โดยเติมน้ำกลั่น

4. สารละลายแป้งมัน 2 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยใส่สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 mol/dm^3 - สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 mol/dm^3 , pH 6.8 จำนวน 330 cm^3 ลงในขวดรูปกรวย เติมแป้งมัน 10 g ลงไป แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด ขณะที่ต้มควรคนน้ำแป้งอยู่ตลอด แล้วใช้ปろทัดอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 80°C นำขวดรูปกรวยออกจากอ่างน้ำเดือด แล้วเติมบัฟเฟอร์อีก 170 cm^3 คนให้สมกันทั่ว แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง (สารละลายแป้งมันต้องเตรียมในวันทดลองเก็บค้างคืนไม่ได้) นำไปวัดค่าการกระจายแสงที่ 400 nm . โดยใช้บัฟเฟอร์ตั้งจุดศูนย์ ควรได้ค่ากระจายแสงประมาณ $0.5 - 0.85$ หน่วย จึงจะได้ผลดี ในการทดลองถ้าค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.45 หน่วย ต้องเตรียมใหม่

5. สารละลาย 3, 5 – ไคในโตรชาลิไซเดต เตรียมโดยละลาย $3, 5 – \text{ไคในโตรชาลิ}-\text{ไซเดต}$ 10 g ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 mol/dm^3 200 cm^3 ต่อไปละลาย Rochelle salt (โซเดียมโพแทสเซียมtartrate ; sodium potassium tartrate ; $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 300 g ในน้ำกลั่น 500 cm^3 แล้วค่อยๆ เติมสารละลายนี้ ลงในสารละลาย $3, 5 – \text{ไคในโตรชาลิ}-\text{ไซเดต}$ ขณะที่คนอยู่เรื่อยๆ ทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 dm^3 ด้วยน้ำกลั่น และกรองด้วยกระดาษกรองถ้ามีตะกอน

วิธีทดลอง

ตอนที่ 1 ศึกษาการลดลงของปริมาณแป้ง

1.1 ตั้งความยาวคลื่นในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงไว้ที่ 400 nm และใช้น้ำไฟฟ้า ตั้งจุดศูนย์ปีเปตต์สารละลายแป้ง 2 เปอร์เซ็นต์ 4 cm^3 ลงในหลอดวัดการดูดกลืนแสง (spectronic tube) เติมสารละลายเอนไซม์เจือจาง $1 : 500$ เท่าลงไป 1 cm^3 ผสมให้เข้ากัน แล้วรินจับเวลาทันที นำไปวัดค่าการกระจายแสงทุกๆ ครั้งนาทีเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีในหนึ่งนาทีแรกค่าการดูดกลืนแสงควรจะลด $0.07 - 0.20$ หน่วยต่อนาที ถ้าลดมากกว่าหรือน้อยกว่านั้น ควรเตรียมสารละลายเอนไซม์เจือจางใหม่ให้มีความเข้มข้นลดลงหรือเพิ่มขึ้นตามลำดับ แล้วทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง

1.2 เมื่อได้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้วจากการทดลองข้อ 1.1 ทำการทดลองซ้ำ โดยเปลี่ยนปริมาตรเอนไซม์ที่เติมเป็นอันดับสุดท้าย ดังแสดงในตาราง การทำทีละหลอด

ตารางที่ 1.1 วิธีศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลส

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่				
	1	2	3	4	5
สารละลายแป้งมัน 2 เปอร์เซ็นต์	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
สารละลายโซเดียมฟอสเฟต - โซเดียมคลอไรด์ pH 6.8	1.0	0.75	0.50	0.25	-
เอนไซม์เจือจาง	-	0.25	0.50	0.75	1.0

ตอนที่ 2 ศึกษาการเพิ่มของปริมาณอลิโกรสกับกลูโคส

2.1 ปีเปตต์สารละลายได้ในไทรซาลิไซเลตลงในหลอดทดลอง 5 หลอด ๆ ลักษณะ 0.5 cm^3 แล้วเขียนหมายเลขกำกับไว้

2.2 เตรียมหลอดทดลองอีก 5 หลอด บรรจุสารละลายตามปริมาณในตารางที่ 1.1 โดยเติมเอนไซม์เป็นอันดับสุดท้ายผสมให้เข้ากัน แล้วรินจับเวลาทันที (การใส่เอนไซม์ในแต่ละหลอดในระยะเวลาห่างกัน 1 นาที จะได้ทำการทดลองได้ทันเวลา) ตั้งทิงไว้ที่อุณหภูมิท้องเป็นเวลา 5 นาที

2.3 เมื่อครบ 5 นาที สำหรับแต่ละหลอดในการทดลองข้อ 2.2 ปีเปต์สารผสม 0.5 cm^3 ลงในหลอดที่บรรจุด้วยไนโตรชาลิไซเลต ซึ่งเตรียมไว้ในการทดลองข้อ 2.1 เพื่อหาปริมาณอลโทสและกลูโคส นำแต่ละหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแซ่น้ำเติมน้ำก้อนลงไปอีกหลอดละ 4.0 cm^3 เพื่อเจือจาง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 nm . ของสารสีน้ำตาลแดงที่ได้จากหลอดที่ 2 ถึง 5 โดยใช้หลอดที่ 1 ตั้งชุดศูนย์ เลือกหลอดทดลองที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง $0.3 - 0.6$ หน่วย สำหรับการทดลองต่อไป ถ้าทุกหลอดให้ค่าดูดกลืนแสงสูงกว่าหรือต่ำกว่านี้ ให้ทำการทดลองข้อ 2.1 ถึงข้อ 2.3 ซ้ำ โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์ใหม่ ให้มีความเข้มข้นน้อยลงหรือเพิ่มขึ้นตามลำดับ

2.4 เตรียมหลอดทดลองไว้อีก 6 หลอด บรรจุสารละลายไนโตรชาลิไซเลตหลอดละ 0.5 cm^3 ปีเปต์สารละลายเป็น 4 cm^3 ลงในหลอดทดลองอีกหลอดหนึ่ง เติมบัฟเฟอร์และเอนไซม์ในปริมาตรที่เลือกไว้จากการทดลองข้อ 2.2 – 2.3 (ที่ให้ค่าดูดกลืนแสง $0.3 - 0.6$ หน่วยภายในเวลา 5 นาที) ผสมให้เข้ากันแล้วเริ่มจับเวลาทันที ทุก ๆ หนึ่งนาที ปีเปต์สารผสม 0.5 cm^3 มาทำปฏิกิริยากับไนโตรชาลิไซเลต 0.5 cm^3 ที่เตรียมไว้เพื่อหาปริมาณอลโทสกับกลูโคสตามวิธีในการทดลองข้อ 2.3 ใช้หลอดเปรียบเทียบหลอดเดียวกับการทดลองข้อ 2.3

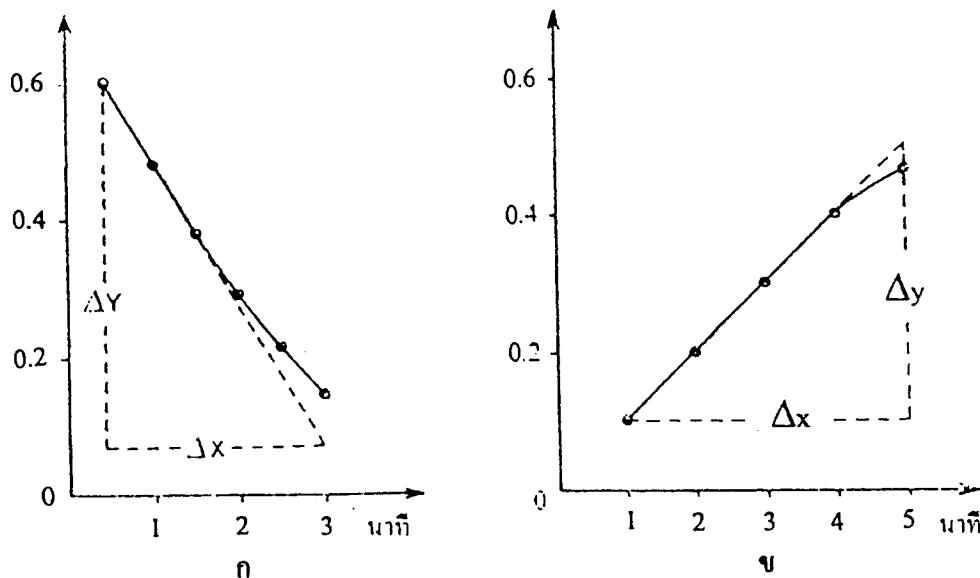
วิธีแสดงผลการทดลอง

1. เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm . กับเวลาสำหรับการทดลองแต่ละหลอด กราฟที่ได้ควรเป็นเส้นตรงสำหรับช่วงเวลาแรก ๆ แต่อาจจะโค้งในช่วงเวลาหลัง ๆ ดังรูปที่ 1.9 ในกรณีที่ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะต้องใช้เวลาช่วงเวลาแรกที่เป็นเส้นตรงเท่านั้น โดยวิธีคำนวนดังนี้

อัตราความเร็วเริ่มต้น ; $v = \text{ความลาด}$

$$= \frac{\text{การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{การเปลี่ยนแปลงของเวลา}}$$

$$= \Delta y / \Delta x$$



รูปที่ 1.9 วิธีคำนวณอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา $= \Delta y / \Delta x$

ก. การลดปริมาณแบ่ง ช. การเพิ่มปริมาณอลโทสและกลูโคส

2. เขียนกราฟระหว่างอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจากข้อ 1 กับปริมาตรอลูไซด์ที่ใช้

3. เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 nm. ที่ได้ในการทดลองข้อ 2.3 กับปริมาตรอลูไซด์ที่ใช้

4. เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 nm. ที่ได้ในการทดลองข้อ 2.4 กับเวลา คำนวณหาอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจากความลาก เช่นเดียวกับการคำนวณในข้อ 1 ในการคำนวนนี้ควรใช้ช่วงของกราฟที่เป็นสันตรงเช่นเดียวกัน (รูปที่ 1.9)

การตอบคำถามต่อไปนี้

1. ในการทดลองตอนที่ 1 อัตราความเร็วเริ่มต้นเป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณอลูไซด์ที่ใช้หรือไม่

2. ในการทดลองตอนที่ 2 อัตราการเกิดผลผลิตอลูโทสและกลูโคส เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับปริมาณของอลูไซด์ที่ใช้หรือไม่

3. ท่าคิดว่าระหว่างการหาอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา โดยวิธีวัดปริมาณของแบ่งและโดยวิธีวัดปริมาณของอลูโทสกับกลูโคส วิธีไหนสะดวกกว่ากัน เพราะเหตุใด

การทดลองที่ 1.3 ผลการเปลี่ยนแปลง pH และความเข้มข้นของซับสเตรตค่าปฏิกิริยาเอนไซม์แอ็ลฟ่าอะมิเลส

หลักการ

ผลของการเปลี่ยนแปลง pH และความเข้มข้นของซับสเตรตค่าปฏิกิริยาเอนไซม์สามารถศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงอัตราความเร็วเริ่มต้นที่ pH และความเข้มข้นต่าง ๆ กันของซับสเตรต โดยอัตราความเร็วเริ่มต้นนี้จะคำนวณจากการวัดปริมาณแป้งที่เหลือ โดยอาศัยคุณสมบัติในการกระจายเสียง

สารเคมี

1. น้ำด้วย ใช้เตรียมสารละลายแอ็ลฟ่า อะมิเลสที่เจือจาง 1 : 500 เท่า (ตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในการทดลองที่ 1.2)
2. สารละลายแป้งมัน 2 เปอร์เซ็นต์ (ตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในการทดลองที่ 1.2)
3. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 mol/dm^3 – โซเดียมคลอไรด์ 0.01 mol/dm^3 , pH 6.8 (ตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในการทดลองที่ 1.2)
4. สารละลายโซเดียมแอกซีเตตบัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) เข้มข้น 1 mol/dm^3 , pH 5.5 เตรียมโดยผสมกรดแอกซิติกเข้มข้น 55.6 cm^3 กับน้ำกลั่น 800 cm^3 ปรับ pH ให้ได้ 5.5 โดยเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ละหบด ขณะที่คนอยู่รีอย ๆ แล้วทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 dm^3 ด้วยน้ำกลั่น
5. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 mol/dm^3 , pH 6.8 (ตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในการทดลองที่ 1.2)
6. สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ (ammonium chloride buffer) 1 mol/dm^3 , pH 8.4 เตรียมโดยผสมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (conc. ammonium hydroxide, ถ.พ. = 0.88) 55.2 cm^3 กับน้ำกลั่น 800 cm^3 ปรับ pH ให้ได้ 8.4 โดยเติมกรดไฮโคลอโริกที่ละหบดขณะที่คนอยู่รีอย ๆ แล้วทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 dm^3 ด้วยน้ำกลั่น
7. สารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ 1 mol/dm^3 , pH 10.0 เตรียมโดยผสมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (ถ.พ. = 0.88) 55.2 cm^3 กับน้ำกลั่น 800 cm^3 ปรับ pH ให้ได้ 10 โดยเติมกรดไฮโคลอโริกที่ละหบดขณะที่คนอยู่รีอย ๆ แล้วทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 dm^3 ด้วยน้ำกลั่น

วิธีทดลอง

ตอนที่ 1 ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลง pH

1.1 ตั้งความยาวคลื่นในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงไว้ที่ 400 nm และใช้โซเดียมฟอสเฟต 0.02 mol/dm^3 - โซเดียมคลอไรด์ 0.01 mol/dm^3 , pH 6.8 ตั้งจุดศูนย์ปีเปตต์สารละลายน้ำ 4 cm^3 ลงในหลอดวัดค่าการดูดกลืนแสง เติมสารละลายน้ำเดิมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 mol/dm^3 ลงไป 1 cm^3 ผสมให้เข้ากันต่อไปเติมสารละลายน้ำ 1 cm^3 เขย่าให้สมกันแล้วเริ่มจับเวลาทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ ครั้งนาที เป็นเวลา 3 นาที ในนาทีแรกค่าการดูดกลืนแสงควรจะลดลง $0.07 - 0.20$ หน่วย ถ้าลดมากกว่าหรือน้อยกว่านี้ให้ทำการทดลองซ้ำโดยใช้สารละลายน้ำ 1 cm^3 ที่เข้มข้นน้อยลงหรือมากขึ้นตามลำดับ (การเลือกความเข้มข้นของน้ำ 1 cm^3 เช่นเดียวกับการทดลองข้อ 1.1 ของการทดลองที่ 1.2 ตอนที่ 1)

1.2 เมื่อได้ความเข้มข้นของน้ำ 1 cm^3 ที่ถูกต้องแล้ว ทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้ง โดยใช้ 1 cm^3 ของโซเดียมแอกซีเตตบัฟเฟอร์ 1 mol/dm^3 , pH 5.5, แอมโมเนียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ 1 mol/dm^3 , pH 8.4 และแอมโมเนียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ 1 mol/dm^3 , pH 10 แทนโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 mol/dm^3 , pH 6.8

ตอนที่ 2 ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของชั้นสเตรต

ทำการทดลองซ้ำอีก 5 ครั้ง โดยเปลี่ยนปริมาตรของสารละลายน้ำ 4 cm^3 และของโซเดียมฟอสเฟต 0.02 mol/dm^3 - โซเดียมคลอไรด์ 0.01 mol/dm^3 , pH 6.8 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.2 ในการทดลองแต่ละครั้งจะต้องเขย่าสารละลายน้ำ 4 cm^3 กับบัฟเฟอร์ให้เข้ากันแล้วเติมน้ำ 1 cm^3 เป็นอันดับสุดท้าย เขย่าให้สมกันแล้วเริ่มจับเวลาทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 nm. ทุก ๆ ครั้งนาที เป็นเวลา 3 นาทีเช่นเดิม

ตารางที่ 1.2 วิธีศึกษาผลการเปลี่ยนความเข้มข้นของแป้งต่อปฏิกิริยาอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลส

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่ 1	2	3	4	5
สารละลายแป้งมัน 2 เปอร์เซ็นต์	5.0	3.0	2.0	1.5	1.2
สารละลายโซเดียมฟอสฟิตบัฟเฟอร์ - โซเดียมคลอไรด์ pH 6.8	-	2.0	3.0	3.5	3.8
เอนไซม์เจือจาง เท่า	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
สารละลายแป้งมัน 2 เปอร์เซ็นต์ (mg/cm^3)	16.7	10	6.7	5.0	4.0
$1/[S] \text{ cm}^3/\text{mg}$	0.06	0.1	0.15	0.20	0.25

วิธีแสดงผลการทดลอง

1. เก็บกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาสำหรับการทดลองทุกครั้ง และคำนวณหาอัตราความเร็วเริ่มต้นจากความลาดของกราฟ ตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในการทดลองที่ 1.2

2. ใน การทดลองข้อ 1.1 และข้อ 1.2 คำนวณหาอัตราความเร็วเริ่มต้นที่แตกต่าง pH ออกมานี้เป็นเปอร์เซ็นต์ของอัตราความเร็วเริ่มต้นที่ pH 6.8 เก็บกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ของอัตราความเร็วเริ่มต้นที่ pH 6.8 กับ pH ต่างๆ

3. ใน การทดลองตอนที่ 2 คำนวณหาค่า $1/v$ จากอัตราความเร็วเริ่มต้นที่แตกต่างความเข้มข้นของซัมนสเตรต แล้วทำกราฟไลน์วอร์เบอร์ก โดยเก็บกราฟระหว่าง $1/v$ กับ $1/[S]$ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 1.2

ตอบคำถามต่อไปนี้

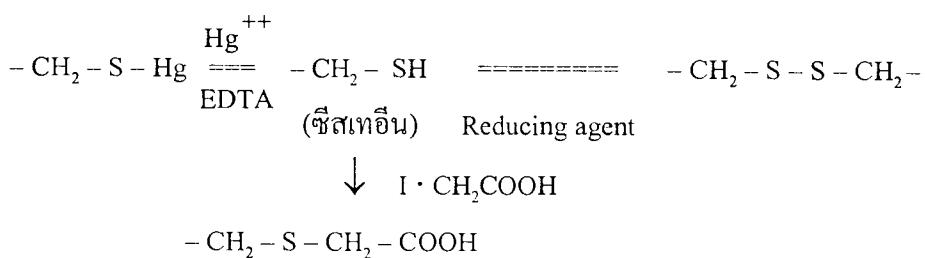
1. จงคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์สำหรับแป้งมัน
2. กราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ของอัตราความเร็วเริ่มต้นที่ pH 6.8 กับ pH ต่างๆ มีลักษณะอย่างไร
3. pH ที่เหมาะสมที่สุดของเอนไซม์ แอลฟ่าอะมิเลสเมื่อกำหนด

การทดลองที่ 1.4 การยับยั้งเอนไซม์บอร์มีลาอีน (bromelain) จากสับปะรด

หลักการ

ผลไม้บางชนิดมีเอนไซม์ชนิดโปรตีอีส (protease) ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนให้เป็นเพบไทด์สั้น ๆ ได้ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์บอร์มีลาอีน จากหัวไก่และผลสับปะรดหรือเอนไซม์ปาปารอิน (papain) และไคโนปาปารอิน (chymopapain) จากยางมะลอกอ่อน เอนไซม์เหล่านี้ มีหมู่เชิงเส้น (cysteine ; - CH₂ - SH) ซึ่งจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยา หมู่เชิงเส้นเหล่านี้อาจถูกออกซิเดชันเป็นซีสตีน (cystine ; - CH₂ - S - S - CH₂) หรือจับกันกับไอออนของโลหะ เช่น Hg²⁺ ทำให้เอนไซม์เสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา การยับยั้งชนิดนี้สามารถทวนกลับได้โดยเติมสารที่มีคุณสมบัติในการรีดิวช์ เช่น ซิสเทอีน หรือสารที่สามารถจับไอออนของโลหะ เช่น EDTA นอกจากนี้เอนไซม์ดังกล่าวสามารถถูกยับยั้ง อย่างการ โดยตัวแอคิเลทิก (alkylating agent) เช่น กรดไอโอดีอะซีติก (iodoacetic acid) ซึ่งจะทำให้เอนไซม์หมดสภาพในการเร่งปฏิกิริยา และไม่สามารถทวนกลับได้

ในการทดลองนี้จะศึกษาการยับยั้งทั้งแบบถาวรและแบบทวนกลับได้ของเอนไซม์บอร์มีลาอีนจากผลสับปะรด โดยการสังเกตดูความสามารถของเอนไซม์ในการทำให้นมเกาะเป็นก้อน โปรตีนในนมที่สำคัญในปฏิกิริยานี้คือ คาเซอีน (casein) ซึ่งปกติอยู่ในสภาพเป็นไนเชลล์ (micelle) เมื่อพันธะเพบไทด์ในโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีอีส ไนเชลล์จะถลายน้ำให้ไม่เลกุลของโปรตีนที่ถลายน้ำจากไนเชลล์ เรียงตัวกันใหม่ในลักษณะที่มีอนุภาคใหญ่ขึ้น แล้วรวมตัวกันตกลงมา ซึ่งสังเกตได้จากการแข็งตัวของนม



รูปที่ 1.10 ปฏิกิริยาของหมู่เชิงเส้นในโปรตีอีสจากผลไม้

สารเคมี

1. น้ำสับปะรดเตรียมโดยบันเนื้อสับปะรดคำๆ ประมาณ 30 g. มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ห่อตัวยึดผ้ารอง แล้วบีบเอาน้ำออกใส่ในบีเกอร์ ทิ้งส่วนที่เป็นกากระดิษ

2. สารละลายน้ำโซเดียมแอลูมิโนทรีตบัฟเฟอร์ 0.3 mol/dm^3 , pH 5.5 เตรียมโดยผสมกรดแอลูมิโนทรีติกเข้มข้น 16.7 cm^3 กับน้ำกลั่น 900 cm^3 ปรับ pH ให้ได้ 5.5 โดยคิดสารละลายน้ำโซเดียมโซดาออกไซด์ที่ละหมาด ขณะที่คนอยู่รื่ออยๆ แล้ว ทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 dm^3 ด้วยน้ำกลั่น

3. นมสด

4. ซีสเทอิน ($\text{NH}_2 - \text{CH}(\text{CH}_2 - \text{SH}) - \text{COOH}$) 0.1 mol/dm^3

5. HgCl_2 0.01 mol/dm^3

6. กรดไอโอดีโคแอซิติก ($\text{I} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$) 0.05 mol/dm^3

7. กรดเอทีลีนไดอะมีนเททระแอลูซิตริก (ethylenediaminetetra acetic acid ; EDTA) 0.1 mol/dm^3

วิธีทดลอง

1. เจือจางเออนไซม์ที่หลาຍๆ ความเข้มข้น โดยปีเปตต์บัฟเฟอร์โซเดียมแอลูมิโนทรีต 2 cm^3 ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด เติมสารละลายน้ำโซดาออกไซด์สับปะรด 2 cm^3 ลงในหลอดแรก แล้วค่อยๆ ผสมให้เข้ากัน จึงปีเปตต์เออนไซม์ที่ถูกเจือจางแล้วนั้น 1 cm^3 จากหลอดแรกลงไปในหลอดที่สอง ผสมให้เข้ากันแล้วปีเปตต์สารละลายน้ำโซดาออกไซด์ที่สองลงไปในหลอดที่สาม เมื่อทำเช่นนี้เรื่อยๆ ไปจนถึงหลอดที่ห้า จะได้สารละลายน้ำโซดาออกไซด์ใน 5 หลอด ที่ถูกเจือจาง $1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16$ และ $1 : 32$ เท่า ตามลำดับ วิธีเจือจางเช่นนี้เรียกว่าเจือจางแบบอนุกรม

2. ปีเปตต์นมสด 5 cm^3 ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด แยกเดjmิสารละลายน้ำโซดาออกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน จากแต่ละหลอดในการทดลอง 1 ลงไปหลอดละ 0.5 cm^3 ตามลำดับ หลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที สำรวจดูว่านมในแต่ละหลอดแข็งตัวหรือไม่ โดยค่อยๆ เอียงหลอดทดลอง

3. จากข้อ 2. เลือกหลอดทดลองที่มีเออนไซม์น้อยที่สุด แต่งさまารถทำให้นมเกาะเป็นก้อน เตรียมสารละลายน้ำโซดาออกไซด์ที่เจือจางเท่าหลอดนึ่อีกประมาณ 10 cm^3 เพื่อศึกษาการขับยังเออนไซม์ และเตรียมหลอดทดลองอีก 5 หลอด บรรจุด้วยสารละลายน้ำดังแสดงไว้ในตาราง

ตารางที่ 1.3 วิธีศึกษาการยับยั้งเอ็นไซม์โดยมีล้าอินจากสับปะรด

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่ 1	2	3	4	5
เอนไซม์	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
สารละลายโซเดียมแอชีเตตบัฟเฟอร์ 0.3 mol/dm^3 , pH 5.5	0.6	0.4	0.4	-	-
กรดไอโอดีโนไดซิติก	-	0.2	-	0.2	-
$\text{HgCl}_2 0.1 \text{ mol/dm}^3$	-	-	0.2	-	0.2
← ตั้งไว้ 10 นาที →					
EDTA	-	-	-	0.2	0.2
ซีสเทอีน	-	-	-	0.2	0.2
← ตั้งไว้ 10 นาที →					
นมสด	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
← ตั้งไว้ 15 นาที →					

ในการเตรียมหลอดทั้ง 5 นี้ ควรเขย่าให้สารละลายผสมกันหลังจากเติมสารแต่ละอย่าง นอกจานนี้ยังต้องตั้งสารละลายในหลอดทั้งไว้ 10 นาที ก่อนและหลังจากเติม EDTA กับซีสเทอีน

4. เติมน้ำนมสด 5 cm^3 ลงไปในแต่ละหลอดเขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และวิเคราะห์ดูว่ามันในแต่ละหลอดแข็งตัวหรือไม่

ตอบคำถามต่อไปนี้

1. กรดไอโอดีโนไดซิติก และ HgCl_2 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้หรือไม่ ถ้าได้การยับยั้งนี้สามารถถกวนกลับโดย EDTA กับซีสเทอีนได้หรือไม่

2. ถ้าเติมกรดลงไปในนมสดจะทำให้โปรดีนในนมแตกตะกอน เราทราบได้อย่างไร ว่าการแข็งตัวของนมเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ และไม่ได้เป็นผลเนื่องมาจากการเป็นกรดของน้ำสับปะรด

**บันทึกผลการทดลอง
บทปฏิบัติการที่ 1 ปฏิบัติการเรื่อง เอนไซม์**

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1.1 การทดสอบเอนไซม์ยูเรอีต

ถัวที่นำมาทดลอง	น้ำถัวไม่มีไดคัม		น้ำถัวที่ต้มเดือด	
	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2
ถัวเหลือง				
แดงโอม				
ถัวแดง				
ถัวคำ				
ถัวเขียว				

บันทึกผลการทดลองด้วยเครื่องหมาย - , +, ++, +++ แทนการเปรียบเทียบ
สีในหลอดทดลองสำหรับถัวแต่ละชนิด

วิารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

.....

ตอบคำถาม

1. สาเหตุที่ใช้หลอดที่ 2 เป็นหลอดเปรียบเทียบสีเพราะ

.....

.....

.....

2. จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ถ้าที่มีเอนไซม์ยูเรอีสคีอ

.....

.....

.....

3. การต้มสารละลายเอนไซม์มีผลต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ

.....

.....

.....

บันทึกผลการทดลองที่ 1.2 วิธีหาอัตราความเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์แอลฟ่าอะมิเลส

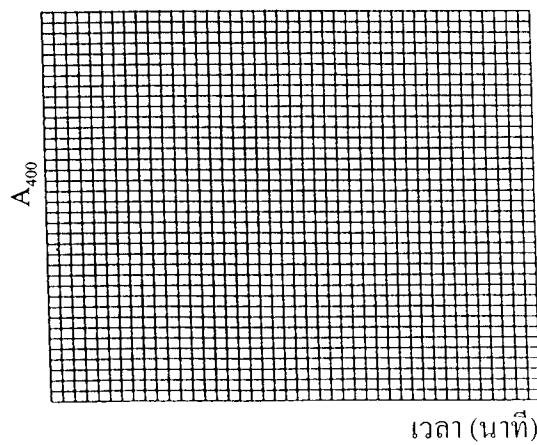
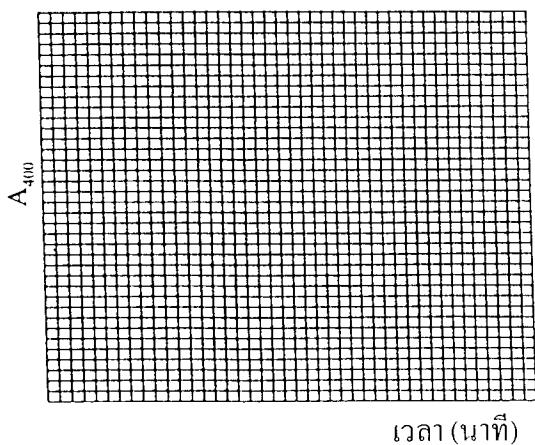
ตอนที่ 1 บันทึกผลการทดลองข้อ 1.1 การลดลงของปริมาณแป้ง

ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงลดระหว่าง 0.07 – 0.20 หน่วยต่อนาที เท่ากับ

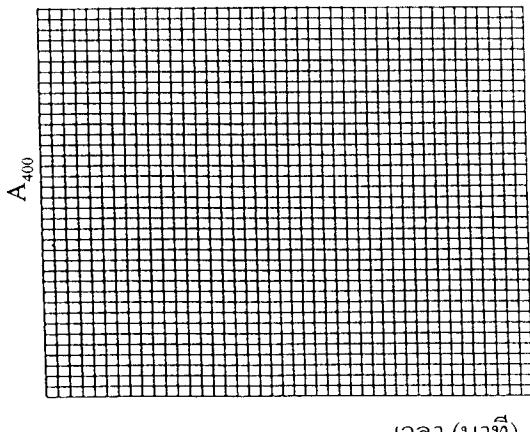
ตารางบันทึกผลการทดลองข้อ 1.2 การลดลงของปริมาณแป้ง

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่					
		1	2	3	4	5
สารละลายแป้งมัน 2 เปอร์เซ็นต์		4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์-	1		0.75	0.5	0.25	-
สารละลายโซเดียมคลอไรด์, pH 6.8						
เอนไซม์เจือจาง.....เท่า		-	0.25	0.5	0.75	1.0
A ที่เวลา 0.5 นาที						
A ที่เวลา 1.0 นาที						
A ที่เวลา 1.5 นาที						
A ที่เวลา 2.0 นาที						
A ที่เวลา 2.5 นาที						
A ที่เวลา 3.0 นาที						

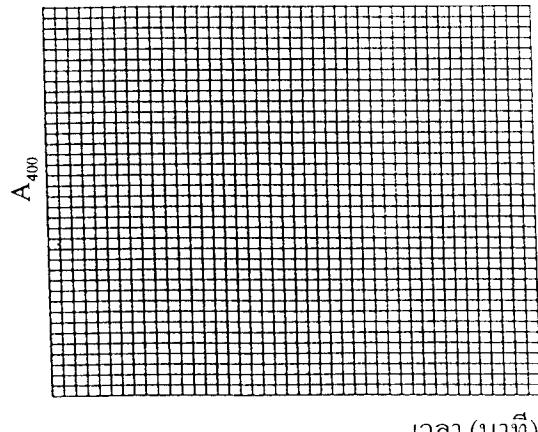
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{400} และเวลา
หลอดที่ 2



លេខទី 4



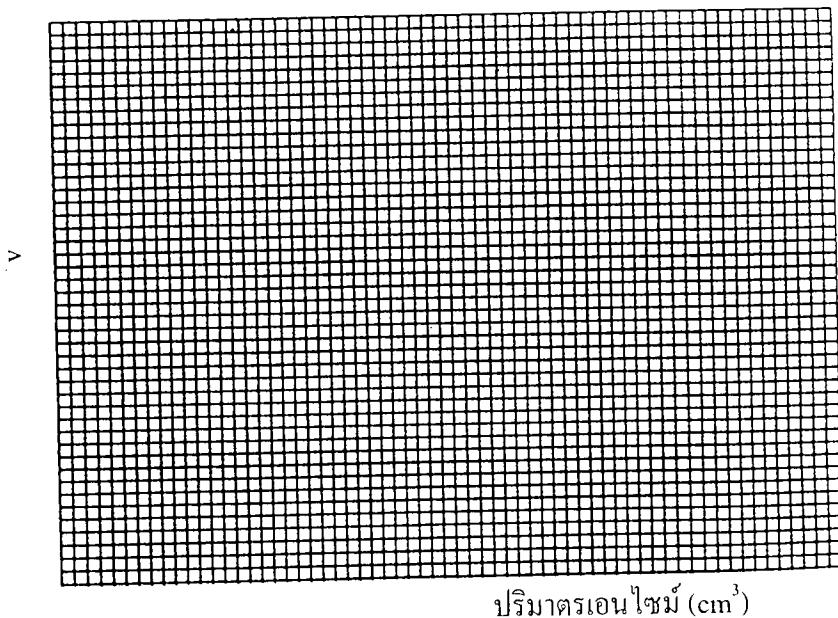
លេខទី 5



จงคำนวณหาอัตราความเร็วเริ่มต้น (V) ของเงินไว้ม์แอลฟาระมิเลส ในหลอดที่ 2-5

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง v และปริมาตรของเรònไชน์ หลอด 1 – หลอด 5

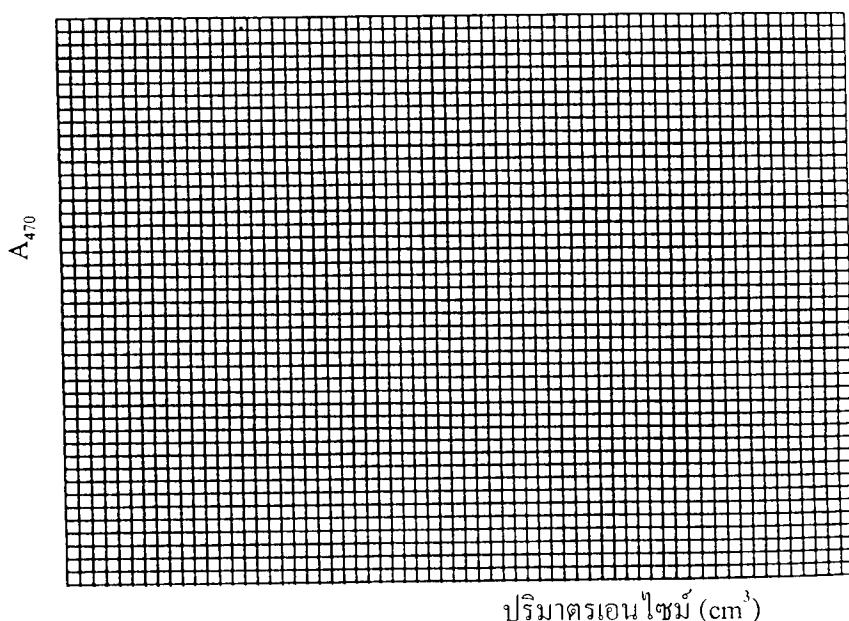
หลอดที่ 1 – 5



ตอนที่ 2 ตารางบันทึกผลการทดลองข้อ 2.3 การเพิ่มของปริมาณอลโหสและกลูโคสต่อปริมาณเอนไซม์

	สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่				
		1	2	3	4	5
สารผสม	สารละลายแป้งมัน 2 เปอร์เซ็นต์	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
	สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์-	1	0.75	0.5	0.25	-
	สารละลายโซเดียมคลอไรด์ pH 6.8	-				
	เอนไซม์เจือจาง.....เท่า	-	0.25	0.5	0.75	1.0
ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที สำหรับแต่ละหลอดทดลอง						
สารละลาย 3.5 ไดไนโตรชาลิไซเลต		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
สารผสม		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นโดยเช่นน้ำ						
น้ำกัด		4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
A_{470}						

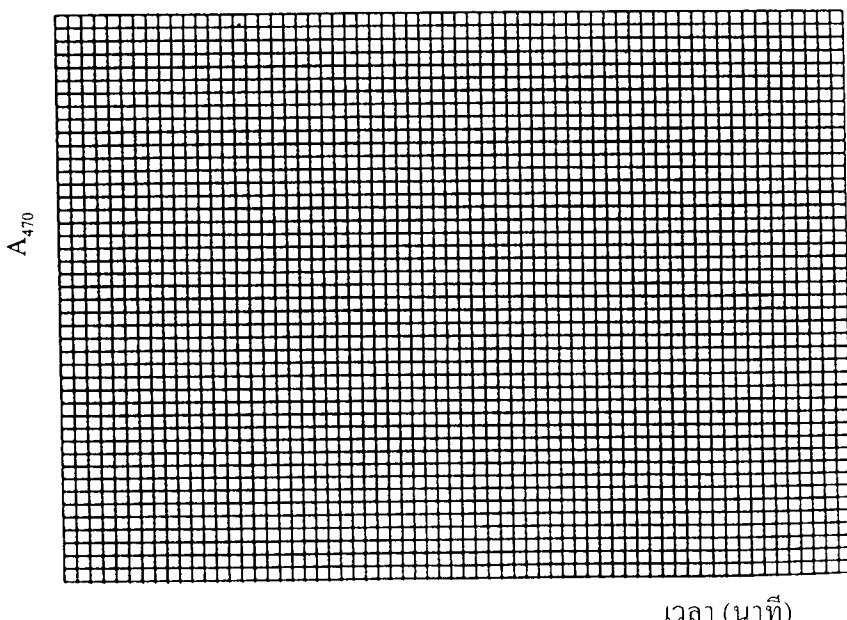
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{470} กับปริมาตรของเอนไซม์



ตารางบันทึกผลการทดลองข้อ 2.4 การเพิ่มของปริมาณนอลโซสและกลูโคสต่อเวลา

	สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่						
			1	2	3	4	5	6
ปริมาตรที่ คัดเลือกไว้จาก การทดลอง ข้อ 2.2 - 2.3	สารละลายน้ำมัน 2 เปอร์เซ็นต์ สารละลายน้ำโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์- สารละลายน้ำโซเดียมคลอไรด์, pH 6.8 โซนไนเตรียมเจือจาง.....กว่า	สารผสม						4
	สารละลายน้ำ 3, 5 ไดโนโตรชาลีไซเดต สารผสม (นาทีที่ 1) สารผสม (นาทีที่ 2) สารผสม (นาทีที่ 3) สารผสม (นาทีที่ 4) สารผสม (นาทีที่ 5)	0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5	0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5	0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5	0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5	0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5	0.5 0.5 0.5 0.5 0.5 0.5	
	เมื่อกรอบกำหนดเวลาของแต่ละหลอด (ในนาทีที่ 5) นำไปปั๊มน้ำ น้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นโดยเช่นน้ำ							
	นำกลับ	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	
	A_{470}							

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{470} และเวลา



วิธีคำนวณหาอัตราความเร็วเริ่มต้น.....

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

วิจารณ์ผลการทดลอง

ตอนที่ 1

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ตอนที่ 2

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

สรุปผลการทดลอง

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ตอบคำถาม

1. ในการทดลองตอนที่ 1 อัตราความเร็วเริ่มต้นเป็นปัจจภาคโดยตรงกับเงินไข่มีหรือไม่

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

2. ในการทดลองตอนที่ 2 ขั้ตตราการเกิดผลผลิตมวลโถสและกลูโคสเป็นปัจจภาคโดยตรงกับปริมาณของเงินไข่มีหรือไม่

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

3. การหาอัตราความเร็วเริ่มต้นของปัจจิตริยะระหว่างวิธีวัดปริมาณของแป้ง และวิธีวัดปริมาณของมวลโถสกับกลูโคส วิธีที่สะดาวกกว่าคือ

เพราะ.....
.....
.....
.....

บันทึกผลการทดลองที่ 1.3 ผลการเปลี่ยนแปลง pH และความเข้มข้นของซับสเตรต
ตอนที่ 1 ผลของการเปลี่ยนแปลง pH

ในการทดลองข้อ 1.1 ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงลดระห่ำว่าง
0.07 – 0.20 หน่วย เท่ากับ.....

.....
.....
.....

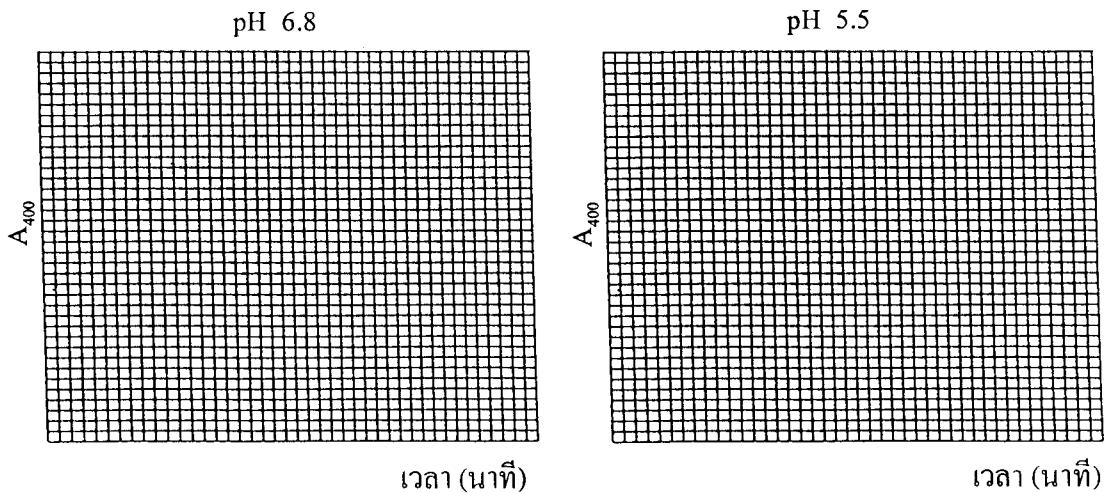
ตารางบันทึกผลการทดลองข้อ 1.1 การทำงานของเอนไซม์ที่ pH 6.8

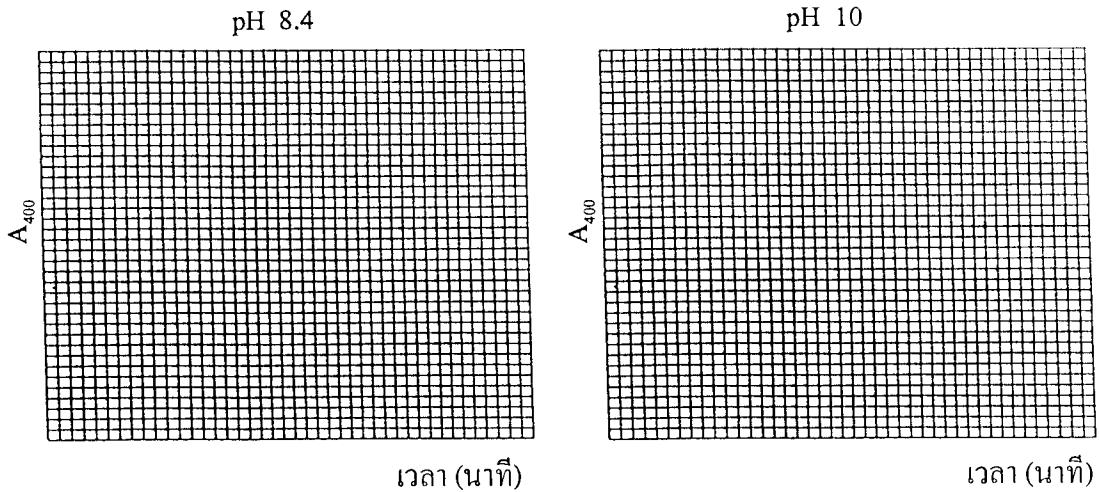
สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่
สารละลายแป้งมัน 2 เปอร์เซ็นต์	1 4.0
สารละลายโซเดียมฟอสฟอตบัฟเฟอร์ 0.2 mol/dm^3 , pH 6.8	1.0
สารละลายเอนไซม์เจือจาง.....เท่า	1.0
A_{400}	
ที่เวลา 0.5 นาที	
1.0 นาที	
1.5 นาที	
2.0 นาที	
2.5 นาที	
3.0 นาที	

ตารางบันทึกผลการทดลองข้อ 1.2 ผลการเปลี่ยนแปลง pH

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่	ผลการทดลอง		
		1	2	3
สารละลายน้ำมัน 2 เปอร์เซ็นต์		4.0	4.0	4.0
สารละลายน้ำมันโซเดียมแอกซีเตตบัฟเฟอร์ 1.0 mol/dm ³ pH 5.5		10	-	-
สารละลายน้ำมันโซเดียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ 1.0 mol/dm ³ pH 8.4		-	1.0	-
สารละลายน้ำมันโซเดียมคลอไรด์ 1.0 mol/dm ³ pH 10.0		-	-	1.0
สารละลายน้ำมันโซเดียมโซเดียม		1.0	1.0	1.0
A_{400}	ที่	0.5 นาที		
		1.0 นาที		
		1.5 นาที		
		2.0 นาที		
		2.5 นาที		
		3.0 นาที		

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{400} และ เวลา ที่ pH ต่างๆ

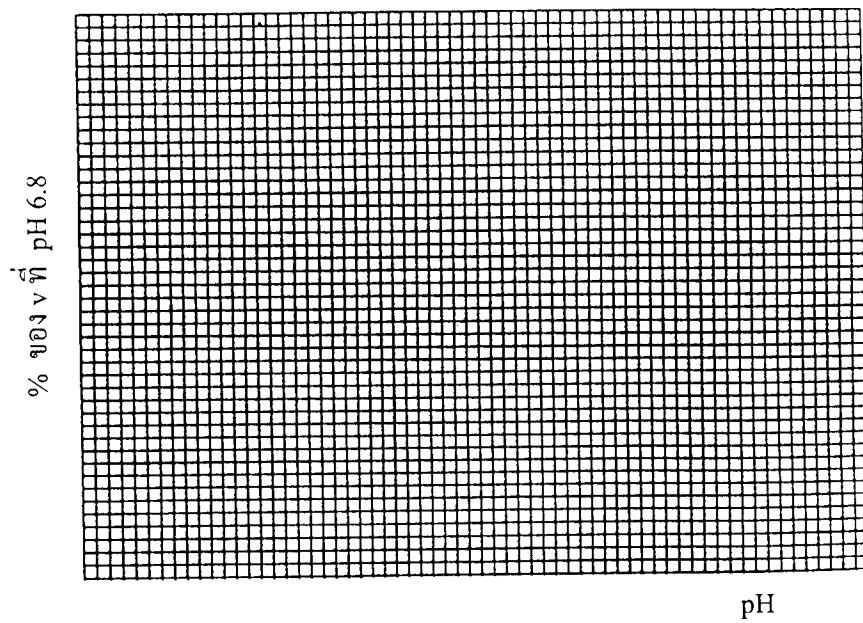




วิธีคำนวณหาอัตราความเร็วเริ่มต้นที่ pH ต่าง ๆ

ก. ที่ pH 6.8 ; v	=	
	=	
	=	
ก. ที่ pH 5.5 ; v	=	
	=	
	=	
คิดเป็นร้อยละ	=	ของ pH 6.8
ค. ที่ pH 8.4 ; v	=	
	=	
	=	
คิดเป็นร้อยละ	=	ของ pH 6.8
ก. ที่ pH 10 ; v	=	
	=	
	=	
คิดเป็นร้อยละ	=	ของ pH 6.8

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเบอร์เซ็นต์ของอัตราความเร็วเริ่มต้นที่ pH 6.8 กับ pH ต่างๆ

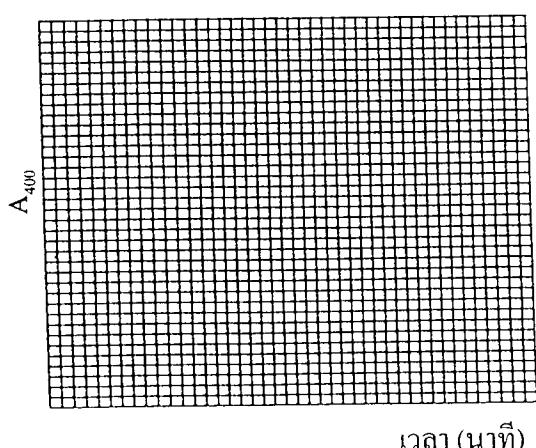


ตอนที่ 2 ตารางบันทึกผลการทดลอง ผลการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของซับสเตรต

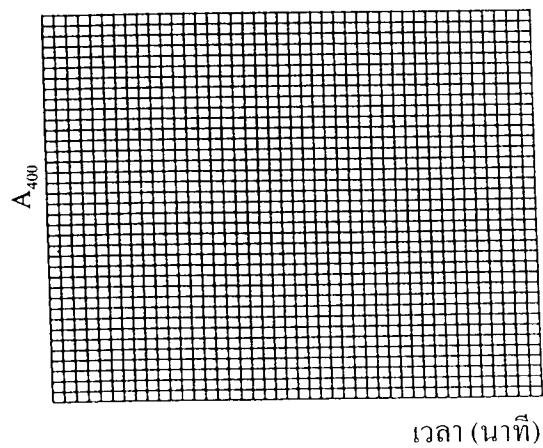
สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่				
	1	2	3	4	5
สารละลายน้ำมัน 2 เบอร์เซ็นต์	0.5	3.0	2.0	1.5	1.2
สารละลายน้ำมันฟอสฟอเรตบัฟเฟอร์	-	2.0	3.0	3.5	3.8
สารละลายน้ำมันฟอสฟอเรตบัฟเฟอร์ pH 6.8 เอนไซม์ เจือจาง	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
สารละลายน้ำมัน mg/cm ³	16.7	10	6.7	5.0	4.0
$1/[S] \text{ cm}^3/\text{mg}$	0.06	0.1	0.15	0.20	0.25
A_{400} ที่ 0.5 นาที					
ที่ 1.0 นาที					
ที่ 1.5 นาที					
ที่ 2.0 นาที					
ที่ 2.5 นาที					
ที่ 3.0 นาที					

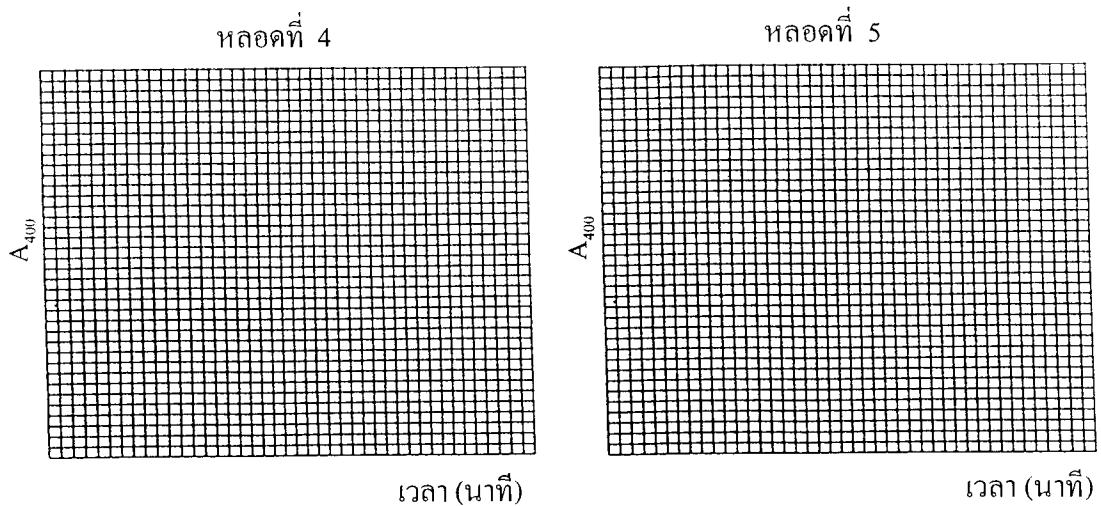
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{400} และเวลาที่ $[S]$ ต่างๆ

หลอดที่ 1 และ 2

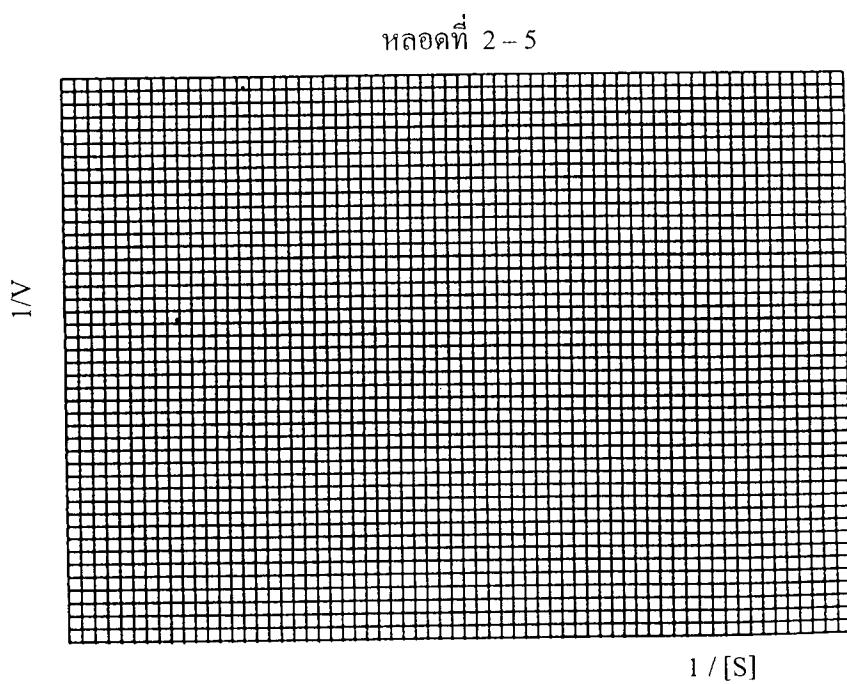


หลอดที่ 3





กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/[S]$ และ $1/V$ ของผลลัพธ์ 2 – 5



วิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ตอบคำถาม

1. วิธีคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์สำหรับเปลี่ยน

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. กราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ของอัตราความเร็วเริ่มต้นที่ pH 6.8 กับ pH ต่างๆ

มีลักษณะ

.....

.....

.....

3. pH ที่เหมาะสมที่สุดของเอนไซม์แอ็ลฟาระมิเลสมีค่าเท่ากับ

.....

บันทึกผลการทดลองที่ 1.4 การยับยั้งเอนไซม์โดยมีลาอีนจากสับปะรด

สารละลายนอนไชม์เจือจางที่มีเอนไซม์น้อยที่สุด แต่ยังสามารถทำให้ห้มเกาะเป็นก้อนได้มาจากการเจือจางเอนไซม์ เท่ากับ

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 1.4 การยับยั้งเอนไซม์โดยมีลาอีนจากสับปะรด

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่	1	2	3	4	5
เอนไซม์		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
สารละลายน้ำซีดีบีมแอลซีเดตบัฟเฟอร์ pH 5.5		0.6	0.4	0.4	-	-
กรดไอโอดิโคแอลซีติก		-	0.2	-	0.2	
HgCl_2 0.1 mol / dm^3		-	-	0.2	-	0.2
← ตั้งไว้ 10 นาที →						
EDTA		-	-	-	0.2	0.2
ซิสเทอิน		-	-	-	0.2	0.2
← ตั้งไว้ 10 นาที →						
น้ำมัน		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
← ตั้งไว้ 15 นาที →						
คลิกษณะน้ำ						

วิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

ตอบคำถาม

1. กรดไฮโอดีออกซิติก และ HgCl_2 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้หรือไม่
ถ้าได้การยับยั้งนี้สามารถถวานกลับโดย EDTA กับซิสเทอินได้หรือไม่
2. เราทราบได้ว่าการแข็งตัวของนมเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์และไม่ใช่เป็นผล
เนื่องมาจากการเป็นกรดของน้ำสับปะรด เพราะ

บทปฏิบัติการที่ 2

ปฏิบัติการเรื่อง คาร์บอนไซเดรต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาและทำความเข้าใจบางปฏิกิริยาในกระบวนการเมแทบอลิซึม
2. เพื่อสังเคราะห์และศึกษาสมบัติของสารบางตัว

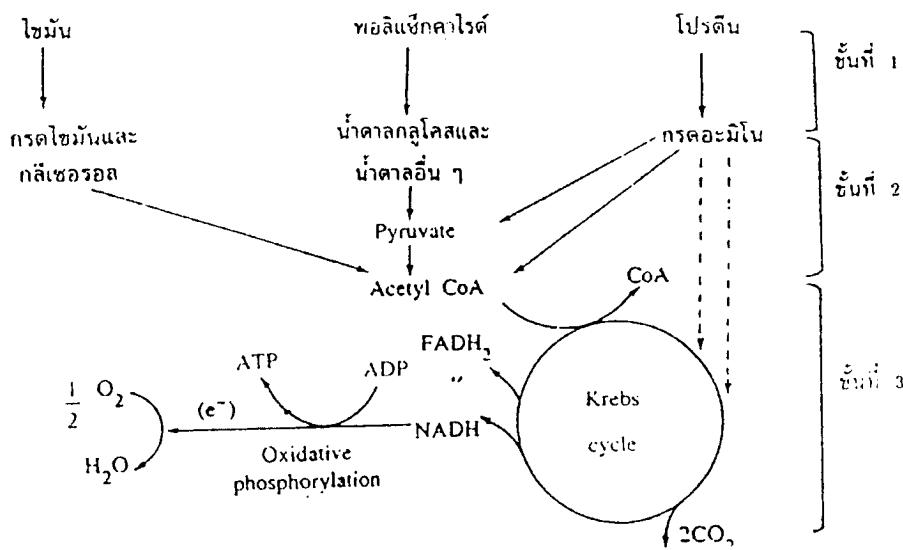
บทนำ

สิ่งมีชีวิตต้องการสารอาหารจากสิ่งแวดล้อม เพื่อเปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานสำหรับดำเนินชีวิต สิ่งมีชีวิตประเภท chemotrophs ใช้สารอินทรีย์ไม่เลกุลให้ญี่เป็นสารอาหาร เช่น มนุษย์ สัตว์ ยีสต์ แบคทีเรีย ส่วน phototrophs เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถใช้พลังงานแสงสร้างสารอินทรีย์ไม่เลกุลให้ญี่ จาก CO_2 และ H_2O ได้ เช่น พืชสีเขียว สาหร่ายสีน้ำเงินแกมน้ำเงิน และแบคทีเรียที่สังเคราะห์แสง เป็นต้น

คำว่า เมแทบอลิซึม (metabolism) หมายความถึง กระบวนการสร้างและสลายที่เกิดขึ้นในระบบสิ่งมีชีวิต กระบวนการสร้างอย่างเดียวกันกว่า “แอเนบอดิซึม” และกระบวนการสลายเรียกว่า “แคแทบทอดิซึม” ในกระบวนการสลายสารอินทรีย์ไม่เลกุลให้ญี่ เช่น กรูโคสให้เล็กลงมาเป็น CO_2 และ H_2O สิ่งมีชีวิตได้พลังงานเสริมรูป ATP ออกมากำจนาวนหนึ่งพลังงานในรูป ATP นี้เองที่สิ่งมีชีวิตนำไปใช้ในการกระบวนการสร้างชีวโมเลกุลทั้งที่ขาดสักกัน จนถึงขนาดใหญ่ กระบวนการสร้างและสลายในสิ่งมีชีวิตผ่านสารตัวกลางร่วมกัน สารตัวกลางเหล่านี้เรียกว่า เมแทบโอลิต (metabolite)

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่ถูกนำมาศึกษากระบวนการสร้างและสลายของชีวโมเลกุลอย่างจริงจัง นักชีวเคมีรู้จักโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น.enoen ใช้มีเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ในกระบวนการเมแทบอลิซึมจากยีสต์ก่อนสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เนื่องจากยีสต์เป็น chemotroph สารอาหารจากสิ่งแวดล้อมที่ยีสต์ใช้เป็นแหล่งพลังงาน คือ คาร์บอนไซเดรต ยีสต์มี.enoen ใช้มีชีวโมเลกุลย่อย การสลายไม่เลกุลให้ญี่ เช่น แบติสติสเป็นน้ำตาลกรูโคส ส่วนนี้เป็นขั้นที่ 1 ของเมแทบอลิซึม คือ การสลายไม่เลกุลขนาดใหญ่ลงมาอยู่ในระดับมอนомер (monomer) ขั้นที่ 2 เป็นการสลายน้ำตาลกรูโคส (C_6) ให้เล็กลงเป็นสารตัวกลางที่สำคัญคือไพรูเวต (pyruvate, C_3) กระบวนการสลายกรูโคสเป็นไพรูเวตนี้ เรียกว่า ไกลโคลิซึส (glycolysis) พนในเซลล์ของ

สิ่งมีชีวิตทุกชนิด ประกอบด้วยปฏิกิริยาอยู่ 10 ปฏิกิริยา เป็นปฏิกิริยาที่ข้อนกลับได้ 7 ปฏิกิริยา และอีก 3 ปฏิกิริยาข้อนกลับไม่ได้ กระบวนการหั้งหมุดเกิดในไซโทพลาซึม



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนของเคมีบนอลิซึมในการสกัดพลังงานจากสารอาหารและสร้างพลังงานรีดิวช์ (reducing power)

ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงพอ ไฟรูเวตที่เกิดขึ้นในไซโทพลาซึม จะเข้าสู่ เมโทคอนเดรีย (mitochondria) แล้วถูกเปลี่ยนให้เป็น acetyl CoA และ CO₂ ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจน ไฟรูเวตจะถูกเปลี่ยนเป็น แล็กเตต (lactate) แอซีเตต (acetate) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) สุดท้ายแล้วอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตนั้นมีอยู่ การสลายกลูโคสโดยไม่มีออกซิเจนเกี่ยวข้อง เรียกว่า anaerobic respiration หรือ fermentation

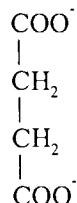
ขั้นที่ 3 ของการใบไชเดรตเคมีบนอลิซึม เป็นกระบวนการร่วมกับแอบเนนอลิซึม หรือ วัฏจักร酇เรนส์ (Krebs cycle; citric acid cycle หรือ tricarboxylic acid (TCA) cycle) ในขั้นนี้สารค้ากางคือ acetyl CoA ที่เข้าสู่วัฏจักร酇เรนส์จะถูกออกชีโอด์ส์อย่างสมบูรณ์ได้เป็น CO₂ ในกระบวนการนี้อิเล็กตรอนจากสารอาหาร (fuel) ถูกถ่ายโอน (transfer) ไปยัง NAD⁺ และ FAD ได้เป็น NADH, FADH₂ (พลังงานรีดิวช์; reducing power) ซึ่งจะเข้าสู่กระบวนการที่เรียกว่า ลูกโซ่หายใจ (respiratory chain) หรือ กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport) ในกระบวนการนี้ อิเล็กตรอนในรูปของ NADH, FADH₂ ที่เกิดจากวัฏจักร酇เรนส์

จะถูกถ่ายโอนไปยังออกซิเจน ทำให้เกิดน้ำและมีการปลดปล่อยของพลังงานเสริมจำนวนหนึ่ง ซึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้าง ATP จากปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ขั้นตอนนี้เกิดที่ผนังด้านในของไนโตรคอนเดรีย

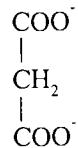
ในส่วนของแผลแนวอลิซึม กระบวนการสร้างกลูโคสจากไฟฟ้า ซึ่งเรียกว่า กลูโคโนเจเนชีส (gluconeogenesis) นั้น เป็นปฏิกิริยาขับกลับในวิธีไกලโคเลซีต โดยอาศัยพลังงานในรูป ATP และเอนไซม์ ซึ่งมาทำงานแทน 3 ปฏิกิริยาที่ขับกลับไม่ได้ในวิธีไกලโคเลซีต ในคนและสัตว์จะเก็บสะสมกลูโคสไว้ที่ตับในรูปของไกලโคเจน (glycogen)

เนื่องจากการแผลแนวอลิซึมของการไฟฟ้า เครต ประกอบด้วยปฏิกิริยาอย่างๆ เกิดต่อเนื่องกันเป็นจำนวนมาก ดังนี้ถ้าเดิมสารบางชนิดที่มีผลขบถการทำงานของเอนไซม์ เฉพาะหนึ่งปฏิกิริยาอย่าง จะทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการนั้นเปลี่ยนแปลงไปได้

มาโนเนต (malonate) เป็นตัวขับถ่ายเอนไซม์ชักซิเนตดีไซโตรจีนส (succinate dehydrogenase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนชักซิเนต (succinate) ไปเป็นฟูมาราเต (fumarate) ในวัฏจักรเครบส์ ทั้งนี้เพราะมาโนเนตมีโครงสร้างคล้ายชักซิเนตมากจนสามารถแข่งขันแย่งจับกับเอนไซม์ได้



ชักซิเนต



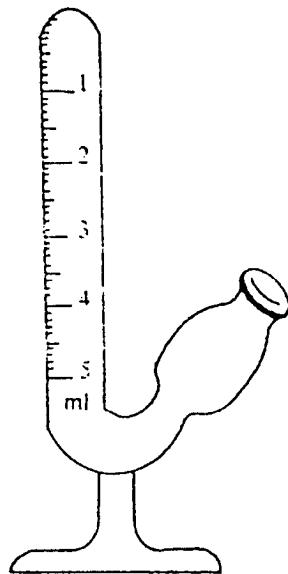
มาโนเนต

ดังนี้ถ้าเดิมมาโนเนตลงไปแข่งขันในปฏิกิริยาจำนวนมาก จะตรวจพบปริมาณของชักซิเนตสะสมเพิ่มขึ้น

การทดลองที่ 2.1 แคแทบอลิชีนของซูโครัสในสภาวะขาดออกซิเจน

หลักการ

การนำไปใช้เครื่องที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้ คือ ซูโครัส ซึ่งเป็นไดแท็กไครเดร์ และ เป็นสารอาหารของยีสต์ เนื่องจากยีสต์สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือขาดออกซิเจน จึง หมายความว่าจะศึกษาได้ทั้ง anaerobic respiration และ aerobic respiration สภาวะขาดออกซิเจน ทำโดยเลี้ยงยีสต์ในภาชนะปิด เช่น แซ็คคาโรมิเตอร์ (saccharometer) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งยีสต์จะถลายซูโครัสเป็นกลูโคส และต่อไปถึงไพรูเวต ตามวิถีไกลโคลิกิซิส จากนั้นถลายไพรูเวตได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ เอทิลแอลกอฮอล์ และการ์บอนไดออกไซด์ จึงจัดเป็น alcohol fermentation



รูปที่ 2.2 แซ็คคาโรมิเตอร์สำหรับศึกษาระบวนการแคแทบอลิชีนของซูโครัสผ่าน วิถีไกลโคลิกิซิส และ *alcohol fermentation*

ปริมาณแก๊สการบ่อนไฮดออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถวัดได้จากขีดบันทึกปริมาตร บน ปลายด้านปีกดังของแซ็คคาโรมิเตอร์

สารเคมี

1. ซูโกรส 30 เบอร์เช็นต์
2. สารละลายนโซเดียมฟลูออยด์ (sodium fluoride : NaF) 0.1 mol/dm³
(เตรียมใหม่ในวันที่ทำการทดลอง)
3. ยีสต์ 2 เบอร์เช็นต์ในน้ำ (Fischman's yeast เตรียมทันทีก่อนใช้)
4. พาราฟินเหลว
5. กระดาษพาราฟิล์ม

วิธีทดลอง

1. นำหลอดทดลองขนาด 30 cm³ และแซ็คคาวามิเตอร์ มาคลุ่มละ 4 อัน
2. ปีเปตต์สารต่าง ๆ ต่อไปนี้ลงในหลอดทดลองตามลำดับ ดังตารางข้างล่างนี้

ให้คนสารละลายนโซเดียมฟลูออยด์ให้ทั่ว ก่อนปีเปตต์ขึ้นมาใช้

สารที่เติม (cm ³)	หลอดที่	1	2	3	4
สารละลายนโซเดียมฟลูออยด์ 0.1 mol/dm ³	-	5.0	5.0	5.0	
น้ำกลั่น	-	-	0.5	1.0	
ยีสต์ 2 เบอร์เช็นต์ในน้ำ	6.0	1.0	0.5	-	
	8.0	8.0	8.0	8.0	

3. เมื่อเติมสารละลายนโซเดียมฟลูออยด์ในแต่ละหลอด ใช้กระดาษพาราฟิล์มปิดปากหลอด กลับหลอดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งจนสารละลายนโซเดียมฟลูออยด์ทั่วทั้งหลอด

4. เทสารผสมเนื้อดีบวกันลงไปในแซ็คคาวามิเตอร์ที่เตรียมไว้ทันที โดยอึบง แซ็คคาวามิเตอร์ให้สารผสมไหลจากทางที่ใส่สารไปสู่ปลายปิดของแซ็คคาวามิเตอร์นั้น และพยายามไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ในปลายปิดเลย หยดพาราฟินเหลวปิดพื้นที่หน้าตัด เริ่มจับเวลา หมายเหตุ หลังใส่ยีสต์แล้วปฏิริยาต่าง ๆ จะเริ่มขึ้นทันที ดังนั้นในข้อ 3 และ 4 การทำให้เสร็จในเวลาที่สั้นที่สุด

5. บันทึกปริมาณของแก๊สที่เกิดขึ้นในแซ็คคาโรมิเตอร์ทุก 10 นาที จนครบ 60 นาที นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างปริมาณของแก๊สที่เกิดขึ้นกับเวลา

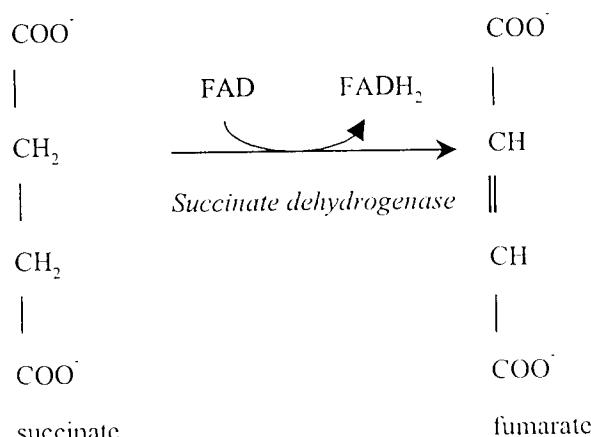
ตอบคำถามต่อไปนี้

1. จะมีวิธีทดสอบได้อย่างไรว่า แก๊สที่เกิดขึ้นเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
2. เหตุใดจึงต้องระวังไม่ให้มีฟองอากาศและหยดน้ำฟินเหลวทางปลายปลายของแซ็คคาโรมิเตอร์
3. การเติมโซเดียมฟลูออไรด์มีผลอย่างไร

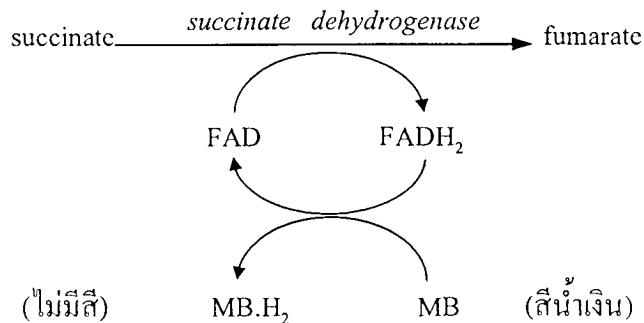
การทดลองที่ 2.2 การศึกษาปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ซัคซิเนตดีไซโตรเจนส์ (succinate dehydrogenase)

หลักการ

เมแทบอไลต์หลายชนิดในเซลล์สามารถถูกรีดิวช์โดยเอนไซม์จำพวกดีไซโตรเจนส์ให้ผลิตผลที่เป็น NADH, NADPH หรือ FADH₂ ในกรณีที่ปฏิกิริยาเหล่านี้เกิดในไซโทพลาซึม NADH, NADPH ที่ได้จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน หรืออาจถูกนำไปใช้ในไซโทคอนเดรียโดยระบบ shuttle ต่อไป แต่ถ้าปฏิกิริยาการผลิต NADH และ FADH₂ อยู่ในไซโทคอนเดรียจะมีการถ่ายโอนอิเล็กtronต่อไปให้ออกซิเจนตามลูกโซ่หายใจ สำหรับซัคซิเนตดีไซโตรเจนส์เป็นเอนไซม์ในวัฏจักรกระบวนการเปลี่ยนซัคซิเนตไปเป็นฟูมาเรต ดังปฏิกิริยา



โดยปกติ FADH_2 ที่เกิดขึ้นนี้จะถ่ายโอนอิเล็กตรอนต่อไปให้ออกซิเจนตามลูกโซ่ หายใจ แต่ในการทดลองนี้ เราใช้มีธิลีนบลู (methylene blue, MB) ซึ่งเป็นสารที่มีสีน้ำเงิน ในสภาพออกซิไซด์ และไม่มีสี (leucomethylene blue, MB.H₂) ในสภาพรีดิวชั่มน้ำเป็นตัวรับ อิเล็กตรอนต์จาก FADH_2 แทน (artificial electron acceptor) โดยวิธีนี้เราสามารถวัดอัตรา การฟอกของสีของ MB เป็น MB.H₂ แทนการวัดอัตราเร่งของซัคเซนต์ได้โดยจินเสในปฏิกิริยา จริง



สารเคมี

- สารละลายน้ำเดี่ยมซัคเซนต์ (sodium succinate) $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$
- กรดมาโนโนิก (malonic acid) $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$
- HgCl_2 $0.01 \text{ mol}/\text{dm}^3$ (เป็นสารพิษต่อร่างกาย ไม่ควรใช้ปากดูดบีบีต์)
- เมทิลีนบลู 0.01 เปอร์เซ็นต์
- พาราฟินเหลว
- ยีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ใน ๗ ໂครส ๕ เปอร์เซ็นต์ (ต้องไว้ในภาชนะเบิลและเขย่า สม่ำเสมอที่อุณหภูมิห้อง ๓ ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง)

วิธีทดลอง

- ปีเปต์สารต่างๆ ลงในหลอดทดลองทั้ง 6 หลอด โดยใส่สารละลายน้ำเดี่ยมยีสต์หลังสุด คนสารละลายน้ำเดี่ยมที่เตรียมไว้ให้เป็นเนื้ือเดียวกันก่อนปีเปต์ลงหลอดทดลอง

สารที่เติม (cm^3) \ หลอดที่	1	2	3	4	5	6
สารละลายน้ำโซเดียมซัคซิเนต $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$	-	0.5	0.5	1.0	1.5	0.5
กรดมาโนนิก $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$	-	-	0.5	0.5	0.5	-
$\text{HgCl}_2 0.01 \text{ mol}/\text{dm}^3$	-	-	-	-	-	0.5
เมทิลีนบลู $0.01 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$ เปรอร์เซ็นต์	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
น้ำกลั่น	2.0	1.5	1.0	0.5	-	1.0
บีสต์ 2 เปรอร์เซ็นต์ ใน โซโครส	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
5 เปรอร์เซ็นต์						

2. เขย่าสารละลายน้ำทุกหลอดให้เข้ากันดี เติมพาราฟินเหลว $4 - 5 \text{ ml}$ หยดในแต่ละหลอด แล้วห้ามเขย่าหลอดอีก ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง $20 \text{ }^\circ\text{C}$
3. สังเกตความแตกต่างของความเข้มสีเมทิลีนบลู โดยการใช้เครื่องหมาย $+$, $++$, ...
4. นำหลอดทดลองไปหมุนเหวี่ยง 10 min ดูดสารละลายน้ำที่หลอดชั้นล่างนำมาวัดความเข้มของสีโดยใช้เครื่องสเปกโโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 nm . โดยใช้น้ำกลั่นปรับศูนย์

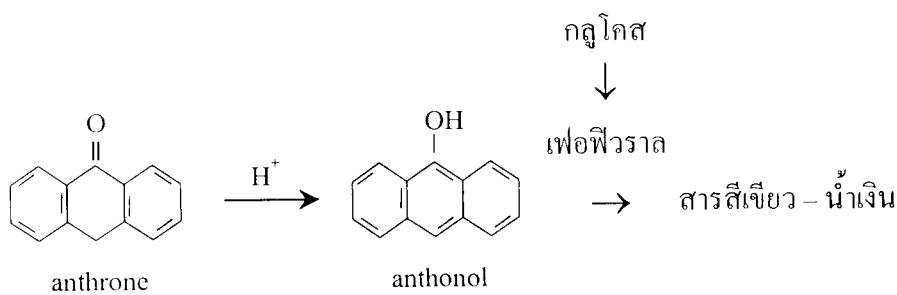
ตอบคำถามต่อไปนี้

1. เหตุใดจึงต้องหยดพาราฟินเหลวลงในหลอดทดลองทุกหลอด
2. การเติม HgCl_2 มีผลอย่างไรต่อซัคซิเนตดีไฮโดรเจนส์

การทดลองที่ 2.3 การแยกและหาปริมาณไกลโโคเจนจากตับ

หลักการ

การแยกไกลโโคเจนออกจากตับสามารถทำได้โดยการต้มกับด่างแก่ จะทำให้โปรตีนและสารประกอบอื่น ๆ ถูกกำจัดออกไปเหลืออยู่เฉพาะไกลโโคเจนซึ่งไม่ถูกลายด้วยด่าง จากนั้นตกละกอนแยกไกลโโคเจนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แล้วนำไปล้างด้วยกรดจะได้กลูโคส ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยทำปฏิกิริยากับ anthrone ในกรด ให้สารสีเขียวหรือสีน้ำเงิน ดังสมการ



สารเคมีและเครื่องมือ

1. ตับไก่ ตับหมู หรือตับวัว
2. สารละลายน้ำกลูโคสมานตรฐาน 0.1 mg/cm^3
3. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์
4. โซเดียมคลอไรด์ 0.5 mol/dm^3 ที่ เช่นน้ำแข็งไว้
5. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์
6. สารละลายน้ำ anthrone – H_2SO_4 เตรียมโดย :
 - ก. เตรียม H_2SO_4 72 เปอร์เซ็นต์ 1 dm^3 โดยบรรจุน้ำกลั่น 250 cm^3 ลงในบิกเกอร์ขนาดใหญ่ ซึ่งแช่เย็นไว้ในอ่างน้ำแข็ง ค่อยๆ เติม H_2SO_4 เข้มข้น 750 cm^3 ลงช้าๆ (ต้องทำในตู้ควันอย่างระมัดระวัง เพราะอันตราย) พร้อมทั้งค่อยๆ คนด้วยแท่งแก้ว (อย่าให้อุณหภูมิสูงกว่า 80°C)
 - ข. ภาຍใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 40°C ละลาย anthrone 0.5 g ใน H_2SO_4 72 เปอร์เซ็นต์ที่เตรียมไว้ 750 cm^3 จนจนกระทั้ง anthrone ละลาย นำไปปริมาณทั้งหมดเป็น 1 dm^3 ด้วย H_2SO_4 72 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือ สารละลายน้ำเก็บไว้ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ และต้องเก็บไว้ในตู้เย็น
7. เครื่องบดเนื้อ หรือ waring blender
8. ผ้าขาวบาง หรือผ้าก๊อช
9. อ่างน้ำแข็ง

วิธีทดลอง

ตอนที่ 1 วิธีแยกไกลโโคเจนจากตับ

1. ชั้งตับประมาณ 5 g ล้างในน้ำผึ้งสมน้ำแข็ง แล้วตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำมาเติมสารละลายน้ำแข็ง 16 cm³ และน้ำแข็ง 4 g จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด แล้วกรองผ่านผ้ากันซึ่งพับสี่ทับ สารละลายน้ำแข็งที่กรองได้นำไปหมุนเร็วที่ 4800 rpm เป็นเวลา 20 นาที
2. แบ่งสารละลายน้ำแข็งที่ได้มาเป็นห่วงๆ (อีกรีบหนึ่งให้เพื่อนอีกถุงหนึ่งใช้) เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 4 cm³ ในขณะที่แช่เย็นไว้
3. นำไปต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วทำให้เย็น
4. เติมสารละลายน้ำแข็ง 10 cm³ ผสมให้เข้ากันดี แล้วอุ่นในอ่างน้ำร้อนที่ 60 - 70 °C และคนด้วยแท่งแก้วเป็นเวลา 5 นาที
5. ทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง แล้วนำไปหมุนเร็วที่ประมาณ 4200 rpm เป็นเวลา 10 นาที

6. เทสารละลายน้ำแข็งที่ได้มาเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 10 cm³ คนให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเร็วที่ 4200 rpm เป็นเวลา 10 นาที
7. เทสารละลายน้ำแข็งที่ได้มาเติมของไกลโโคเจนมาละลายในน้ำกลั่น (อุ่นถ้าจำเป็น) ถ้ามีตะกอนให้นำไปหมุนเร็วอีกรีบหนึ่งที่ 4200 rpm เป็นเวลา 5 นาที

ตอนที่ 2 วิธีทดสอบสารละลายไกลโโคเจน

1. เตรียมสารละลายไกลโโคเจนที่เจือจาง 1 : 20 ประมาณ 4 cm³
2. เตรียมหลอดทดลอง 3 หลอด บรรจุด้วยสารละลายไกลโโคเจนเจือจาง 0.3, 0.5 และ 1.0 cm³ และอีก 3 หลอดบรรจุด้วยสารละลายกลูโคสมานาตรฐาน 0.3, 0.5 และ 1.0 cm³ เติมน้ำกลั่นจนปริมาณครึ่งแต่ละหลอดครบ 1.0 cm³
3. นำหลอดทั้งหมดไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมสารละลาย anthrone – H₂SO₄ 5 cm³
4. นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที แล้วทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง
5. อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 620nm โดยใช้สารละลาย anthrone – H₂SO₄

ตั้งจุดสูนย์

วิธีแสดงผลการทดลอง

1. ในการคำนวณควรเลือกใช้ปริมาตรของไกลโโคเจนและกลูโคสที่ใช้ทำการดูดกลืน แสงระหว่าง 0.1 ถึง 0.6 หน่วย จากนั้นใช้กฎบัญชีต่อไปนี้คำนวณความเข้มข้นของสารละลายไกลโโคเจน โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการละลายไกลโโคเจนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการละลายกลูโคสมาร์ฐาน

2. ค่าที่คำนวณได้จะต้องคูณด้วย 162 / 180 เพราะว่าอนุพันธุ์ของกลูโคสในไกลโโคเจนมีน้ำหนักโมเลกุล 162 แต่กลูโคสอิสระมีน้ำหนักโมเลกุล 180

ตอบคำถามต่อไปนี้

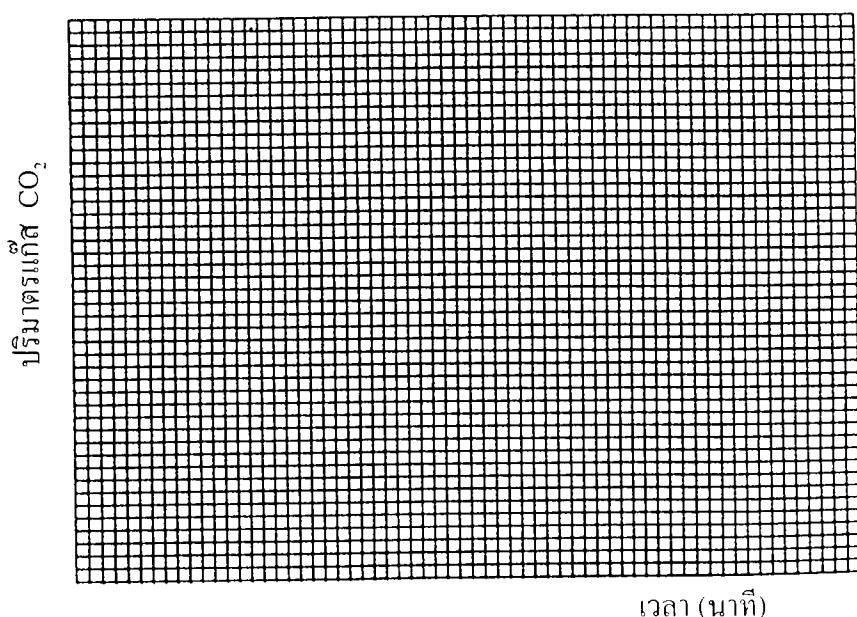
1. ตับ 5.0 g มีปริมาณไกลโโคเจนเท่าไร
2. ถ้าท่านจะใช้วิธี anthrone – H_2SO_4 วัดปริมาณไกลโโคเจนในสารละลายที่มีความเข้มข้น 10 mg/cm^3 จะต้องเจือจากกี่เท่าจึงได้ค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสม ถ้าใช้สารละลายไกลโโคเจนที่เจือจากนี้ 0.5 cm^3

บันทึกผลการทดลอง
บทปฏิบัติการที่ 2 ปฏิบัติการเรื่องการ์โนไฮเดรต

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 2.1 แคดແບບอลิซึมของชูโกรสในสภาพะขาดออกซิเจน

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่	ปริมาณ (ml)			
		1	2	3	4
สารละลายชูโกรส 30 เปอร์เซ็นต์		-	5.0	5.0	5.0
สารละลายโซเดียมฟลูออไรด์ $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$		-	-	0.5	1.0
น้ำกลั่น		6.0	1.0	0.5	-
บีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ		8.0	8.0	8.0	8.0
ปริมาตร CO_2 ที่เกิดขึ้นที่ 10 นาที					
ที่ 20 นาที					
ที่ 30 นาที					
ที่ 40 นาที					
ที่ 50 นาที					
ที่ 60 นาที					

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาตรของแก๊สกับเวลา หลอด 1 – หลอด 3



วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

.....

ตอบคำถาม

1. วิธีทดสอบว่าแก๊สที่เกิดขึ้นเป็น CO_2 คือ

.....

.....

.....

.....

2. เหตุที่ต้องระวังไม่ให้มีฟองอากาศ และหยดพาราฟินเหลวทางปลายปากของหลอดเชือกคาวามิเตอร์ เพราะ

.....

.....

.....

.....

3. การเติมโซเดียมฟลูออไรด์มีผลคือ

.....

.....

.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 2.2 การศึกษาปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ซัคซิเนตคีไซโตรเจนส์

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่						
		1	2	3	4	5	6
สารละลายนโซเดียมซัคซิเนต $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$	-	0.5	0.5	1.0	1.5	0.5	
กรดมาโนนิก $0.1 \text{ mol}/\text{dm}^3$	-	-	0.5	0.5	0.5	-	
HgCl_2 $0.01 \text{ mol}/\text{dm}^3$	-	-	-	-	-	0.5	
เมทิลีนบลู $0.01 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
น้ำกลั่น	2.0	1.5	1.0	0.5	-	1.0	
บีสต์ 2 เปอร์เซ็นต์ในชูโครส 5 เปอร์เซ็นต์	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
ความเข้มของสีเมทิลีนบลู							
A_{600}							

วิจารณ์ผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง.....

.....

.....

.....

.....

.....

ตอบคำถาม

1. เนตุที่จึงต้องหยดพาราฟินเหลวลงในหลอดทดลองทุกหลอด เพราะ

.....
.....
.....

2. การเติม $HgCl_2$ มีผลต่อซัคซิเนตดีไฮโดรเจนส์ คือ

.....
.....
.....

บันทึกผลการทดลองที่ 2.3 การแยกและหาปริมาณไกลโคเจนจากตับ

ตอนที่ 1 วิธีแยกไกลโคเจนจากตับ

ลักษณะของไกลโคเจนที่แยกได้

.....
.....
.....

ตอนที่ 2 ตารางบันทึกผลการทดลองวิธีทดสอบสารละลายไกลโคเจน

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่					
	1	2	3	4	5	6
ไกลโคเจนเจือจาง	0.3	0.5	1.0			
สารละลายกลูโคสมาร์ชัวน์				0.3	0.5	1.0
น้ำகல்லு	0.7	0.5	-	0.7	0.5	-
← แซ่บในอ่างน้ำแข็ง →						
สารละลาย anthrone - H_2SO_4	5	5	5	5	5	5
← ต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที →						
A_{620}						

วิธีคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายไกลโคเจน

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

บทปฎิบัติการที่ 3

ปฎิบัติการเรื่อง โปรตีน

วัตถุประสงค์

เพื่อสกัดและศึกษาสมบัติของสารบางด้า

บทนำ

โปรตีนจากอาหารจะถูกย่อยโดย酵母เอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้ให้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) กรดอะมิโนที่ได้นี้จะถูกดูดซึมเข้าหลอดเลือดที่ดำไส้เล็กและถูกนำไปที่ตับประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนจะใช้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนที่ร่างกายต้องการส่วนอีก 25 เปอร์เซ็นต์ใช้สำหรับเป็นพลังงานหรือสร้างสารอื่น

การทดลองที่ 3.1 การแยกและศึกษาคุณสมบัติของไซโตโครม ซี จากหัวใจหมู

โปรตีนไซโตโครม ซี มีบทบาทสำคัญในกระบวนการถูกไฟฟ้า化的 (respiratory chain) ซึ่งจะสร้างพลังงานในรูปของ ATP จาก NADH ที่ได้ในการสลายสารอาหาร เช่น กลูโคสไซโตโครม ซี เป็นโปรตีนสีแดง เพราะว่ามีหมู่ชิมติดอยู่ด้วย ในการทดลองนี้จะแยกไซโตโครม ซี ออกจากโปรตีนอื่น ๆ โดยใช้วิธี ion – exchange chromatography เมื่อแยกได้แล้ว จะศึกษาคุณสมบัติทางการคุณภาพของไซโตโครม ซี

ตอนที่ 1 การแยกไซโตโครม ซี จากหัวใจหมู

หลักการ

การแยกไซโตโครม ซี มีความสะดวกหลายประการ ไซโตโครม ซี ละลายได้ดีในน้ำ มีปริมาณมากในเนื้อเยื่อที่ใช้ออกซิเจน เช่น หัวใจ นอกเหนือนี้ไซโตโครม ซี มองเห็นได้ง่าย เพราะมีสีแดง และแยกออกจากโปรตีนอื่น ๆ ได้ง่ายโดยอาศัยประจุ เนื่องจากว่ามี isoelectric point สูง (ประมาณ pH 10) การทดลองนี้จะใช้ ion – exchange chromatography โดยมี carboxymethyl – cellulose (CM – cellulose ; cellulose – CH₂ – COO⁻) เป็นตัว载体จุนบรรจุอยู่ในหลอดแก้วที่ pH เป็นกลาง (pH 7 – 8) ไซโตโครม ซี จะมีประจุเป็นบวกและสามารถจับกับ CM – cellulose

โดยอาศัยแรงดึงดูดระหว่างประจุตรงกันข้าม จึงแยกออกจากโปรตีนที่มี pI เป็นกลาง เช่น ไฮโกลบินได้ เพราะโปรตีนเหล่านั้นจะไม่สามารถจับกับ CM-cellulose ได้ เมื่อชีดล้างโปรตีนอีน ๆ ออกแล้ว จึงเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เพื่อชีดล้างไซโตโครม ซึ่ง ออกจากการหลอดแก้ว

สารเคมีและเครื่องมือ

1. หัวใจหมูสด ๆ
2. กรดซัลฟิริก หรือกรดกำมะถัน (sulfuric acid ; H_2SO_4) $0.5 \text{ mol}/dm^3$
3. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide ; NH_4OH) $4 \text{ mol}/dm^3$
4. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $0.025 \text{ mol}/dm^3$, $pH 7.5$ เตรียมโดย : เตรียมสารละลาย Na_2HPO_4 $0.025 \text{ mol}/dm^3$ และสารละลาย Na_2HPO_4 $0.025 \text{ mol}/dm^3$ บรรจุสารละลาย Na_2HPO_4 ในบีเกอร์ แล้วเติมสารละลาย NaH_2PO_4 ลงไปทีละน้อย ๆ ขณะที่คนอยู่เรื่อย ๆ จนได้ pH ที่ต้องการ
5. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $0.075 \text{ mol}/dm^3$, $pH 7.5$ เตรียมโดย : เตรียมสารละลาย Na_2HPO_4 $0.075 \text{ mol}/dm^3$ และสารละลาย Na_2HPO_4 $0.075 \text{ mol}/dm^3$ บรรจุสารละลาย Na_2HPO_4 ในบีเกอร์ แล้วเติมสารละลาย NaH_2PO_4 ลงไปทีละน้อย ๆ ขณะที่คนอยู่เรื่อย ๆ จนได้ $pH 7.5$
6. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $0.2 \text{ mol}/dm^3$, $pH 7.5$ เตรียมโดย : เตรียมสารละลาย Na_2HPO_4 $0.2 \text{ mol}/dm^3$ และสารละลาย NaH_2PO_4 $0.2 \text{ mol}/dm^3$ บรรจุสารละลาย Na_2HPO_4 ในบีเกอร์ แล้วเติมสารละลาย NaH_2PO_4 ลงไปทีละน้อย ๆ ขณะที่คนอยู่เรื่อย ๆ จนได้ $pH 7.5$
7. Carboxymethyl – cellulose ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $0.025 \text{ mol}/dm^3$, $pH 7.5$ เตรียมโดย : ค่อย ๆ เติมผง carboxymethyl – cellulose ลงในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $0.2 \text{ mol}/dm^3$, $pH 7.5$ ขณะที่คนอยู่เรื่อย ๆ ควรใช้ปริมาตรบัฟเฟอร์ประมาณ 4 เท่าของเรซินหลังจากพองตัวแล้ว ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วกรองผ่าน Buchner funnel เพื่อคัดบัฟเฟอร์ออกหรืออาจปล่อยให้เรซินอัดบรรจุลงเอง แล้วเทหรือคัดบัฟเฟอร์ออก เติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $0.2 \text{ mol}/dm^3$, $pH 7.5$ ในปริมาตรเท่าเดิม คนให้สมกัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงกรองหรือคัดบัฟเฟอร์ออกเช่นเดิม ใช้วิธีล้างเรซินด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $0.2 \text{ mol}/dm^3$, $pH 7.5$ อีก 2 – 3 ครั้ง หรือจน pH ของบัฟเฟอร์ที่คัดออกมีค่าเท่ากับ 7.5 จากนั้nl ล้างเรซินด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ $0.025 \text{ mol}/dm^3$, $pH 7.5$ อีก 4 – 5 ครั้ง ด้วยปริมาตรเท่ากัน หรือจน ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่คัดออกมีค่าเท่ากับ ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้าง

8. ผ้าก๊อช กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 54
9. หลอดแก้วหรือคอลัมน์ (column) สำหรับโคมาราฟี ขนาด 1.5×10 cm หรืออาจใช้บิวเรต์ ขนาด 25 cm^3 แทนก็ได้
10. กระดาษวัด pH
11. ไบแก้ว (glass wool), สายยาง และฐานสำหรับยึดหลอดแก้ว
12. ถุงโป่ง (ถ้ำจำเป็น)

วิธีทดลอง

1.1 วิธีสักดิ์ไซโตโครม ซี จากหัวใจหมู

1) นำหัวใจหมู 20 g. มาดคให้ลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก แล้วบรรจุในบีเกอร์ขนาด 100 cm^3 เติมน้ำกลัน 40 cm^3 ลงไป แล้วคนให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 4.1 (วัด pH ด้วยกระดาษวัด pH) โดยค่อยๆ เติมกรดกำมะถัน แล้วคนอยู่ๆ ร่องๆ

2) นำไปกรองผ่านผ้าก๊อช แล้วปรับ pH ของน้ำกรองที่ได้ ให้ได้ประมาณ pH 7 โดยค่อยๆ เติมน้ำยาเอนโนเมเนีย แล้วคนอยู่ๆ ร่องๆ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3) นำไปกรองผ่านกระดาษกรองชี้พับเย็บ (fluted filter paper) โดยเทน้ำที่กรองลงในกระบอกน้ำ แล้วจึงเติมตะกอนลงไว้ที่หลัง ถ้าตะกอนลงไว้จะทำให้กระดาษกรองอุดตันเร็ว เอาน้ำกรองที่ได้ประมาณ 5 cm^3 ไปผ่านหลอดแก้ว

1.2 วิธีเตรียมหลอดเรซิน

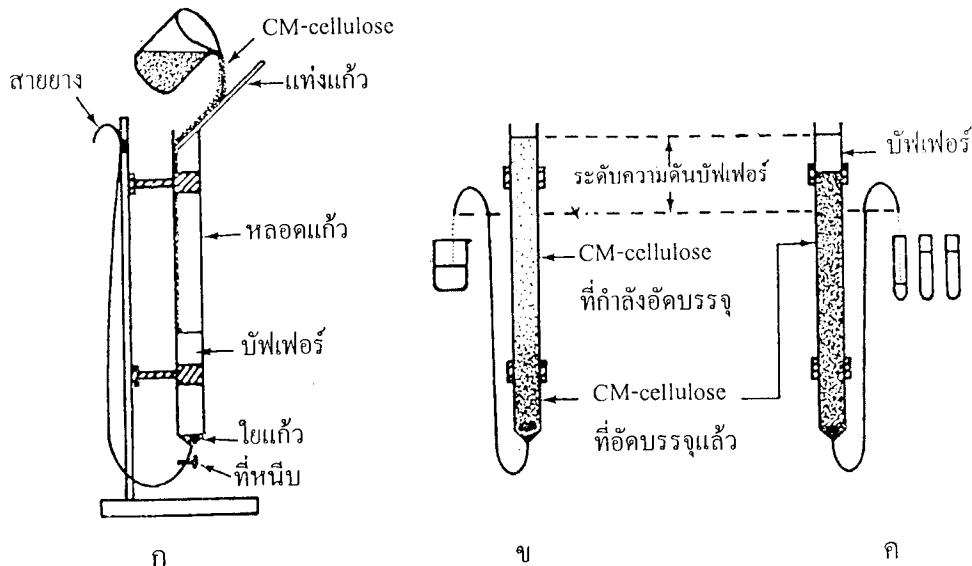
ในขณะสักดิ์หัวใจหมูอยู่ ควรเตรียมหลอดแก้วพร้อมกันไว้ด้วย (ดังรูปที่ 3.1)

1) นำสายยางมาต่อปลายหลอดแก้ว ตั้งหลอดแก้วให้ตรงโดยใช้ฐานยึดไว้ ต่อไปยกปลายสายยางให้สูงเพื่อกันไม่ให้น้ำไหลออกได้ แล้วใช้เทปปิดไว้

2) เทบฟเฟอร์ลงไว้ให้ระดับสูงประมาณ $1/3$ ของความยาวของหลอดแก้ว แล้วบรรจุไบแก้วที่เปียกชุ่มด้วยบับฟเฟอร์เพื่ออุดปลายหลอดแก้ว

3) ผสม MC-cellulose 15 cm^3 กับโซเดียมฟอสฟे�ตบับฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 15 cm^3 ในบีเกอร์ แล้วจึงเทส่วนผสมนั้นลงไว้ในหลอดแก้ว โดยอาศัยเท่งแก้ว ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจึงปล่อยให้น้ำฟเฟอร์ไหลออกจากปลาย โดยดึงปลายสายยางลงมา

4) ค่อยๆ เติมส่วนผสม MC-cellulose จนกว่าได้ตัวคำญุนที่อุดบรรจุแล้วสูงประมาณ $7 - 8 \text{ cm}$ ภายในหลอดแก้ว จึงปิดปลายหลอดแก้ว โดยยกปลายสายยางให้สูงกว่าระดับบับฟเฟอร์ภายในหลอดแก้ว



รูปที่ 3.1 วิธีเตรียมหลอดเรซิน

ก. เท CM-cellulose

ข. CM-cellulose กำลังอัดบรรจุ

ค. CM-cellulose พร้อมสำหรับทำงาน

1.3 วิธีแยกไซโตรกรรม ซี จากอีโนโกลบิน

1) เมื่อหลอดแก้วพร้อมแล้ว ปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลออกเกือบหมด จึงค่อย ๆ เท หรือปีเปตต์น้ำกรองจากหัวใจหมุลงไปโดยระวังไม่ให้กระทบกระเทือนผิวของตัวจำจุน เริ่มเก็บสารละลายที่ไหลออกจากหลอดแก้วลงในหลอดทดลองด้วยปริมาตร 5 cm^3 ต่อหลอด โดยปล่อยให้สารละลายไหลผ่านหลอดแก้วจนหมดในอัตราความเร็วประมาณ $2 - 3 \text{ cm}^3$ ต่อนาที ถ้าอัตราความเร็วช้าเกินไปอาจเพิ่มได้โดยเอาปลายของลูกป้องที่ป่าแล้วมาสูบที่ปลายบนของหลอดแก้ว ความดันอากาศในลูกป้องจะช่วยทำให้สารละลายไหลผ่านเร็วขึ้น

2) ฉะล้างหลอดแก้วต่อด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 15 cm^3 เก็บสารละลายต่อไปเรื่อย ๆ โปรตีนสีแดงที่ออกมากในขณะที่เทน้ำกรองหรือล้างด้วย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 นั้นไม่ใช่ไซโตรกรรม ซี แต่เป็นอีโนโกลบิน

3) เมื่อล้างโปรตีนอื่น ๆ ออกแล้ว จึงฉะล้างไซโตรกรรม ซี ออกจากหลอดแก้ว ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.075 mol/dm^3 จำนวน 25 cm^3

4) นำสารละลายน้ำที่เก็บได้ในแต่ละหลอดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 410 nm ซึ่งเป็นคลื่นแสงที่ไซโตโครม ซี ในสภาพออกซิไดส์หรือสภาพรีดิวช์ดูดกลืนแสงได้เท่ากัน

5) เก็บสารละลายน้ำไซโตโครม ซี ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด 3 – 4 หลอดแล้วเช่นนี้ไว้สำหรับใช้ในการทดลองที่ 3.1 ตอนที่ 2 และการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 1

วิธีแสดงผลการทดลอง

เขียนกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงและเบอร์หลอดทดลองที่เก็บสารละลายน้ำจากหลอดแก้ว

ตอนที่ 2 การดูดกลืนแสงของไซโตโครม ซี

หลักการ

ในกระบวนการลูกโซ่หายใจมีการออกซิเดชัน-รีดักชันของหมู่ชิมในไซโตโครมต่าง ๆ ซึ่งจะเกิดขึ้นโดยการเปลี่ยนแปลงของธาตุเหล็กในหมู่ชิม ระหว่างสภาพ Fe^{+++} และสภาพ Fe^{++} ในการทดลองต่อไปจะศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงของสภาพธาตุเหล็กต่อคุณสมบัติทางการดูดกลืนแสงของหมู่ชิมในไซโตโครม ซี

สารเคมี

1. สารละลายน้ำไซโตโครม ซี (จากการทดลองที่ 3.1 ตอนที่ 1)
2. โพแทสเซียมเฟอไรไซยาไนด์ (potassium fericyanide) ; $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
0.01 mol/dm³
3. เกล็ดโซเดียมไดไฮดรอไนต์ (sodium dithionite)

วิธีทดลอง

1. เลือกหลอดทดลองที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดจากการทดลองที่ 3.1 ตอนที่ 1 นำสารละลายน้ำไซโตโครม ซี นั้นไปบรรจุในหลอดทดลองสองหลอด ถ้าจำเป็นให้เจือจากด้วยน้ำจันได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm ประมาณ 0.5 และปริมาตรสูดท้ายเป็น 3 cm³

2. เติมสารละลายน้ำอะมิโนไซด์ไธโอดีบีน 0.1 cm³ ลงไปในหลอดทดลองหนึ่งเพื่อออกซิไดส์ไซโตโครม ซี และเติมโซเดียมไดไทโอดีน 200 mg ลงไปในอีกหลอดหนึ่งเพื่อรีดิวช์ไซโตโครม ซี

3. นำทั้งสองหลอดไปหาสเปกตรัม โดยวัดการดูดกลืนแสงที่คลื่นแสงต่าง ๆ ทุก ๆ 5 nm ระหว่าง 390 ถึง 425 nm

วิธีแสดงผลการทดลอง

เขียนกราฟเพื่อแสดงการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงกับคลื่นแสง สำหรับไซโตโครม ซี ในสภาพรีดิวช์และในสภาพออกซิไดส์

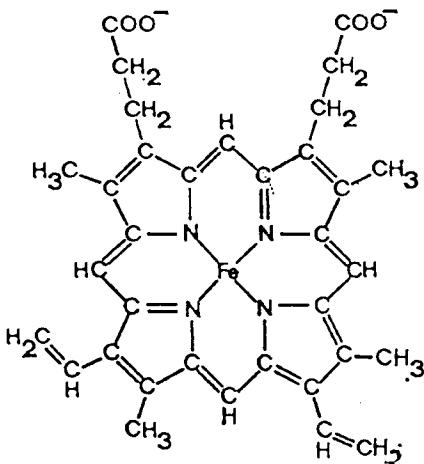
ตอบคำถามต่อไปนี้

1. ในการจะใช้ไซโตโครม ซี ออกมานอกหลอดแก้วบรรจุ CM - cellulose ถ้าใช้บัฟเฟอร์ pH 6.5 แทนบัฟเฟอร์ pH 7.5 จะต้องใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้หรือไม่ เพราะเหตุใด

2. จากการเขียนกราฟเปรียบเทียบการดูดกลืนแสงของไซโตโครม ซี ในสภาพรีดิวช์และสภาพออกซิไดส์ ไซโตโครม ซี ในสองสภาพนี้มีค่าการดูดกลืนแสงมากที่คลื่นแสงเดียวกันหรือไม่

การทดลองที่ 3.2 คุณสมบัติของฮีโมโกลบิน

โปรตีนส่วนใหญ่ในเม็ดเลือดแดงเป็นฮีโมโกลบิน ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการขนส่งออกซิเจนจากปอดไปสู่กล้ามเนื้อ ฮีโมโกลบินประกอบด้วยหน่วยย่อยสี่หน่วย สองหน่วยเป็นชนิดแอลฟ่า (α - subunit) และอีกสองหน่วยเป็นชนิดบีตา (β - subunit) แต่ละหน่วยมีสายพेनไทด์หนึ่งสายชนิดแอลฟาร์หรือชนิดบีตา และออกจากรากนี้ยังมีส่วนหนึ่งที่ไม่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโน ส่วนของโปรตีนที่ไม่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนนี้เรียกว่า prosthetic group หน่วยย่อยของฮีโมโกลบินมีหนึ่ง hemc (ครูปที่ 3.2) เป็น prosthetic group ไอออน Fe^{++} ในหมู่ชิมันน์ทำหน้าที่ในการจับออกซิเจน



รูปที่ 3.2 โครงสร้างของหมู่ชีม (heme)

ตอนที่ 1 การแยกอีมและโกลบินออกจากกัน

หลักการ

prosthetic group ในโปรตีน บางที่จะถูกยึดโดยพันธะโควาเลนต์ เช่น หมู่ชีมในไซโตโกรน ซึ่งแต่บางที่อาจยึดด้วยแรงที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ เช่น หมู่ชีมในฮีโมโกลบิน ในกรณีที่ไม่มีพันธะโควาเลนต์ยึด prosthetic group ไว้เราสามารถแยกสายเพบทาค์และ prosthetic group ออกจากกันได้ สำหรับฮีโมโกลบินถ้าเติมกรดจะทำให้หน่วยย่อยแยกออกจากกันแล้ว ไม่สามารถยึดหมู่ชีมเอาไว้ ถ้าทำการทดสอบในอะซีโคน จะทำให้สายเพบทาค์แตกตะกอน จึงแยกออกมาได้

สารเคมีและเครื่องมือ

- สารละลายน้ำในโกลบิน เตรียมได้โดยเติมน้ำกลั่น 9 ส่วน ลงในเม็ดเดือดแดง 1 ส่วน แล้วปล่อยให้เม็ดเดือดแดงแตก เขย่าให้สมกัน นำไปหมุนให้วิงและเอาสารละลายน้ำใส่ที่ได้มานำใช้สำหรับการทดสอบ
- สารละลายไซโตโกรน ซึ (จากการทดสอบที่ 3.1 ตอนที่ 1)
- อะซีโคน
- กรดไฮโดรคลอริกหรือกรดเกลือเข้มข้น

5. กระดาษกรอง Whatman เปอร์ 2 หรือเบอร์ 3

6. Buchner funnel

วิธีการทดลอง

1. บรรจุอะซีโตน 100 cm^3 ลงในคนโภแก้วขนาด 250 cm^3 เติมกรุงเกลือเข้มข้น 0.25 cm^3 แล้วผสานให้ดี จึงค่อยๆ เติมสารละลายอะมิโนโกลบิน 10 cm^3 จากปีเปตต์ในอัตราเร็ว หนึ่งหยดต่อวินาที และค่อยๆ เขย่าให้ผสานกันทุกครั้งที่หยด

2. เตรียม Buchner funnel ซึ่งบรรจุด้วยกระดาษกรอง ล้างกระดาษกรองด้วย อะซีโตน แล้วรองตะกอนโกลบินที่ได้ออก ถ้าไม่มี Buchner funnel อาจรองแบบธรรมชาติโดยใช้กระดาษกรองที่พับเป็นจีบแทนได้ ล้างตะกอนด้วยอะซีโตนจนไม่มีสีแดงติดอยู่ แล้วดูดให้แห้ง ถ้าใช้ช้อนตักสาร (sputula) ขี้ตะกอนจะทำให้แห้งเร็วขึ้น

3. เก็บตะกอนและน้ำกรองไว้ใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

4. ทำการทดลองซ้ำ โดยใช้สารละลายไโซโคลอม ซึ่งแยกจากหัวใจหมูแทนสารละลายอะมิโนโกลบิน

ตอนที่ 2 การย่อโยกโกลบินด้วยค่าง

หลักการ

ถ้าย่อโยกโปรตีนด้วยกรดหรือค่าง พันธะเพบทามที่จะสถาบัน ทำให้ได้กรดอะมิโนอิสระซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ต่อได้ด้วยวิธี ion – exchange chromatography ในเครื่อง amino acid analyser กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีน (amino acid composition) ที่คำนวณได้ด้วยวิธีนี้ เป็นค่าคงที่สำหรับโปรตีนแต่ละชนิด แต่อาจมีค่าแตกต่างกันมากสำหรับโปรตีนชนิดต่างๆ เช่น กรดอะมิโนไลซีนอาจมีอยู่ในอัตราส่วน 1 ถึง 25 หน่วยต่ogrดอะมิโน 100 หน่วย แล้วแต่ชนิดของโปรตีน โดยปกติแล้วจะใช้กรดในการย่อโยกโปรตีน เพราะว่าถ้าใช้ค่างจะทำให้กรดอะมิโนหลุดชนิดถูกทำลายไป แต่ในการทดลองนี้จะใช้ค่างเพราะว่าการย่อโยกค่างด่างทำได้รวดเร็วกว่า และทดสอบกรดอะมิโนที่ได้โดยทำปฏิกิริยา กับนินไฮดริน (ninhydrin)

สารเคมีและเครื่องมือ

1. พงโปรตีนโกลบิน (จากการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 1)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 mol/dm^3
3. กรดน้ำส้ม หรือกรดอะซิติก 33 เปอร์เซ็นต์
4. สารละลายนินไฮคริน $0.2 \text{ เปอร์เซ็นต์ในเอทานอล } 95 \text{ เปอร์เซ็นต์}$
5. กระดาษวัด pH ในช่วง pH $4 - 7$
6. อ่างน้ำเดือด

วิธีทดลอง

1. บรรจุโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในหลอดทดลองสองหลอด หลอดละ 2 cm^3 เติมพงโกลบินประมาณ 50 mg ลงไปเฉพาะในหลอดที่หนึ่ง แล้วเขย่าให้ละลาย นำหลอดทั้งสองไปต้มให้เดือดประมาณ 20นาที จึงเติมกรดน้ำส้มลงในแต่ละหลอด ทีละหยด เพื่อปรับ pH ให้ได้ประมาณ 4.6

2. เตรียมหลอดทดลองอีกหลอดหนึ่งบรรจุพงโกลบิน 50 mg ละลายในน้ำ 2 cm^3 และถ้าจำเป็น ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 4.6 โดยเติมกรดหรือค้าง

3. เติมสารละลายนินไฮคริน 1 cm^3 ลงในทั้งสามหลอด แล้วนำไปต้มให้เดือดหนึ่งนาที สังเกตดูสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น แล้วเปรียบเทียบสีในหลอดทั้งสาม

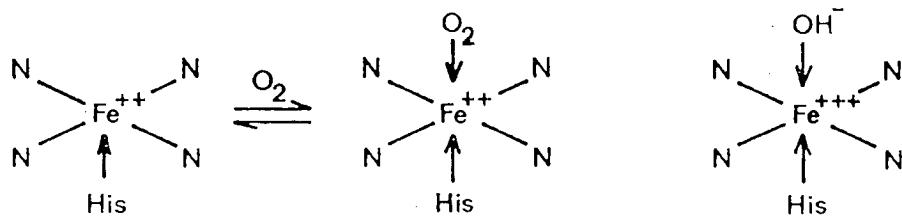
ตอนที่ 3 การดูดกลืนแสงของฮีโมโกลบิน

หลักการ

ในธรรมชาติธาตุเหล็กในฮีโมโกลบินอยู่ในสภาพ Fe^{++} เสมอ และมี coordination number เท่ากับ 6 เช่นเดียวกับเพอโรไฮยาไนต์ (ferrocyanide) หรือเพอโรไฮยาไนต์ ในฮีโมโกลบิน ไอออน Fe^{++} จะมีสิ่งพันธุ์กับ porphyrin ring ของหมูอีน (รูปที่ 3.3) และอีกหนึ่งพันธุ์กับหมูอีสทิดีนของสายเพนไทย ฉะนั้นจะเหลืออิเล็กทรอนหนึ่ง valency สำหรับออกซิเจน (รูปที่ 3.3 ก) เมื่อออกซิเจนจับที่ตำแหน่งที่หกจะได้ออกซิไฮเมโนโกลบิน (รูปที่ 3.3 ข)

ในธรรมชาติ แต่ละหน่วยย่อยแอลฟารีบีต้า อาจอยู่ในหนึ่งจากสองสภาพนี้ถ้า อะตอมเหล็กถูกออกซิไดส์ให้เป็น Fe^{+++} ในสภาพที่เป็นค่าง จะได้เมตฮีโมโกลบิน (รูปที่ 3.3 ค)

ซึ่งไม่สามารถจับออกซิเจนได้ และไม่พนในธรรมชาติดินออกจากในคนไข้บางรายที่มีชีโโมโนกลบินผิดปกติ จะนั่นการทำงานของชีโโมโนโนกลบินผิดแยกจากการทำงานของไซโตโกร姆 ซึ่งจะเปลี่ยนระหว่างสภาวะ Fe^{++} และสภาวะ Fe^{+++}



ก. ดีออกซีชีโโมโนโนกลบิน

ข. ออกซีชีโโมโนโนกลบิน

ค. เมตชีโโมโนโนกลบิน

รูปที่ 3.3 สภาวะต่างๆ ของหมู่ชีนในชีโโมโนโนกลบิน

สารเคมี

- สารละลายน้ำชีโโมโนโนกลบิน (จากการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 1)
- เกล็ดโซเดียมไดไทโอลอินต์, เกล็ดโพแทสเซียมเฟอไรไซยาไนต์
- โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 , pH 7.0 เตรียมเหมือนโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 pH 7.5 แต่ปรับ pH ตามต้องการ

วิธีทดลอง

- บรรจุสารละลายน้ำชีโโมโนโนกลบิน ไส่หลอดทดลองสามหลอด หลอดละ 0.2 cm^3 แล้วเจือจางด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 , pH 7.0 จำนวน 5.8 cm^3 เตรียมหลอดทดลองอีกสามหลอดแต่ละหลอดบรรจุด้วยน้ำฟเฟอร์ 6 cm^3 เพื่อใช้เป็นหลอดเปรียบเทียบ

- นำสารละลายน้ำชีโโมโนโนกลบินหลอดแรกไปวัดการดูดกลืนแสงของออกซีชีโโมโนโนกลบินระหว่าง $520\text{-}580 \text{ nm}$ ทุกๆ 5 nm โดยใช้บัฟเฟอร์หลอดแรกตั้งชุดศูนย์

- เติมโพแทสเซียมเฟอไรไซยาไนต์ 0.025 mol/dm^3 100 mg ลงในสารละลายน้ำชีโโมโนโนกลบินหลอดที่สองและบัฟเฟอร์หลอดที่สอง แล้ววัดการดูดกลืนแสงของเมตชีโโมโนโนกลบินที่เกิดขึ้นระหว่าง $520\text{-}580 \text{ nm}$

- เติมโซเดียมไดไทโอลอินต์ 100 mg ลงในสารละลายน้ำชีโโมโนโนกลบินหลอดที่สาม และบัฟเฟอร์หลอดที่สาม แล้ววัดการดูดกลืนแสงของดีออกซีชีโโมโนโนกลบินที่เกิดขึ้นในช่วงคลื่นแสง

เดียวกัน ควรระวังไม่ตั้งสารละลายดีออกซีไฮโกลบินไว้นานก่อนวัดการดูดกลืนแสง เพราะว่า ดีออกซีไฮโกลบินอาจถูกเปลี่ยนกลับเป็นออกซีไฮโกลบินได้เมื่อจับออกซิเจนจากอากาศ

วิธีแสดงผลการทดลอง

เขียนกราฟการดูดกลืนแสงของไฮโกลบินทั้งสามสภาพกลับคลื่นแสง ลงในกระดาษแผ่นเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบ

ตอนที่ 4 เจลฟิลเทอร์ชัน (gel filtration)

หลักการ

เจลฟิลเทอร์ชันเป็นวิธีที่ดีสำหรับแยกสารต่าง ๆ เช่น โปรตีนที่มีขนาดไม่เหมือนกัน ทั้งนี้ เพราะว่าไม่เลกุลใหญ่ไม่สามารถผ่านเข้าอนุภาคของเจลได้ จึงออกจากทางหลอดเจลได้เร็วกว่าไม่เลกุลเล็กซึ่งสามารถเข้าภายในอนุภาคของเจลได้ นอกจากประโพชน์ใน การแยกสารต่าง ๆ แล้ว เจลฟิลเทอร์ชันยังมีประโพชน์ในการนำโปรตีนมาทำปฏิกิริยากับสารไม่เลกุลเล็ก ในการทดลองนี้จะใช้เจลฟิลเทอร์ชันในการทำปฏิกิริยาระหว่างเมตหีไฮโกลบินกับโซเดียมไฮโดโรไซด์ ดีออกซีไฮโกลบินที่เกิดขึ้นจะจับกับออกซิเจนในขณะที่ผ่านหลอดเจล จึงได้ออกซีไฮโกลบินออกมายจากปลายหลอดเจล ตัวค้างอยู่ในการทดลองนี้คือ sephadex G-25 ซึ่งไม่เลกุลขนาดใหญ่กว่า 700 ดาลตันจะผ่านเข้าภายในอนุภาคของเจลไม่ได้

สารเคมีและเครื่องมือ

1. สารละลายไฮโกลบิน (จากการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 1)
 2. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 , pH 7.0
 3. sephadex G-25 ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 , pH 7.0 แข็งไว้ อายุน้อย 4 ชั่วโมง ก่อนการทดลอง
 4. ผงโซเดียมไฮโดโรไซด์
 5. เกลือดไพรเทสเซียมเพโอไรไซยาไนด์
 6. หลอดแก้วหรือถ้วยลามน์ ขนาด $1.5 \times 10 \text{ cm}$ หรืออาจใช้บิวเรตต์ขนาด 25 cm^3
- แทนก็ได้

7. อุปกรณ์อื่น ๆ สำหรับโปรแกรมโทกราฟในหลอดแก้ว เช่น สายยาง ไบแก๊วและฐานยึดหลอดแก้ว เป็นต้น

วิธีทดลอง

1. บรรจุไบแก๊วชิ้นเล็กที่เปียกชุ่มด้วยบัฟเฟอร์ใส่ปลายหลอดแก้วเทโขเดียมฟอสฟेटบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 ลงไปประมาณ 7 cm^3 แล้วจึงแท็คตัวค้ำจุน sephadex G-25 ผสมกับบัฟเฟอร์ลงไปจนได้ตัวค้ำจุนที่อัดบรรจุแล้วสูงประมาณ 8 cm ตามรายละเอียดที่ได้กล่าวไว้แล้ว (วิธีเตรียมหลอดเรซินในการทดลองที่ 3.1 ตอนที่ 1) ควรระวังอย่าให้ส่วนผสมค้ำจุนกับบัฟเฟอร์เข้มข้นเกินไป มิฉะนั้นจะมีฟองอากาศติดอยู่ในหลอดเจล

2. เมื่อตัวค้ำจุนอัดบรรจุเรียบร้อยแล้ว ถางหลอดเจลด้วยบัฟเฟอร์ 15 cm^3 แล้วปล่อยให้ระดับบัฟเฟอร์ลดลง慢慢สูงกว่าผิวเจลเพียงเล็กน้อย

3. เตรียมสารละลาย 10 mg/cm^3 ของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต หันที่ที่เตรียมเสร็จค่อยๆ ปีปект์สารละลายนี้ลงไป 0.2 cm^3 โดยระวังไม่ให้กระทบกระเทือนผิวเจล

4. ปล่อยให้ไฮโดรเจนคาร์บอเนตเข้าไปในเจล และหดเมื่อระดับของไฮโดรเจนมาเกือบถึงผิวเจล แล้วถางด้วยบัฟเฟอร์ 0.2 cm^3

5. เติมโพแทสเซียมเฟอไรไซยาไนต์ 50 mg ลงในหลอดที่บรรจุสารละลายชีโนโกลบิน 5 cm^3 แล้วเขย่าให้ผสมกัน

6. ปีปект์ 0.3 cm^3 ของสารละลายเมตชีโนโกลบินที่เกิดขึ้นลงในหลอดเจล แล้วปล่อยให้เข้าเจล หลังจากนั้นถางผิวเจลด้วยบัฟเฟอร์ 1 cm^3 แล้วเติมน้ำบัฟเฟอร์ให้เต็มหลอดแก้ว และปล่อยให้น้ำบัฟเฟอร์ระดับเจล

เมื่อเมตชีโนโกลบินผ่านไฮโดรเจนคาร์บอเนตให้เป็นออกซิชีโนโกลบิน สังเกตุ การเปลี่ยนแปลงสีของชีโนโกลบินจากน้ำตาลเป็นม่วง และสีเหลืองของเฟอไรไซยาไนต์ที่เหลืออยู่ข้างหลอดเจล เมื่อชีโนโกลบินผ่านออกจากไฮโดรเจนคาร์บอเนตมีออกซิเจน คือออกซิชีโนโกลบินจะจับออกซิเจน สังเกตุการเปลี่ยนแปลงสี จากสีม่วงของคือออกซิชีโนโกลบินจะเป็นสีแดงของออกซิชีโนโกลบิน

วิธีแสดงผลการทดลอง

เขียนกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้

ตอบคำถามต่อไปนี้

1. โดยปกติสารละลายน้ำซึมจะมีสีน้ำตาลแดง ส่วนสารละลายน้ำที่ดับริสุทธิ์จะไม่มีสี ฉะนั้นสังเกตดูสีของตะกอนและน้ำกรองที่ได้ในการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 1 เมื่อใช้ไฮโดรโกลบินและเมื่อใช้ไฮโดรโคลอม ซึ่งแล้วงสรุปว่าหมู่ซึมในไฮโดรโกลบินและในไฮโดรโคลอม ซึ่งถูกเชื่อมโยงกับสารละลายน้ำที่ดับริสุทธิ์หรือไม่

2. ในการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 2 จงอธิบายสาเหตุที่โกลบินที่ไม่ได้อยู่ด้วยค่าง ให้สม่วงงาน ๆ กับนินไฮดริน แต่โกลบินที่อยู่ด้วยค่างให้สม่วงเข้ม

3. จากกราฟในการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 3 จงสังเกตว่าออกซิไฮโดรโกลบินและดีออกซิไฮโดรโกลบินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่คลื่นแสงเท่าไร

4. ในการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 4 จะมีการเปลี่ยนแปลงสีอย่างไร ในหลอดเจล ถ้าดัดแปลงวิธีทดลองดังต่อไปนี้

ก) เติมสารละลายน้ำไว้ใช้ยาในตัวลงในหลอดเจลก่อน แล้วต่อไปจึงเติมไฮโดรโนบิโนต์ลงไปในสารละลายน้ำในหลอดทดลอง แล้วปล่อยให้สารละลายนี้ผ่านลงไปในหลอดเจล

ข) เติมสารละลายไฮโดรโนบิโนต์ลงในหลอดเจลก่อน เช่นเดิม ต่อไปปล่อยให้สารละลายน้ำในหลอดเจลที่ไม่เติมเพื่อไว้ใช้ยาในตัวลงไปในสารละลายน้ำในหลอดเจล

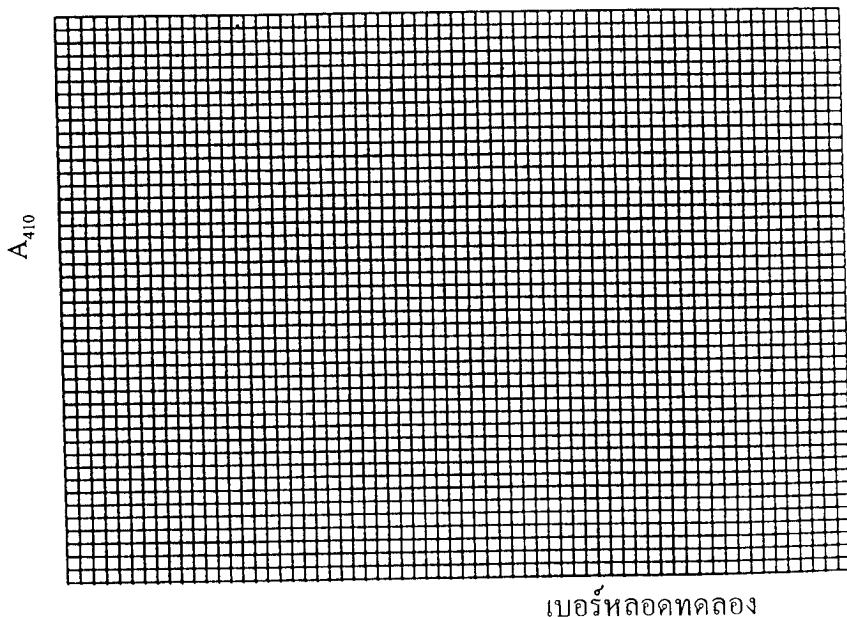
บันทึกผลการทดลอง
บทปฏิบัติการที่ 3 ปฏิบัติการเรื่อง โปรดตีน

**บันทึกผลการทดลองที่ 3.1 การแยกและคีกษาคุณสมบัติของไฮโดรโคลน ซี
จากหัวใจหมู**

ตอนที่ 1 ตารางบันทึกผลการทดลอง ข้อ 1.3 วิธีแยกไฮโดรโคลน ซี จากหัวใจโนโลบิน

สาร	หลอดเบอร์	1	2	3	4	5	6
สารละลายไฮโดรโคลน ซี ที่เก็บ ¹ จากหลอดแก้ว A_{410}							

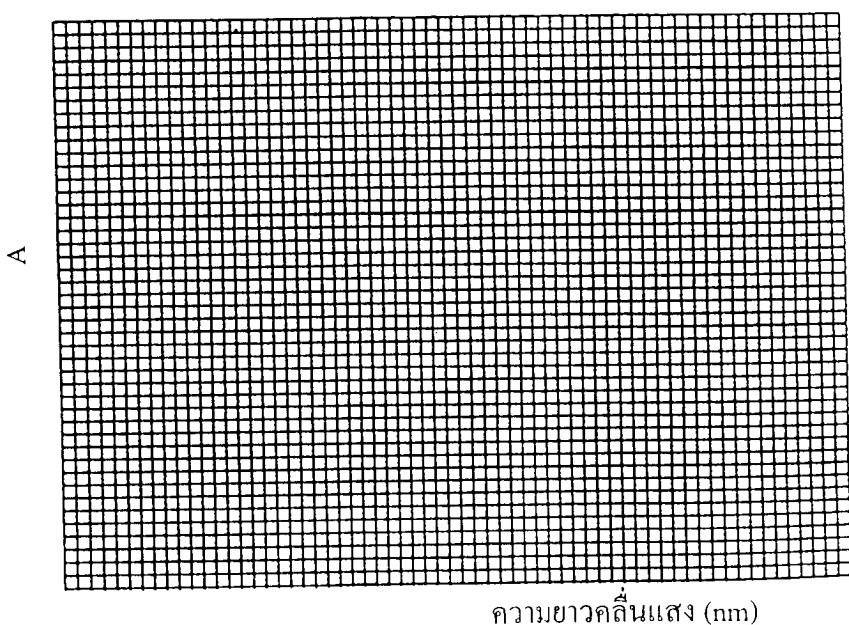
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเบอร์หลอดทดลอง
ที่เก็บสารละลายจากหลอดแก้ว



ตอนที่ 2 ตารางบันทึกผลการทดลอง การดูดกลืนแสงของไซโตโครม ซี

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่	1	2
สารละลายน้ำไซโตโครม ซี ที่คัดเลือกได้จาก การทดลองที่ 3.1 ตอนที่ 1		3	3
โพแทสเซียมคล珼อไรไซบะไนด์ โซเดียมไดไฮโวโนนต์ (mg)		0.1	200
A_{390}			
A_{395}			
A_{400}			
A_{405}			
A_{410}			
A_{415}			
A_{420}			
A_{425}			

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับคลื่นแสงสำหรับไซโตโครม ซี
ในสภาพรีดิวช์และในสภาพออกซิไดส์



วิจารณ์ผลการทดลอง

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

สรุปผลการทดลอง

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ตอบคำถาม

1. ในการใช้โซโนม ซี ออกจากหลอดแก้วบรรจุ CM - cellulose ถ้าใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH 6.5 แทนบัฟเฟอร์ pH 7.5 จะต้องใช้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้หรือไม่

.....
.....
.....
.....
.....

เพราะ

.....
.....
.....
.....
.....

2. จากกราฟเปรียบเทียบการคุณลักษณะของโซโนม ซี ในสภาพรีดิวช์และสภาพออกซิไดส์ โซโนม ซี ในสองสภาพนี้มีค่าการคุณลักษณะมากที่สุดที่คลื่นแสงเดียวกันหรือไม่

.....
.....
.....

บันทึกผลการทดลองที่ 3.2 คุณสมบัติของอีโนโกลบิน

ตอนที่ 1 การแยกเขมและโกลบินออกจากกัน

ลักษณะของโกลบินที่แยกได้

.....
.....
.....

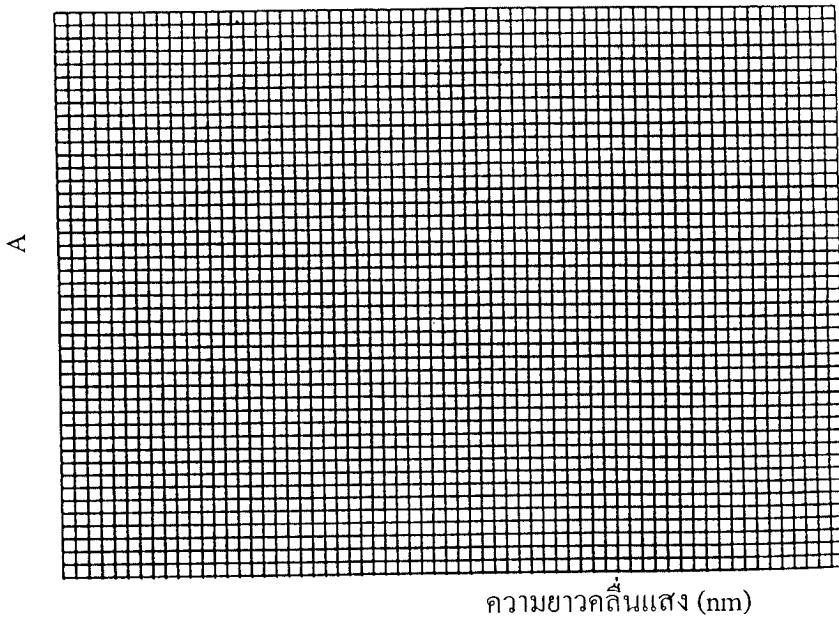
ตอนที่ 2 ตารางบันทึกผลการทดลอง การย่อยโกลบินด้วยด่าง

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่	1	2	3
โซเดียมไฮครอตไซด์		2	2	-
ผงโกลบิน (mg)		50	-	50
← ต้มให้เดือด 20 นาที →				
กรดน้ำส้ม (หยด) เพื่อปรับ pH ให้ได้ น้ำกลั่น		4.6	4.6	2
กรดหรือด่าง (หยด) เพื่อปรับ pH ให้ได้ สารละลายนินไฮดริน		-	-	4.6
← ต้มให้เดือด 1 นาที →				
เบร์ยบเทียบสี				

ตอนที่ 3 ตารางบันทึกผลการทดลอง การดูดกลืนแสงของไฮโลกลบิน

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่	1	2	3	4	5	6
สารละลายน้ำไฮโลกลบิน		0.2	0.2	0.2			
โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.025 mol/dm^3 , pH 7.0		5.8	5.8	5.8	6.0	6.0	6.0
โพแทสเซียมเพอร์ไซยาโน๊ต (mg)			100			100	
โซเดียมไดไฮโวโน๊ต (mg)				100			100
A_{520}							
A_{525}							
A_{530}							
A_{535}							
A_{540}							
A_{545}							
A_{550}							
A_{555}							
A_{560}							
A_{565}							
A_{570}							
A_{575}							
A_{580}							

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการคูคูกลืนแสงกับค่าลี่นแสงของไฮโกลบิน
ทั้งสามสภาพกับค่าลี่นแสง



ตอนที่ 4 บันทึกผลการทดสอบ เจลฟิลเทอร์ชัน

ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงผลการทดลอง

วิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ตอบคำถาม

1. โดยปกติสารละลายน้ำมีน้ำตาลแดง ส่วนสารละลายน้ำเป็นไทด์บริสุทธิ์จะไม่มีสี จะน้ำมันเมื่อสังเกตคุณสมบัติของตะกอนและน้ำกรองที่ได้ในการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 1 เมื่อใช้ชีโม่โกลบินและเมื่อใช้โซโนกรัม ซึ่ง สรุปได้ว่าหมูยีนในชีโม่โกลบินและในโซโนกรัม ซึ่งเชื่อมโยงกับสารละลายน้ำเป็นไทด์ด้วย

2. ในการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 2 โกลบินที่ไม่ได้ย่อยด้วยค่าง ให้สีม่วงจาง ๆ กันนิโซเดริน แต่โกลบินที่ย่อยด้วยค่างให้สีม่วงเข้มเพราะ

3. จากกราฟในการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 3 ออกซีชีโม่โกลบินและดีออกซี - ชีโม่โกลบินมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดที่คลื่นแสงเท่ากับ

4. ในการทดลองที่ 3.2 ตอนที่ 4 ถ้าดัดแปลงวิธีทดลองดังต่อไปนี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงสีในหลอดเจล ดังรายละเอียด

ก) เติมสารละลายเพื่อไว้ใช้ยาในด์ ลงในหลอดเจลก่อน แล้วต่อไปจึงเติมไคไฟโอในต์ลงไปในสารละลายซีโน่โกลบินในหลอดทดลอง แล้วปล่อยให้สารละลายนี้ผ่านลงไปในหลอดเจล จะมีการเปลี่ยนแปลงสีคือ

.....
.....
.....
.....

ข) เติมสารละลายได้ไไฟโอในต์ลงในหลอดเจลก่อน ต่อไปปล่อยให้สารละลายซีโน่โกลบินผ่านหลอดเจล โดยที่ไม่เติมเพื่อไว้ใช้ยาในต์ลงไปในสารละลายซีโน่โกลบิน จะมีการเปลี่ยนแปลงสีคือ

.....
.....
.....
.....

ปฏิบัติการบทที่ 4

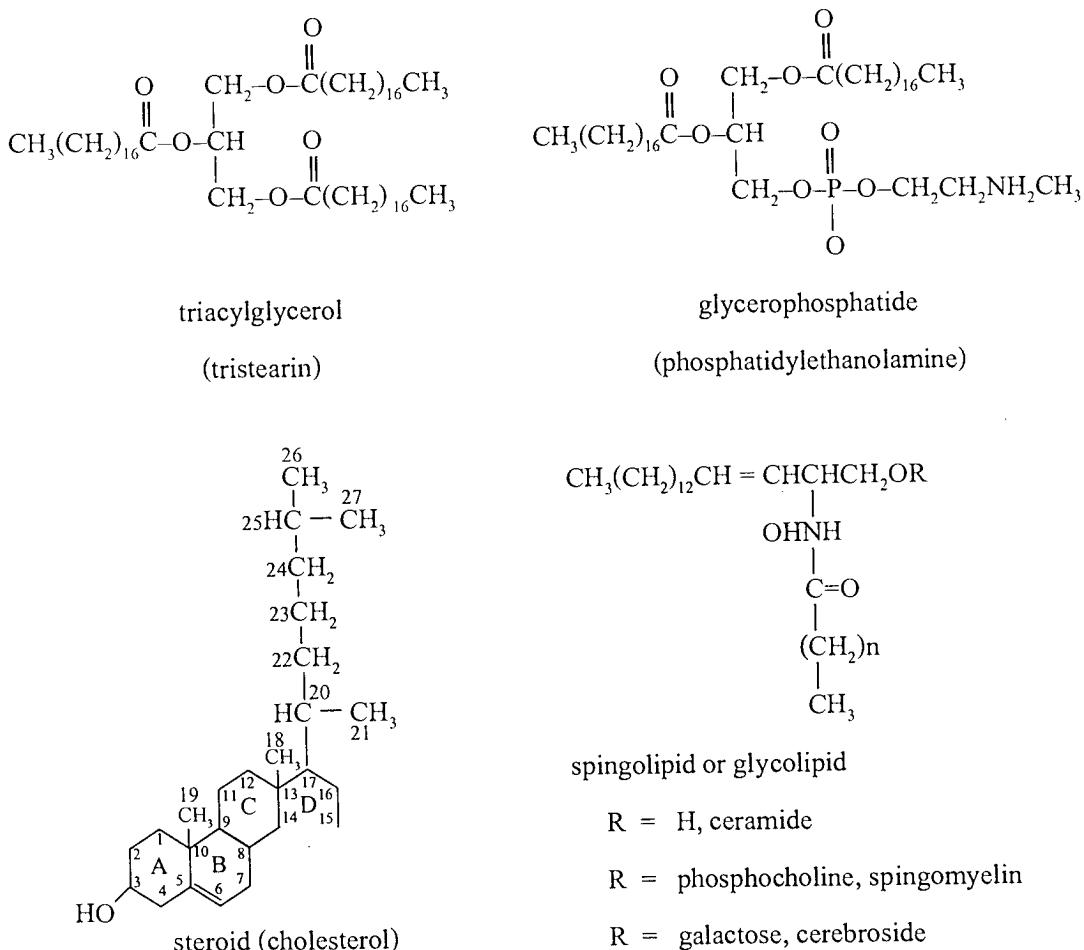
ปฏิบัติการเรื่อง ลิพิด

วัตถุประสงค์

เพื่อสกัดและวิเคราะห์ลิพิดด้วยวิธีโคมาราฟี

บทนำ

ลิพิด (lipid) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากในเซลล์ทุกชนิด เป็นชีวโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก มีโครงสร้างโมเลกุลหลายแบบและมีหน้าที่ทางชีวภาพหลายอย่าง อาทิเช่น เป็นองค์ประกอบหลักในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นแหล่งพลังงานหรือควบคุมการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ช่วยความจำของเซลล์ (cellular recognition) เป็นวิตามินและช่วยในการขนส่งสารอาหารที่ไม่ละลายน้ำ เป็นต้น สารประกอบที่จัดเป็นพวกลิพิดที่ทำหน้าที่ดังกล่าวได้แก่สารจำพวกกรดไขมัน (fatty acids) ไขมันที่มีฤทธิ์เป็นกลาง (neutral fats) น้ำมัน (oils) ไข (wax) ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) สฟิงโกลิพิด (sphingolipid) สเตโรอยด์ (steroids) และวิตามินบางชนิด ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ จะประกอบด้วยลิพิดชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น สมองมีไอกลโคลิพิดและคอเลสเทอรอลเป็นส่วนใหญ่และพบไขมันที่มีฤทธิ์เป็นกลางเพียงเล็กน้อย ในตับจะพบไขมันที่มีฤทธิ์เป็นกลางในปริมาณสูงและพบคอเลสเทอรอลและไอกลโคลิพิดในปริมาณน้อยมาก ส่วนในเด็อดและพลาสม่าจะพบลิพิดเกือบทุกชนิด และลิพิดในพืชส่วนมากจะเป็นชนิดที่ไม่มีข้าว (non – polar lipids) ซึ่งจะเป็นสารพวงควัตถุ (pigments) ต่าง ๆ เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) คาโรตินอยด์ (carotenoids) เป็นจำนวนมากเพื่อช่วยดูดกลืนแสงในกระบวนการสังเคราะห์แสง ลิพิดที่พบในธรรมชาติส่วนมากมักไม่อยู่เดี่ยว ๆ แต่มักจะรวมอยู่กับสารอื่น ๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เรียกว่าไอกลโคลิพิด (glycolipid) และลิโพโปรตีน (lipoprotein) ตามลำดับ ตัวอย่างของโครงสร้างของสารประกอบพวกลิพิดที่พบในธรรมชาติมีดังต่อไปนี้



การทดลองที่ 4.1 การสกัดและการวิเคราะห์ลิพิดที่ได้จากตับด้วยวิธีโครโนทกราฟี

หลักการ

การสกัดลิพิดออกจากกันทำได้หลายวิธี และมีข้อบ่งบอกที่จะต้องคำนึงถึงคือ

1. ลิพิดประกอบด้วยองค์ประกอบของหัวและตัวที่มีความสมดุลกัน แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการละลายต่างกัน ดังนั้นจะต้องเลือกชนิดและปริมาณของตัวทำละลายให้เหมาะสม
2. ลิพิดหัวชนิดถูกออกซิเดส์ได้ง่ายโดยออกซิเจนในอากาศ ซึ่งจะแก้ไขได้โดยการสกัดลิพิดภายในตู้เย็น ไม่ต้องใช้อุณหภูมิต่ำ
3. ตัวทำละลายที่ “โพลาร์” (polar) บางชนิดสามารถดึงโมเลกุลของน้ำออกจากเนื้อเยื่อ และลิพิดที่โพลาร์บางชนิดสามารถจับกับโมเลกุลอื่น เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีิก เกลือ อนินทรีย์และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้ ดังนั้นในการสกัดลิพิดจึงมักมีสารเหล่านี้ติดมาด้วย วิธีแก้ปัญหาคือจะต้องล้างลิพิดที่สกัดได้น้ำด้วยน้ำกลัน เกลือ หรือกรด

สารเคมีและเครื่องมือ

1. ตับไก่ หรือตับหมู
2. คลอโรฟอร์ม, อะซีโตน
3. เมทานอล หรือเมทิลแอลกอฮอล์, เอทานอล หรือเอทิลแอลกอฮอล์
4. ชีวิติกาเจล H หรือ G
5. คอเลสเทรออล (cholesterol) ละลายน้ำในคลอโรฟอร์ม 1.0 เปอร์เซ็นต์
6. ฟอสฟอลิพิด (phospholipid) ละลายน้ำในคลอโรฟอร์ม 1.0 เปอร์เซ็นต์
7. ไตรอซิลก็อเชอรอล (triacylglycerol) ละลายน้ำในคลอโรฟอร์ม 1.0 เปอร์เซ็นต์
8. กรดไขมัน (fatty acid) ละลายน้ำในคลอโรฟอร์ม 1.0 เปอร์เซ็นต์
9. หลอดคามิลารี่
10. ปิโตรเลียมอิเทอร์ : อิเทอร์ : กรดฟอร์มิก (75 : 25 : 1.5)
11. ไอโอดีน (iodine)
12. นินไฮดริน ละลายน้ำในเอทานอล 0.1 เปอร์เซ็นต์
13. phosphate stain reagent เตรียมโดย : ละลายน้ำในโซเดียมไนเตรต (ammonium, olydate) 16 g ในน้ำกลั่น 120 cm³ (สารละลายน้ำ 1 g) นำสารละลายน้ำ 80 cm³ ไปผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 cm³ และprototh (mercury) 10 cm³ เป็นเวลา 30 นาที จึงได้สารละลายน้ำ คือ ฯ เดิมกรดกำมะถัน 200 cm³ ตามด้วยสารละลายน้ำ ที่เหลือลงในสารละลายน้ำ ขณะที่แข็งตัวในน้ำแข็ง แล้วทำให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 1 dm³ ดังน้ำกลั่น
14. ผ้าก๊อซ
15. กระดาษนาฬิกา
16. แผ่นกระดาษขนาด 10 × 20 cm
17. ถังแก้วสำหรับทำโคมไฟแบบเยื่อบาง (T.L.C)
18. อ่างน้ำร้อนที่ 60 °C
19. เตาอบ 100 °C

วิธีทดลอง

1.1 วิธีแยกลิพิดจากตับ

1) ชั้งตับประมาณ 5.0 g ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ สับให้ละเอียด แล้วเติม 50 cm³ ของสารผสมคลอโรฟอร์ม – เมทานอล (1 : 1) เขย่าแรง ๆ ให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที

2) กรองเศษตับที่เหลือด้วยผ้าก๊อช นำสารละลายที่กรองได้ไปใส่กระจะกนาพิกา หรือบีเกอร์แล้วระเหยจนแห้ง (อาจใช้อ่างน้ำร้อนที่ 60°C ก็ได้) ถ้าเกิดฟองเติมเมทานอล $1 - 2 \text{ cm}^3$

3) นำเศษตกค้าง (residue) ที่ได้มาละลายด้วยสารผสมของคลอโรฟอร์ม – เมทานอล (2 : 1) ประมาณ 10 cm^3 แล้วระเหยตัวทำละลายออกจนหมด

4) ละลายเศษตกค้างที่ได้อีกรั้งใน 10 cm^3 ของคลอโรฟอร์ม ระเหยตัวทำละลายออกให้หมด (ไม่ควรมีโมเลกุลของน้ำติดอยู่เลย)

5) นำเศษตกค้างที่ได้รั้งหลังสุดนึ่งมาละลายในคลอโรฟอร์ม $1 - 2 \text{ cm}^3$ ค่อยๆ คนเบาๆ จะได้ตะgonสีขาวของโปรตีนที่สลายตัวติดอยู่ข้างบีเกอร์ ซึ่งสามารถแยกออกจากลิพิดใช้ pasteur pipette ค่อยๆ ดูดสารละลายส่วนที่ใสซึ่งเป็นลิพิดออก ลิพิดที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์พอจะต้องนำมาแยกต่อด้วยโคมาราไฟเบนเยื่อบาง หรือ T.L.C

1.2 การเคลือบแผ่นกระจะด้วยซิลิกาเจล H หรือ G

1) ถ้างานค่า 10 × 20 cm ให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยอะซีโตน ปล่อยให้แห้งสนิท

2) ผสมซิลิกาเจล H หรือ G 15 g กับตัวทำละลายผสมอาหารออล : น้ำ (1 : 1) 70 cm^3 ให้เข้ากัน แล้วเคลือบลงบนแผ่นกระจะให้หนาประมาณ 1 mm อาจใช้เครื่องมือช่วยในการเคลือบ หรือค่อยๆ เทสารผสมลงไปบนแผ่นแก้ว โดยใช้แท่งแก้วช่วย ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือนำไปเผาเดด 2 – 3 ชั่วโมง

1.3 การวิเคราะห์ลิพิดด้วยวิธีโคมาราไฟเบน

1) นำแผ่นกระจะที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลเรียบร้อยแล้ว มาวัดระยะให้ห่างจากปลายข้างหนึ่ง 2 cm ทำเครื่องหมายจุดไว้ 5 แห่ง โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 1.5 cm

2) ใช้หลอดคาดลารีแยกคุณค่าเลสเตเทอรอล, ฟอสฟอสิพิด, ไตรเอซิลก็เลเซอรอล กรดไขมันและลิพิดที่แยกได้จากตับ อย่างละเอียด $10 \mu\text{dm}^3$ หยดที่ละน้อยลงบนแผ่นซิลิกาเจล โดยระวังอย่าให้แต่ละจุดมีเส้นผ่านศูนย์กลางเกิน 5 mm (ควรให้สารละลายที่หยดแห้งสนิทก่อนที่จะหยดซ้ำครั้งต่อไป) ควรหยดลิพิดที่แยกได้จากตับไว้ตรงกลางเพื่อจะได้จ่ายต่อการเปรียบเทียบ

3) เมื่อสารละลายที่หยดแห้งสนิท จึงนำไปปะในถังโคมาราไฟ ซึ่งบรรจุปีโตรเลียมอิเทอร์ : อิเทอร์ : กรดฟอร์มิก (โดยปริมาณให้ระเหยจนบรรยายกาศในถังแก้วอิ้มตัวด้วย

สารผสมนี้ไว้ล่วงหน้าก่อนแล้ว) โดยให้ปลายแผ่นซิลิกาเจลจุ่มอยู่ในตัวทำละลายประมาณ 1 cm (ไม่ท่วมจุดที่หยดสารละลายไว้)

4) ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมผ่านเข้าไปตามแผ่นซิลิกาเจลจนสูงห่างจากปลายบนประมาณ 1 – 2 cm เอาแผ่นกระจากออก แล้วทำการรีอิงหมายแสดงระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่นำออกผ่านให้แห้ง

5) นำไปขอมด้วยไอโอดีน (ชั้นบรรจุอยู่ในถังแก้ว) แล้วปล่อยให้บรรยายอาศัยในถังอีมด้วยไอโอดีนไว้ล่วงหน้า เป็นเวลา 10 นาที ใช้ดินสอวงรอบจุดที่เกิดปฏิกิริยาคับไอของไอโอดีน จะเห็นเป็นจุดสีเหลืองอมน้ำตาล

6) ทิ้งไว้ให้ไอโอดีนระเหยจนหมด นำแผ่นซิลิกาเจลนี้ไปฉีดพ่นด้วยนินไฮดริน 0.1 เปอร์เซ็นต์ แล้วอบให้แห้งในเตาอบที่ 100 °C เป็นเวลา 1 นาที ถ้าสารได้มีหมู่อะมิโนอิสระอยู่ด้วยจะเห็นเป็นจุดสีม่วงแดง ใช้ดินสอทำเครื่องหมายไว้

7) นำแผ่นซิลิกาเจลแผ่นเดียวกันนี้ไปฉีดพ่นด้วย phosphate stain reagent ถ้าสารได้มีหมู่ฟอสเฟต จะเห็นเป็นจุดสีน้ำเงินเข้ม

วิธีแสดงผลการทดลอง

คำนวนหาค่า R_f ของลิพิด

$$\text{จากสูตร : } R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ตอบคำถามต่อไปนี้

1. ตับประกอบด้วยลิพิดประเภทใดบ้าง
2. ถ้าท่านสกัดลิพิดจากไผ่ และทำการทดลองเช่นเดียวกัน ท่านคิดว่าจะพบลิพิดประเภทใดบ้าง แตกต่างจากลิพิดในตับหรือไม่

**บันทึกผลการทดลอง
บทปฏิบัติการที่ 4 ปฏิบัติการเรื่อง ลิพิด**

บันทึกผลการทดลองที่ 4.1 การสกัดและการวิเคราะห์ลิพิดที่ได้จากตับด้วยวิธี

โกรมาโทกราฟี

บันทึกผลการทดลองข้อ 1.1 วิธีสกัดลิพิดจากตับ

ลักษณะลิพิดที่สกัดได้

.....
.....
.....

ตารางบันทึกผลการทดลองข้อ 1.3 การวิเคราะห์ลิพิดด้วยวิธีโกรมาโทกราฟี

ชนิดของสาร	ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (cm)
คอเลสเตอรอล	
ฟอสโฟลิพิด	
ไตรเอชิกเลซีเซอรอล	
กรดไขมัน	
ลิพิดที่แยกได้จากตับ	
ตัวทำละลาย	

วิธีคำนวณหาค่า R_f

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

วิจารณ์ผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

ตอบคำถาม

1. ตับประกอบด้วยลิพิดประเภทใดบ้าง

2. ถ้าสักดิลิพิดจากไข่ และทำการทดลองเช่นเดียวกัน ลิพิดที่พบควรเป็นลิพิดประเภทใดบ้าง

แตกต่างจากลิพิดในตับหรือไม่

บทปฏิบัติการที่ 5

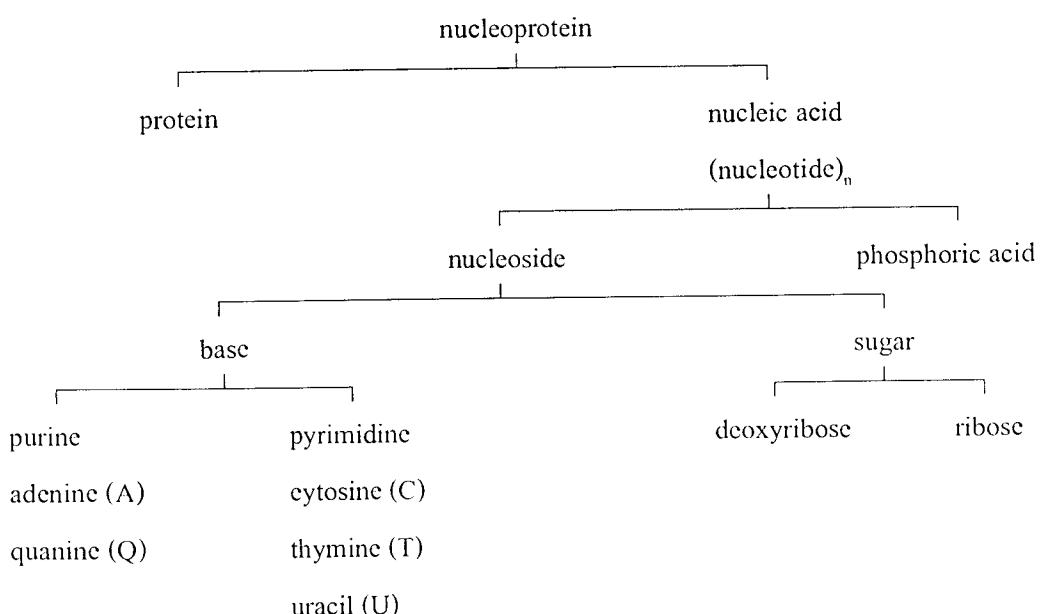
ปฏิบัติการเรื่อง กรดนิวคลีอิก

วัตถุประสงค์

เพื่อสกัดและศึกษาคุณสมบัติทางประการของ DNA

บทนำ

กรดนิวคลีอิกเป็นสารพันธุกรรม (genetic material) และเป็นตัวกลางในการถ่ายทอด ข้อความพันธุกรรม กรดนิวคลีอิกแบ่งตามโครงสร้างได้เป็น 2 ชนิด คือ กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid) และกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) หรือเรียกย่อ ๆ ว่า DNA และ RNA ตามลำดับ โดยปกติ DNA ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรม หรือเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อถ่ายทอดไปยังลูกหลาน ส่วน RNA ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายทอด ข้อความพันธุกรรมจาก DNA ไปใช้ในการสร้างโปรตีน DNA และ RNA ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) คือจับรวมอยู่กับโมเลกุลของโปรตีน นิวคลีโอโปรตีน ที่รู้จักได้แก่ โครโนโซม (chromosome ; DNA + โปรตีน) และไรโบโนโซม (ribosome ; RNA + โปรตีน) เมื่อนำนิวคลีโอโปรตีนมาไฮโดรไลส์จะได้ผลดังนี้



A, G, C, T	เป็นเบสที่พบในโมเลกุลของ DNA
A, G, C, U	เป็นเบสที่พบในโมเลกุลของ RNA
deoxyribose	เป็นน้ำตาลที่พบในโมเลกุลของ DNA
ribose	เป็นน้ำตาลที่พบในโมเลกุลของ RNA

การทดลองที่ 5.1 การสกัด DNA จากเม็ดเลือดแดงไก่

หลักการ

DNA ของพวกลชุลัญชาริโอต (eukaryote cell) จะอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ โดยรวมตัวอยู่กับพวกลเบสิกโปรตีน (basic protein) เช่น ฮิสโทน (histone) และ non-ฮิสโทน (non-histone) ในการแยก DNA ออกจากโปรตีนมักใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ และ SDS (sodium dodecyl sulfate) เพื่อทำลายพันธะระหว่าง DNA กับโปรตีน จากนั้นสกัดโปรตีนออกไปโดยใช้คลอโรฟอร์ม เหลือ DNA ไว้ในชั้นของสารละลาย เมื่อเติมเอทิลแอลกอฮอล์ DNA จะตกตะกอนเป็นเส้นยว

ในการสกัด DNA ต้องควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้เหมาะสม เช่น การสกัดในขณะที่เย็นจัด ($0 - 4^{\circ}\text{C}$) เพื่อยับยั้งการทำงานของอีนไซม์ DNase หรือเลือกใช้โซเดียมซิตรاتบัฟเฟอร์ (sodium citrate buffer) เพราะในบัฟเฟอร์ชนิดนี้จะทำให้การทำงานของ DNase ลดลง โดยโซเดียมซิตรัตสามารถจับกับ Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของ DNase หรือควรเลือกเนื้อเยื่อที่มีอีนไซม์ DNase น้อยที่สุด เช่น เนื้อเยื่อม้าม เนื้อเยื่อไทนัส (thymus tissue) เป็นต้น มิฉะนั้น DNase จะย่อย DNA ทำให้เราได้ปริมาณ DNA น้อยลงกว่าที่ควรจะเป็น

สารเคมี

1. เลือดไก่สด

2. กรดซิตริกเดกซ์โทรส (acid citric dextrose ; ACD) เตรียมโดยละลายไตรโซเดียมซิตรัตไดไฮเครต (trisodium citrate. $2\text{H}_2\text{O}$) 2.2 g กรดซิตริก (citric acid) 0.8 g และเดกซ์โทรสโมโนไฮเครต (dextrose. H_2O) 2.45 g ในน้ำกลิ้น ทำปริมาตรของสารละลายทั้งหมดให้เป็น 100 cm^3 ($\text{pH} \approx 5.0$)

3. สารละลายน้ำ (*saline – citrate buffer pH 7.4*) เย็น เตรียมโดยละลายนิโคเดียมซีตรेट 2.94 g ในน้ำกลั่น จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ 8.12 g ลงไป คนให้ละลายน้ำให้ได้ 1 dm^3 และปรับ pH เป็น 7.4 ด้วยกรดไฮดรอกลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์

4. สารละลายน้ำ (*EDTA – Tris - bisulfite*) เตรียมโดยเติมสารละลายนิโคเดียมไนซัลไฟฟ์ (NaHSO_3) 0.05 mol/dm^3 ลงในสารพสมของ EDTA 0.02 mol/dm^3 และ Tris – base 0.01 mol/dm^3 ปรับสารพสมให้ได้ที่ pH 8

5. โซเดียมคลอไรด์ 2.4 mol/dm^3

6. คลอโรฟอร์ม : ไอโซเออมิลแอลกอฮอล์ (*isoamyl alcohol*) 15 : 2

7. SDS (sodium dodecyl sulphate) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

8. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

วิธีทดลอง

1. เก็บเลือดไก่สัด 10 cm^3 ในสารละลายน้ำ ACD 1.5 cm^3 เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นหรือที่อุณหภูมิประมาณ $0 - 4^\circ\text{C}$

2. ผสมสารละลายน้ำ ก. 20 cm^3 ลงในเลือดไก่ 10 cm^3 ที่เตรียมไว้นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 500 g เป็นเวลา 5 นาที แยกชั้นบนทิ้งไป

3. นำตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ได้ (ประมาณ 2 cm^3) มาเติมสารละลายน้ำ ขนาด 20 cm^3 ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ประมาณ $2,000 \text{ g}$ เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนที่เป็นสารละลายน้ำทิ้ง

4. นำตะกอนของนิวเคลียสมาระเติมสารละลายน้ำ ก. 10 cm^3 และ SDS 1.5 cm^3 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นที่ 60°C เป็นเวลา 10 นาทีเติมสารละลายนิโคเดียมคลอไรด์ 12 cm^3 คนให้เข้ากัน เติมสารพสมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเออมิลแอลกอฮอล์ 25 cm^3 เขย่าแรง ๆ ติดต่อกันเป็นเวลา 20 – 30 นาที เพื่อสักด็อกโปรตีนออกจาก DNA จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 700 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้แยกชั้น ดูดสารละลายน้ำชั้นบนของ DNA อย่างระมัดระวังแล้วแยกเก็บไว้ทิ้งส่วนที่เป็นตะกอนและสารละลายน้ำชั้นล่าง

5. นำสารละลายน้ำชั้นบนของ DNA ที่แยกได้มาเติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยปริมาตรอีกหนึ่งเท่าตัว เขย่าแนว ๆ ช้า ๆ เก็บตะกอนสีขาวเป็นสายยาวของ DNA โดยใช้แท่งแก้วคนช้า ๆ ในลักษณะวงกลมไปทางเดียวกัน

6. ถ้างตะกอน DNA ที่เก็บได้ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยอีเทอร์ ทำให้แห้งเก็บไว้ในตู้เย็น

7. ละลายน้ำหนึ่งของ DNA ที่ได้ด้วยน้ำกลั้น 9 cm^3 และสารละลายน้ำ 1 cm^3
เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดลองที่ 5.2, 5.3 และ 5.5 ต่อไป

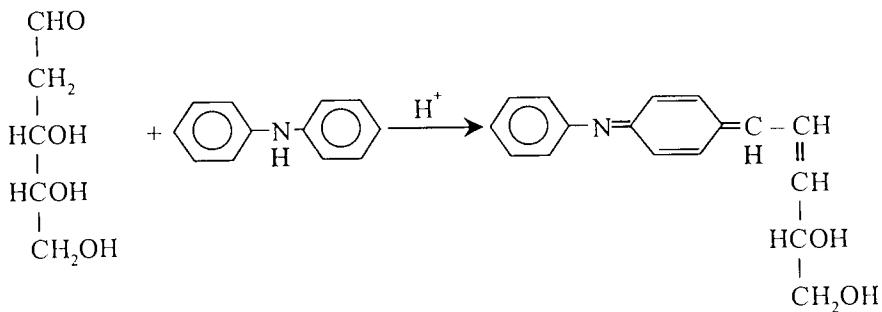
ตอบคำถามต่อไปนี้

1. จงบอกหน้าที่ของสารละลายน้ำที่ใช้แยก DNA
 - ก. NaCl และ SDS
 - บ. คลอร์ฟอร์ม – ไอโซเออมิลเออลกอฮอล์
 - ค. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
2. จากเลือดໄก 10 cm^3 ท่านสามารถสกัด DNA ได้เท่าไร

การทดลองที่ 5.2 การหาปริมาณ DNA ด้วยวิธีไดฟีนิลามีน (diphenylamine)

หลักการ

เนื่องจาก DNA ประกอบด้วยน้ำตาลดีอ๊อกซีไรโนส (deoxyribose) เมื่อทำปฏิกิริยา กับไดฟีนิลามีน จะให้สารสีน้ำเงินเข้ม ดังนั้น ปริมาณ DNA ในสารละลายน้ำโดยการ ต้ม DNA กับกรดซึ่งจะทำให้ DNA ถลایได้ดีอ๊อกซีไรโนส เมื่อเติมไดฟีนิลามีนจะได้สาร ประกอบเชิงช้อนสีน้ำเงินเข้ม ความเข้มของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นวัดได้จากการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 600 nm และเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ DNA



2 – deoxyribose diphenylamine ω – hydroxylevulic aldehyde
 diphenylamine

รูปที่ 5.1 ปฏิกิริยาการเกิดสีของสารประกอบเชิงช้อนระหว่างดีอ๊อกซีไรโนส
กับไดฟีนิลามีน

วิธีที่ 1

สารเคมี

1. DNA จากเม็ดเลือดแดงไก่ที่เตรียมได้จากการทดลองที่ 5.1
2. สารละลายน้ำ DNA มาตรฐานจากต่อมไนมัสของวัว
3. สารละลายนีโตร์คอลอริก (HClO_4) $0.5 \text{ mol}/\text{dm}^3$ และ $1.0 \text{ mol}/\text{dm}^3$
4. สารละลายน้ำฟีนิลามีนเตรียมโดยละลายไนฟีนิลามีน 0.3 g ในกรดอะซิติกเข้มข้น 30 cm^3 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.75 cm^3 และอะเซทัลเดไฮด์ (acetaldehyde) 0.2 เปอร์เซ็นต์ 0.3 cm^3 ผสมให้เข้ากัน (เตรียมแล้วใช้ทันที)

วิธีทดลอง

1. ผสมสารละลายน้ำ DNA มาตรฐาน 4 cm^3 ในกรดเพอร์คอลอริก $1 \text{ mol}/\text{dm}^3$ 4 cm^3 ในหลอดทดลอง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วปล่อยให้เย็น ปีเปตต์สารละลายน้ำ และเติมกรดเพอร์คอลอริก $0.5 \text{ mol}/\text{dm}^3$ ลงในหลอดทดลอง 6 หลอด ตามปริมาณดังนี้

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่ 1	2	3	4	5	6
DNA มาตรฐาน ($0.1 \text{ mg}/\text{cm}^3$)	-	0.2	0.4	0.8	1.6	2.0
HClO_4 ($0.5 \text{ mol}/\text{dm}^3$)	2.0	1.8	1.6	1.2	0.4	-
ปริมาณ DNA (mg)	0	0.02	0.04	0.08	0.16	0.20

2. เติมสารละลายน้ำฟีนิลามีน 3.0 cm^3 ลงในหลอดทดลองทั้ง 6 หลอดในข้อ 1 แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง จะได้สารละลายน้ำเงินเข้ม ตั้งทึบไว้ให้เย็นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm โดยใช้หลอดที่ 1 ตั้งจุดศูนย์

3. นำสารละลายน้ำ DNA ที่เตรียมได้จากเม็ดเลือดแดงของไก่มาเจือจางด้วยกรดเพอร์คอลอริก $0.5 \text{ mol}/\text{dm}^3$ ในอัตราส่วน $1 : 20$, $1 : 40$ และ $1 : 80$ แล้วนำไปต้ม 15 นาที เติมสารละลายน้ำฟีนิลามีน 3.0 cm^3 ลงในสารละลายน้ำ DNA 2.0 cm^3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm หลังจากต้ม 1 ชั่วโมง

วิธีแสดงผลการทดลอง

1. เขียนกราฟมาตรฐานของ DNA ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm กับปริมาณ DNA มาตรฐาน หลอดที่ 2 ถึงหลอดที่ 6
2. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในข้อ 3 มาอ่านเพื่อหาปริมาณ DNA จากกราฟมาตรฐาน

ตอบคำถามต่อไปนี้

1. สารละลายน้ำ DNA ที่เตรียมจากเม็ดเลือดแดง ไก่ มีความเข้มข้นเท่าไร
2. ปริมาณ DNA ที่แยกได้จากการทดลองที่ 5.1 เป็นกี่เปอร์เซ็นต์ของ DNA ที่มีอยู่

วิธีที่ 2

สารเคมี

1. สารละลายน้ำ DNA จากเม็ดเลือดแดง ไก่ ที่เตรียมไว้ในการทดลองที่ 5.1
2. สารละลายน้ำมาตรฐานดีออกซิไรโบส เข้มข้น $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$
3. สารละลายน้ำฟิโนลาเวิน (ตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในการทดลองวิธีที่ 1)

วิธีทดลอง

1. เตรียมสารละลายน้ำในหลอดทดลองตามปริมาณในตารางดังนี้

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่	1	2	3	4	5	6	7
สารละลายน้ำมาตรฐานดีออกซิไรโบส ($50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$)	-	0.5	1.0	1.5	2.0	-	-	-
สารละลายน้ำ DNA จากเม็ดเลือดแดง ไก่ น้ำกลั่น	-	-	-	-	-	0.5	1.0	
สารละลายน้ำฟิโนลาเวิน	2.0	1.5	1.0	0.5	-	1.5	1.0	

2. นำหลอดทดลองทั้งหมดแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm โดยใช้หลอดที่ 1 ตั้งจุดศูนย์

แสดงผลการทดลอง

1. เก็บกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของดีออกซีไรโนส หลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 5
2. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในหลอดที่ 6 และ 7 มาอ่านเพื่อหาปริมาณ DNA จากกราฟมาตรฐาน

ตอบคำถามต่อไปนี้

1. สารละลาย DNA ที่เตรียมจากเม็ดเดือดแดง ไม่มีความเข้มข้นเท่าใด
2. สารละลายเบสอะดีนีน (adenine ; A) กوانีน (guanine ; G) ไซโตซีน (cytosine ; C) และ ไทมีน (thymine ; T) จะให้สีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับไดฟินิตามีนหรือไม่ เพราะเหตุใด

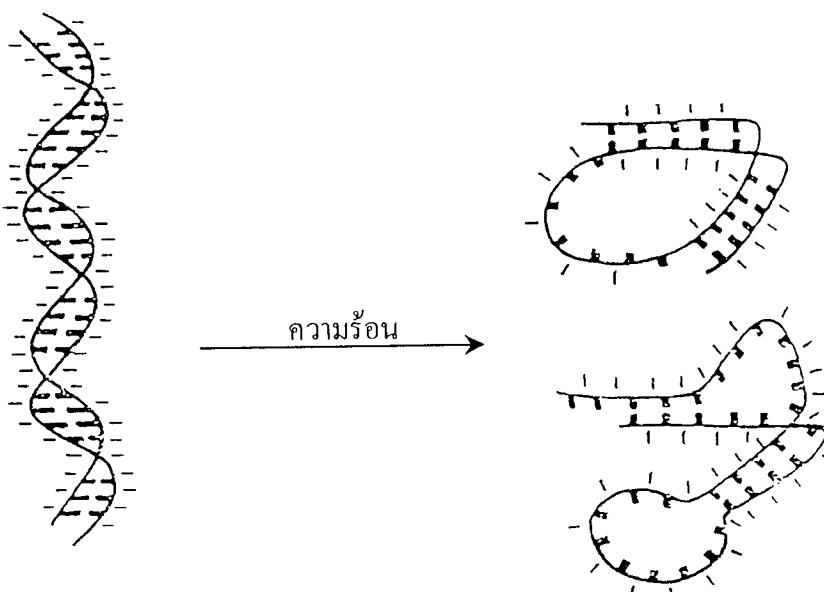
การทดลองที่ 5.3 การหาความหนืดของ DNA

หลักการ

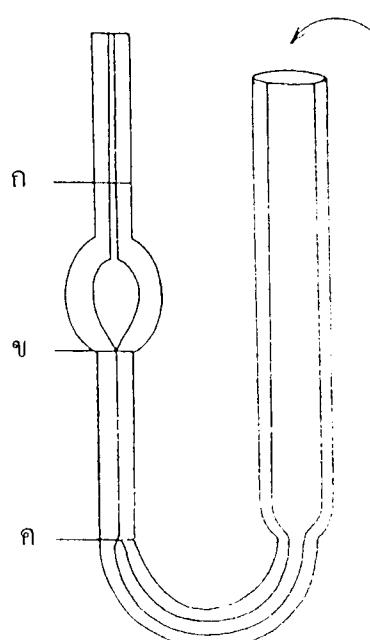
DNA เป็นสารโมเลกุลใหญ่ น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10^6 Dalton เมื่อออยู่ในสารละลายจะต้านการไหลทำให้เกิดความหนืด (viscosity) ขึ้น ความหนืดดังกล่าวขึ้นอยู่กับความสมมาตรของรูปร่างและขนาดของโมเลกุล ดังนั้นการศึกษาความหนืดของ DNA จะทำให้เราทราบถึงความสมมาตรของรูปร่างและขนาดของ DNA ได้

การทดลองนี้ จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของ DNA ที่สกัดจากเม็ดเดือดแดง ไก่ เปรียบเทียบกับความหนืดของสารละลาย DNA ดังกล่าวหลังจากนำไปทำให้ร้อน ทั้งนี้ เพราะความร้อนจะทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสใน DNA เกลียวคู่ ทำให้ DNA คลายเกลียวออกหรือแปลงสภาพ (denature) เมื่อจาก DNA มีประจุลบสูง ดังนั้นเมื่อออยู่ในลักษณะเกลียวคู่ประจุลบจะผลักกัน ทำให้ DNA มีลักษณะเป็นเส้นยาวเหยียดตรงซึ่งมีความหนืดสูง แต่เมื่อ DNA คลายเกลียวออกให้เป็นเส้นเดี่ยว ลักษณะเส้นยาวจะหายไปนั่นคือความหนืดจะลดลง

ความหนืดวัดได้โดยใช้มาตรวัดความหนืดหรือเครื่องวัดความหนืด (viscometer) ซึ่งเป็นเครื่องมือวัดอัตราการไหลของสารละลาย ในการทดลองนี้เราจะเปลี่ยนเทียนอัตราการไหลของสารละลาย DNA ในสภาพธรรมชาติและเมื่อเปล่งสภาพ



รูปที่ 5.2 ลักษณะเกลียวคู่ของ DNA ในสภาพธรรมชาติ และการเปล่งสภาพเมื่อถูกความร้อน



รูปที่ 5.3 มาตรวัดความหนืด

สารเคมีและเครื่องมือ

1. DNA จากเม็ดเลือดแดงไก่ที่เตรียมไว้ในรูปสารละลายของการทดลองที่ 5.1 ใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.05 mg/cm^3 ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ประมาณ 1 หน่วย
2. น้ำกลั่น
3. มาตรความหนืด
4. นาฬิกาจับเวลา
5. อ่างน้ำเดือดและอ่างน้ำแข็ง

วิธีทดลอง

1. เติมน้ำกลั่น 5 cm^3 ลงในหลอดด้านขวามือของมาตราความหนืด ใช้สายยางดูดน้ำกลั่นขึ้นทางหลอดด้านซ้ายมือ จนระดับน้ำสูงถึงขีด ก (รูปที่ 5.3) ปล่อยให้น้ำไหลผ่านหลอดแก้วทางด้านซ้ายมือนี้จนถึงขีด ค จับเวลาในการไหลของน้ำจากขีด ก ถึงขีด ค
2. ใช้มาตราความหนืดอันเดิม จับเวลาการไหลของ DNA 5 cm^3 ที่เตรียมได้จากขีด ก ถึงขีด ค ดังกล่าว (ใช้ความเข้มข้นของ DNA ประมาณ 0.05 mg/cm^3)
3. นำสารละลาย DNA ในข้อ 2 ไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งทันทีจนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปหาเวลาของการไหลจากขีด ก ถึงขีด ค โดยใช้มาตราความหนืดอันเดิม

วิธีแสดงผลการทดลอง

ความหนืดสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\text{ความหนืดสัมพัทธ์} = \frac{\text{เวลาการไหลของสารละลาย DNA}}{\text{เวลาในการไหลของน้ำ}}$$

ตอบคำถามต่อไปนี้

จงอธิบายการเปลี่ยนแปลงของความหนืดสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลอง

การทดลองที่ 5.4 การหาเบสส่วนประกอบของ DNA

หลักการ

DNA มีส่วนประกอบของเบส 4 ชนิดคือ อะดีนีน, กวานีน, ไซโตซีนและไทมีน ดังนั้นเมื่อถลายน DNA ด้วยกรด (เช่น 6 M HCl) จะได้เบสทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว นำต่ำลงดีอกรชีโรบอสและกรดฟอสฟอริก เราสามารถหาชนิดและปริมาณของเบสทั้ง 4 ชนิดได้ โดยนำ DNA ที่ถูกถลายไปแยกด้วยวิธีโครโนโทกราฟีแบบกระดาษ เปรียบเทียบกับเบสมมาตรฐาน

สารเคมีและเครื่องมือ

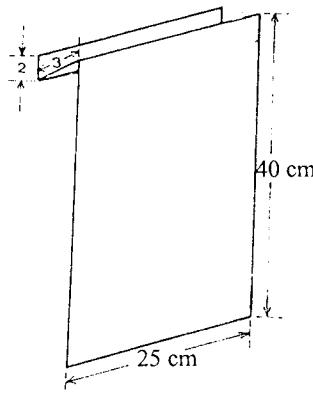
1. DNA ที่สกัดได้
2. กรดไฮโดรคลอริก 6 mol/dm^3 และ 0.01 mol/dm^3
3. isopropanol : น้ำ : conc. HCl (690 : 156 : 164)
4. สารละลายน้ำมารฐาน อะดีนีน, กวานีน, ไซโตซีนและไทมีน ที่ความเข้มข้นของเบสแต่ละชนิดเท่ากับ 0.5 mg/cm^3 ในกรดไฮโดรคลอริก 0.01 mol/dm^3
5. กระดาษโครโนโทกราฟี Whatman เบอร์ 1 ($25 \times 45 \text{ cm}$)
6. หลอดคาพิลลารี ขนาด $50 \mu\text{dm}^3$
7. ถังโครโนโทกราฟี
8. ตู้อบหรือสารละลายน้ำทิลีนไอกล็อกอล (ethylene glycol) 68 เปอร์เซ็นต์ที่ 120°C
9. ตะเกียงอัลตราไวโอเลต

วิธีทดลอง

1. ละลาย DNA ในกรดไฮโดรคลอริก 6 mol/dm^3 ที่ความเข้มข้น 4 mg/cm^3 (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ประมาณ 80 หน่วย) ใช้หลอดคาพิลลารีดูดสารละลายน้ำดังกล่าวจนมีความสูงประมาณครึ่งหลอด ใช้ตะเกียงบุนเดนหลอมหัวและท้ายนำไปทำให้ร้อนที่ 120°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เหล้วนสารละลายน้ำที่ได้ไปใช้หาเบสด้วยวิธีโครโนโทกราฟีแบบกระดาษ

2. พับกระดาษที่ระยะ 2 cm และ 5 cm จากปลายกระดาษด้านกว้าง ให้เป็นรูปตัว Z เพื่อแขวนในถังโครโนโทกราฟี (รูปที่ 5.4) ใช้ดินสอขีดเส้นเริ่มต้นห่างจากปลายกระดาษด้านล่างเป็นระยะประมาณ 3 cm เกี่ยบเครื่องหมายจากบทห่างกัน 2 cm เพื่อเป็นจุดหมายสารละลายน้ำ

หักปลายหลอดคาพิลลารีที่บรรจุสารละลาย DNA ออก และหยดสารละลาย DNA ประมาณ 25 μdm^3 ที่จุดเริ่มต้น (อย่าให้วงกลมใหญ่กว่า 0.5 cm) ทึ้งให้แห้งหรือเป่าให้แห้ง ด้วยเครื่องเป่าลม



รูปที่ 5.4 : โคมนาโทกราฟีแบบกระดาษ

3. เพื่อการหาชนิดและอัตราส่วนของเบสที่ได้จากการสลาย DNA นำสารละลาย DNA ที่มีนิ, ไซโทซีน, อะดีนีนและกวนนีน ซึ่งมีความเข้มข้นอย่างละ 0.50 mg/cm³ 25 μdm^3 หยดลงที่จุดเริ่มต้น เช่นเดียวกับการหยดสารละลายที่ได้จากการสลาย DNA ดังกล่าวข้างต้น

4. นำกระดาษไปแขวนในถังโคมนาโทกราฟี ที่อิ่มตัวด้วยไออกซ์เจนของตัวทำละลาย isopropanol – น้ำ – HCl ซึ่งใส่ไว้ในก้นถัง โดยให้จุดหยดสารไว้อยู่เหนือสารละลาย

5. ตั้งทึ้งไว้จนสารละลายตัวละเคลื่อนที่ขึ้นมาตามกระดาษ จนได้ระยะประมาณ 30 cm จากจุดเริ่มต้น (ประมาณ 15 ชั่วโมง) จึงนำกระดาษออกแขวนให้แห้ง

6. ดูตำแหน่งของเบสต่าง ๆ โดยใช้แสงอัตราไฟโอลูเตตส่องในห้องมีด ใช้คินสอยวัดตำแหน่งของเบสต่าง ๆ วัดระยะจากจุดเริ่มต้นถึงจุดกลางตำแหน่งเบส

7. ตัดกระดาษตามวงคิณสองของตำแหน่งเบส ใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งบรรจุกรดไฮโดรคลอริก 0.01 mol/dm³ ปริมาณ 3 cm³ หลังจากทึ้งทึ้งไว้ประมาณ ½ ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปวัดปริมาณการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm

วิธีแสดงผลการทดลอง

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ใส่ผลการทดลองในตารางข้างล่าง

	สารมาตรฐาน			สารละลายนจากการสลาย DNA		
	$E_M \times 10^{-3}$	R _f	A ₂₆₀	R _f	A ₂₆₀	$\mu\text{mol}/\text{cm}^3$
อะคินีน	14.7	0.35				
กوانีน	11.7	0.25				
ไซโทซิน	6.2	0.45				
ไทมีน	7.9	0.75				

หาอัตราส่วนของ A : T และ G : C

หมายเหตุ ค่าสัมประสิทธิ์ของเบส A ที่ 260 $E_M = 14.7 \times 10^{-3}$ หมายความว่าสารละลายนเข้มข้น $1 \text{ mol}/\text{dm}^3$ ในหลอดใส่สาร (cuvette) 1 cm ให้ค่าการดูดกลืนแสง = 14.7×10^{-3} หรือหมายถึงสารละลายนความเข้มข้น $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$ ให้ค่าการดูดกลืนแสง = 14.7

การทดลองที่ 5.5 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยกวิเคราะห์และทำให้ DNA บริสุทธิ์ เป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาและวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม เป็นเทคนิคที่ทำได้ไจรวดเร็วและประหยัด นอกจากนี้ยังสามารถใช้แยก DNA ที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้ การตรวจหาตำแหน่งของแถบ DNA หลังอิเล็กโทรโฟรีซิสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง โดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทิเดียมไบโรมายด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้นต่ำ ๆ จากนั้นตรวจหาสารเชิงช้อนของเอทิเดียมไบโรมายด์และ DNA (ethidium bromide – DNA complex) โดยดูการ发光 (fluorescence) เมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัตตราไฟโอลูต

หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ในการแยก DNA หรือ RNA โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำในบัฟเฟอร์ที่มี pH ประมาณ 8 ชิ้น DNA จะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสฟे�ต อัตราการเคลื่อนที่ของ DNA ในสแนมไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ขนาดและโครงสร้าง (conformation) ของ DNA

จากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ DNA DNA ที่มีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับ DNA ที่มีขนาดเล็ก (จำนวนหน่วยฟอสฟอตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวล (mass) ของ DNA ไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของ DNA ในสสารไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของ DNA โดยตรง DNA ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า DNA ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ต้องเปรียบเทียบในขณะที่ DNA นั้นอยู่ในโครงสร้างแบบเดียวกัน DNA ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงสร้างต่างกัน ทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย การเคลื่อนที่ของพลาสมิดในขณะที่มีโครงสร้างต่าง ๆ กัน พลาสมิดในรูปที่เรียกว่าซูเปอร์โคอยด์ (supercoiled form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าในรูปปลายเปิด (linear form) และรูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ

2. ความเข้มข้นของอะกาโรส (agarose concentration)

DNA จะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore size) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่ อัตราการเคลื่อนที่ของ DNA ก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล เมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูง ขนาดรูพรุนจะเล็กกว่า เมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำ ๆ ดังนี้จะเห็นได้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของ DNA ในอะกาโรสเจลระหว่างอิเล็กโโทร โฟร์ซีสจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส (ตารางที่ 5.1)

การเคลื่อนที่ของ DNA ในอะกาโรสเจลจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลนั้น ดังสมการ

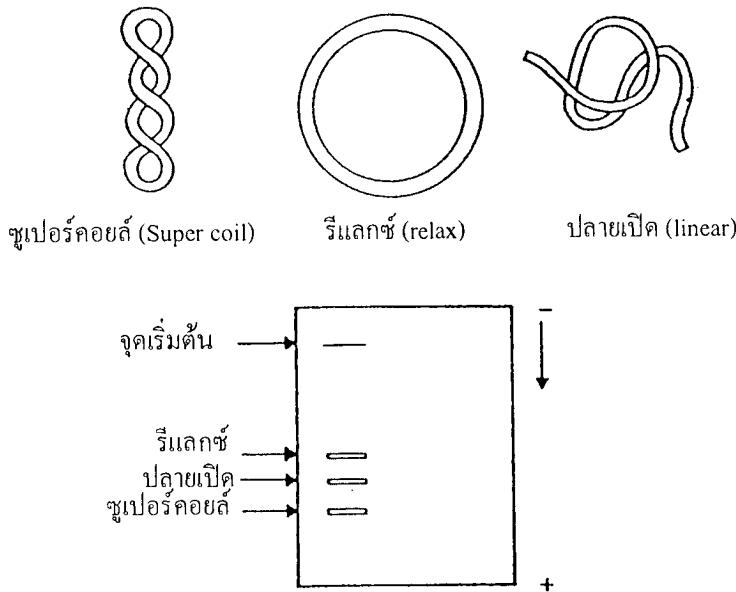
$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r C$$

μ = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของ DNA ในอะกาโรสเจล

μ_0 = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของ DNA ในสภาวะที่ไม่มีอะกาโรสเจล

C = ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficient)



รูปที่ 5.5 ภาพแสดงการเคลื่อนที่ของพลาสมิชนิคหนึ่ง ชิ้งอยู่ในโครงรูปต่าง ๆ กัน 3 แบบคือ ชูเปอร์คอล (supercoiled) รีแลกซ์ (relaxed) และปลายเปิด (linear)

ตารางที่ 5.1 ช่วงขนาดของ DNA ปลายเปิดที่มีการเคลื่อนที่เปรียบเทียบกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (เบอร์เซ็นต์)	ขนาดของ DNA ปลายเปิด (กิโลเบส)
0.3	60 – 5
0.6	20 – 1
0.7	10 – 0.8
0.9	7 – 0.5
1.2	6 – 0.4
1.5	4 – 0.2
2.0	3 – 0.1

หมายเหตุ ตารางนี้ใช้ได้เฉพาะกับ DNA ชิ้งอยู่ในรูปปลายเปิด และต้องทำอิเล็ก troforese ใน 45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0 โดยใช้ความต่างศักย์เป็น 1 V/cm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3. ความต่างศักย์ไฟฟ้า

โดยปกติของการสแกโนเล็ก trophoresis จะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5-5 V/cm แต่ถ้าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำ ๆ (ประมาณ 1 V/cm) เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำ ๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของ DNA ปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของ DNA ปลายเปิดไม่ลากหลัง ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดไม่เล็กมาก

เมื่อใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ ๆ (1 V/cm) เวลาสำหรับการแยกจะก่อให้ข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) จะเกิดการแพร่ของแอบ DNA ที่มีขนาดเล็กได้มาก ทำให้แบบ DNA ที่แยกได้ไม่คุณ หรือในกรณีที่ขนาดไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกจากกันได้เลย ดังนั้น สำหรับ DNA ที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะทำอิเล็ก trophoresis โดยใช้ความต่างศักย์สูง ๆ เพื่อลดการแพร่ของแอบ DNA ลง

อะกาโรสเจลอิเล็ก trophoresis มักจะทำในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ในบัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 mm ด้วยเหตุที่ความด้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก กระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็ก trophoresis จะเคลื่อนผ่านแผ่นอะกาโรสเจล อะกาโรสเจลอิเล็ก trophoresis นิยมทำที่อุณหภูมิห้อง เพราะอัตราเร็วสัมพันธ์ของ DNA ปลายเปิดขนาดต่าง ๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4 – 30 °C แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ มักจะทำอิเล็ก trophoresis ที่ 4 °C ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำเจลจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น

รายละเอียดที่สำคัญในอะกาโรสเจลอิเล็ก trophoresis

1. บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอะกาโรสเจลอิเล็ก trophoresis มีหลายชนิด แสดงดังตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเคมีและอุตสาหกรรมเคมี

บัฟเฟอร์	ความเข้มข้น	จำนวนสารที่ใช้เตรียม บัฟเฟอร์ที่เข้มข้น 1 dm ³
Tris – acetate, pH 8.0 (TA)	40 mM Tris-OH 20 mM acetic acid 2 mM EDTA	50X* : 242 g Tris base 57.1 cm ³ glacial acetic acid 37.2 g Na ₂ EDTA
Tris – borate, pH 8.3 (TB)	89 mM Tris-OH 89 mM boric acid 2.5 mM EDTA	10X** : 108 g Tris base 55.1 g boric acid 9.3 g Na ₂ EDTA
Tris– phosphate, pH 8.5 (TP)	40 mM Tris-OH 20 mM acetic acid 2.5 mM EDTA	10X** : 108 g Tris base 15.5 cm ³ 85% H ₃ PO ₄ (1.679 g/cm ³) 9.3 g Na ₂ EDTA

* 50X คือ บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 50 เท่าของความเข้มข้นปกติที่ใช้ทำอิเล็กโทร โฟริชีส

** 10X คือ บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นปกติที่ใช้ทำอิเล็กโทร โฟริชีส

บัฟเฟอร์ที่ใช้จะเตรียมในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่จะใช้จริง 10 เท่า (10X) ขึ้นไป เมื่อต้องการใช้จึงจะนำมาทำให้เจือจางลง

Tris – borate (TB) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง andan DNA ที่แยกได้จะเล็กและคงชัดบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) เก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในงานประจำโดยทั่วไป

Tris– phosphate (TP) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูงคล้าย Tris-borate andan DNA ที่แยกโดยใช้บัฟเฟอร์นี้จะคงชัดดี ในสารละลายที่มีความเข้มข้น 10 เท่า จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้จึงเก็บไว้ไม่ได้นาน

Tris – acetate (TA) เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุต่ำ ดังนั้นระหว่างอิเล็กโทร โฟริชีส จะต้องคงอยู่บนบัฟเฟอร์ระหว่างขั้วหั้งสองข้าด้วยกัน จุลินทรีย์สามารถเจริญในบัฟเฟอร์ชนิดนี้ได้ ดังนั้นการที่จะเก็บบัฟเฟอร์นี้ได้นานขึ้น นักทำให้ไรเชื้อโดยการอัตโนมัติ (autoclave) ก่อนที่จะนำไปเก็บที่ 4 °C การใช้บัฟเฟอร์ชนิดนี้มีข้อดีคือ สามารถทำอิเล็กโทร โฟริชีส โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง ๆ ได้โดยที่อุตสาหกรรมจะไม่ร้อน

2. อะกาโรส (agarose)

อะกาโรสเป็นสารโพลิแซ็คคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบไปด้วยกาแลกโตส (galactose) และอนุพันธ์ โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮครอซิลิสระของน้ำตาลทำให้สายอะกาโรสพันไวว์ (crosslinked) กัน ได้ อะกาโรสในสารละลายถูกเป็นเจลที่มีลักษณะเป็นรูปrun ความเข้มข้นของอะกาโรสในสารละลายจะเป็นตัวกำหนดขนาดของรูปรุน ถ้าความเข้มข้นสูงขนาดรูปรุนจะเล็ก

การเตรียมอะกาโรสเจล

อะกาโรสเจลที่ใช้ในการทำอิเล็กโโทรโฟรีซจะมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.5–1.8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมได้โดยเดินทางอะกาโรสลงในบัฟเฟอร์ นำไปต้มในอ่างน้ำจิ่งเดือด (ไม่ควรต้มสารละลายอะกาโรสนานๆโดยตรง) ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงนำไปเทในเจลแชมนเบอร์

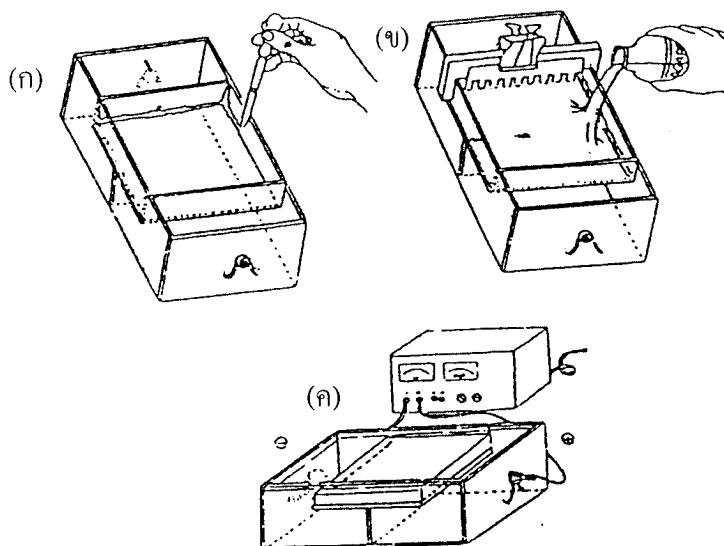
การเทเจลลงในเจลแชมนเบอร์เริ่มโดยใส่ແບพลาสติกปิดด้านปลายเปิดทั้งสองข้างฐานรองเจล ยาขับร้อน ๆ บริเวณที่จะเทเจลด้วยเจลจำนวนน้อยทึ่งให้เจลแข็งตัว (รูปที่ 5.6 ก) ใส่หวีโดยให้ปลายชี้หวีสูงจากฐานประมาณ 2 mm (รูปที่ 5.6 ข) แล้วจึงเทอะกาโรสที่อุ่นลงไปให้มีความสูงประมาณ 3 – 5 mm ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว ค่อย ๆ ดึงหวีและແບพลาสติกออกจากเจลแชมนเบอร์ จะได้อะกาโรสเจลที่มีหลุมสำหรับหยดสารละลาย DNA ที่ต้องการแยก (รูปที่ 5.6 ค) ก่อนที่จะหยดสารตัวอย่าง DNA ลงในหลุมที่เตรียมไว้ เทบบัฟเฟอร์ลงไปให้ท่วมเจลสูงประมาณ 1 – 3 mm

3. การหยดสารตัวอย่าง DNA

เพื่อป้องกันไม่ให้สารตัวอย่าง DNA ที่หยดลงในหลุมฟังชั่นมา และเพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุลบและมีขนาดไม่เลกุลเด็กในสนามไฟฟาระหว่างอิเล็กโโทรโฟรีซ จะผสมสารตัวอย่าง DNA กับสีติดตาม (tracking dye) ซึ่งประกอบด้วยสารที่ให้ความหนืดอาจเป็นกลีเซอรอล (glycerol) โซโคโรสหรือไฟคอลล์ (ficoll) โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 3 – 9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้กลีเซอรอลเป็น 6 – 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้โซโคโรสและเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ไฟคอลล์ สีติดตามยังประกอบไปด้วย 0.025 เปอร์เซ็นต์ ของสารมีสีที่มีโนเลกุลขนาดเล็กและมีประจุลบ อาจจะเป็นบромฟีโนลบลู (bromophenol blue) หรือบромฟีโนลกรีน (bromophenol green) และสารดีเนเจอร์ (denature) โปรตีน เช่น SDS หรือยูเรีย สีติดตามมักจะเตรียมอยู่ในรูปสารละลายที่เข้มข้นประมาณ 6 เท่า เมื่อต้องการใช้ผสมกับสารตัวอย่าง DNA ในอัตราส่วน 1 : 5 แล้วจึงนำไปหยดลงในหลุมบนอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้โดยใช้ไมโครปิป็อกต์

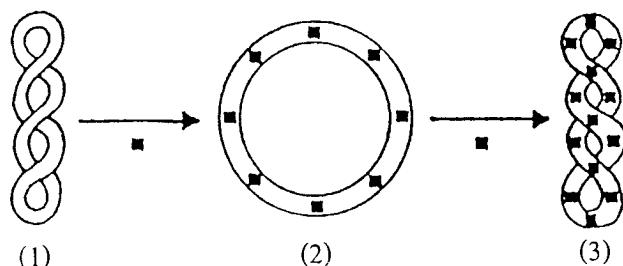
4. การย้อม DNA ในอะก้าโรสเจล

การตรวจหาตำแหน่งของแคน DNAs หลังอิเล็กโทรโฟรีซจะทำโดยย้อมอะก้าโรสเจลด้วยเอทิเดียมโนร์ไมค์ ไมเลกุลของเอทิเดียมโนร์ไมค์จะเข้าไปจับกับเบสคู่สูงของDNAs เกลี่ยๆ ว่า “โดยการอินเตอร์คาลเลต (intercalate) ดังรูป”



รูปที่ 5.6 ภาพแสดงการเทอะกาโรสเจลในแซมเบอร์

(ภาพจากหนังสือการประชุมปฏิบัติการ “เทคนิคพื้นฐานของพันธุวิศวกรรม”
19-24 พฤษภาคม 2529, ภาควิชาเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)



รูปที่ 5.7 ภาพแสดงการอินเตอร์คาลเลตระหว่างเอทิเดียมโนร์ไมค์ (EB) กับเบสคู่สูงของ DNA

รูปชุดเปอร์คอบอยล์ของพลาสมิด (1) เมื่อจับกับเอทิเดียมโนร์ไมค์แล้วจะทำให้โครงรูปของพลาสมิดนั้นเปลี่ยนเป็นรูปรีแลกซ์ (2) เมื่อจำนวนไมเลกุลของเอทิเดียมโนร์ไมค์ที่เข้าจับกับDNA มากขึ้นจะทำให้โครงรูปของพลาสมิดถูกดึงมาเป็นรูปชุดเปอร์คอบอยล์ได้อีก (3) แต่ทิศทางการหมุนครองกันข้ามกับชุดเปอร์คอบอยล์แบบแรก

การย้อมเอทิเดียมไบร์ไมด์จะทำโดยใช้อุปกรณ์ทางเคมีชีวภาพ เช่น เครื่องย้อมด้วยไนโตรเจล หรือ เครื่องย้อมด้วยเอนไซม์ เช่น โปรตีนเรสเซอร์ หรือ แอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของดีเอชเอ เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของดีเอชเอ หรือ การทำให้ดีเอชเอแตกตัว เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถตรวจจับได้โดยการใช้แสงสีฟ้า 450 nm ในการตรวจวัด

การตรวจแบบ DNA หลังย้อมด้วยเอทิเดียมไบร์ไมด์ จะทำโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่นตั้งแต่ 260 นาโนเมตร ถึง 300 นาโนเมตร สารเชิงซ้อนของเอทิเดียมไบร์ไมด์ และ DNA มีคุณสมบัติคุ้มครองแสงที่ความยาวคลื่น 300 และ 360 nm และปล่อยแสงสว่างสีส้มออกมากที่ความยาวคลื่น 590 nm

ข้อควรระวัง เอทิเดียมไบร์ไมด์และเมแทบอลิต (metabolite) เป็นมิวทาเจน (mutagen) ควรสวมถุงมือขณะที่ทำการทดลอง

อุปกรณ์

1. เจลแคมเปอร์ (gel chamber)
2. เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (power supply)
3. เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator, biorad)
4. ไมโครปีเปอร์
5. กล้องถ่ายรูปและฟิล์ม (Tri-X, Kodak)
6. ที่ตักเจลออกจากแซมเบอร์ (ใช้แผ่นพลาสติก ขนาดเล็กกว่าเจลเล็กน้อย)
7. กล่องพลาสติก (เพื่อใช้สำหรับย้อมเจล)

สารเคมี

1. 10X TB และ TB อิเล็กโทรไฟริชีสมบัฟเฟอร์ เตรียมโดย : ละลายน้ำ tris base 10.8 g กรดบอริก (boric acid) 5.5 g และ Na₂EDTA 0.93 g ในน้ำกลั่น 80 cm³ ปรับปริมาตรให้เป็น 100 cm³ จากนั้นเจือจาง 10X TB นี้ให้เป็น TB โดยเติมน้ำกลั่น 900 cm³ ลงใน 10X TB จำนวน 100 cm³

2. อะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดย : ใส่อากาโรส 0.7 g ลงใน TB (Tris borate buffer) 100 cm³ ต้มในอ่างน้ำเดือดพร้อมคนเป็นครั้งๆ จนกว่าจะละลายหมด ทิ้งไว้ให้อุ่นหมุนคลื่น 50 °C ก่อนนำไปเทลงในเจลแซมเบอร์

3. สีติดตาม (บرومฟินอลูม 0.25 เปอร์เซ็นต์ ฟีโคล 400 40 เปอร์เซ็นต์ และ SDS 0.1 เปอร์เซ็นต์) เตรียมโดย : ละลายบرومฟินอลูม 2.5 mg ฟีโคล 400 จำนวน 4.0 g และ SDS 50 mg ลงในน้ำกลั่นม่านเชือ จำนวน 8 cm³ เมื่อละลายหมดแล้ว ปรับปริมาตรให้เป็น 10 cm³

หมายเหตุ เครื่องแก้วที่ใช้เตรียมและเก็บสีติดตามควรผ่านการทำลายนิวคลีอสโดยการออโตเคลน

4. DNA staining solution (เอทิเดียมไบรอนีค 2.5 μg/cm³) เตรียมโดย : ละลายเอทิเดียมไบรอนีค 2.5 mg ในน้ำกลั่น 1 dm³ เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

วิธีทดลอง

1. เตรียมอะกาโรสเจล 0.7 เปอร์เซ็นต์ แล้วเทลงในแซมเบอร์ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอย่างต่อ 2 ชั่วโมง ก่อนใช้

2. เท TB ลงไปจนท่วมเจล โดยมีระดับสูงกว่าเจลประมาณ 1 – 3 cm³

3. ผสม DNA ที่เตรียมและสีติดตามให้มีปริมาณเป็นอัตราส่วน 3 : 1 – 5 : 1 จากนั้นจึงหยดลงในหลุมบนอะกาโรสเจล ด้วยไมโครปิเพตต์ 5 μg/cm³ โดยกำหนดหลุมดังนี้

หลุมที่	ชนิดของ DNA	ปริมาณ DNA (μg)	ปริมาตรของ DNA ก่อนย้อมสีติดตาม (μg/cm ³)
1	DNA มาตรฐาน	0.1	
2	DNA ที่ตกด้วย		15
3	DNA ที่ตกด้วย		15
4	DNA มาตรฐาน	0.1	

4. ต่อขั้วไฟฟ้ากับเครื่องกำเนิด ตั้งความต่างศักย์ไฟฟ้าให้คงที่ที่ 80 V ทิ้งไว้ประมาณ 3 ชั่วโมง หรือจนสีน้ำเงินของบرومฟินอลูมเคลื่อนมาใกล้ถึงขอบเจลอีกด้านหนึ่ง (ห่างจากขอบประมาณ 1 – 2 cm) ความต่างศักย์ไฟฟ้าอาจใช้เพียง 15 V แต่เพิ่มเวลาอีเล็ก trophoretic เป็นประมาณ 10 ชั่วโมง

5. ปิดกระถางไฟฟ้า ตักอะโภโรสเจลออกใส่ลงในกล่องพลาสติกที่บรรจุน้ำยาซ้อม DNA ($2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที ล้างอะโภโรสเจลด้วยน้ำกลั่น ก็งไว้ประมาณ 30 นาที โดยเบื้องเป็นครั้งคราว
6. ตรวจดูแบบ DNA บนอะโภโรสเจล โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต
ข้อควรระวัง : เพื่อป้องกันอันตรายจากแสงอัลตราไวโอเลตที่จะเกิดกับตา ควรสวมแว่นตาหรือใช้แผ่นแก้ววางปิดอะโภโรสเจลขณะดูผลการทดลอง
7. บันทึกผลการทดลองด้วยการถ่ายภาพ

**บันทึกผลการทดลอง
บทปฏิบัติการที่ 5 ปฏิบัติการเรื่อง กรณีวินิจฉัย**

บันทึกผลการทดลองที่ 5.1 การสกัด DNA จากเม็ดเลือดแดงไป

ลักษณะของ DNA ที่สกัดได้

.....

.....

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ตอบคำถาม

1. หน้าที่ของสารละลายเหล่านี้ในการใช้แยก DNA คืออะไร
ก. NaCl และ SDS
-
-
-

ช. คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ค. เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

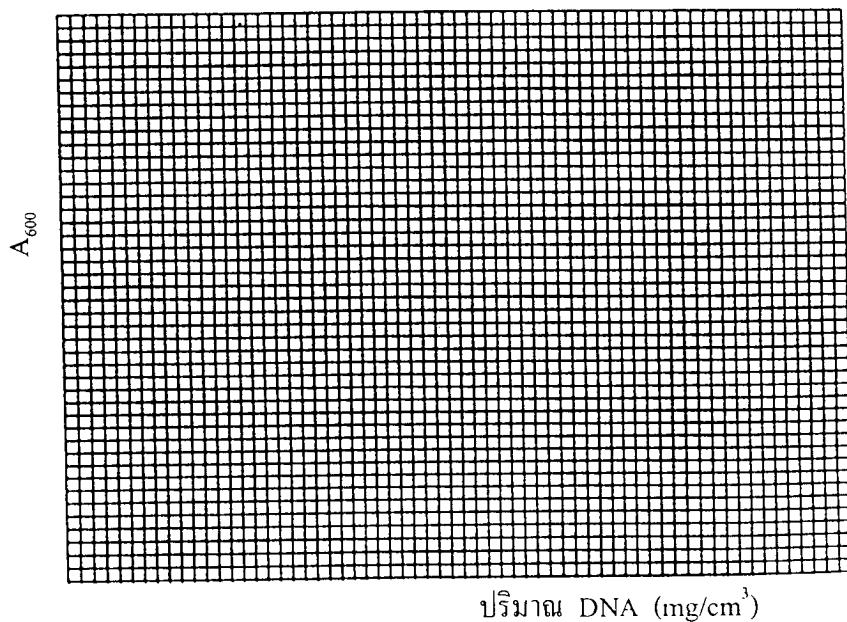
2. จากเดี๋ดไก่ 10 cm³ ท่านสามารถสกัด DNA ได้เท่าไร

บันทึกผลการทดลองที่ 5.2 การหาปริมาณ DNA ด้วยวิธีไดฟินิตามีน

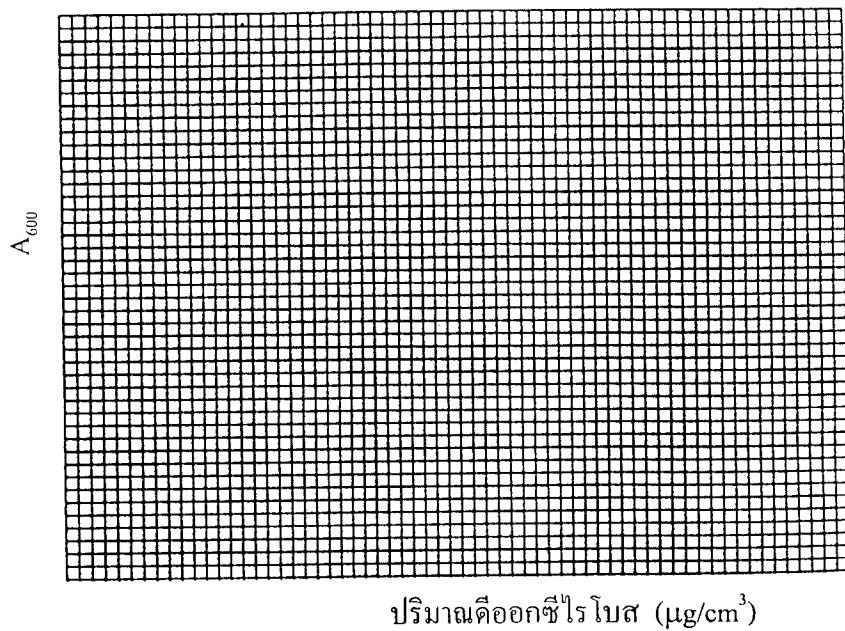
ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 5.2 วิธีที่ 1

สารที่เติม (cm^3)	หลอดที่						
		1	2	3	4	5	6
DNA มาตรฐาน (0.1 mg/cm^3)	-	0.2	0.4	0.8	1.6	2.0	
HClO_4 0.5 mol/dm^3	2.0	1.8	1.6	1.2	0.4	-	
สารละลายไดฟินิตามีน	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	
← ต้มในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง							→
← ทิ้งไว้ให้เย็น							→
A_{600}			0.02	0.04	0.08	0.16	0.20
ปริมาณ DNA (mg/cm^3)							

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{600} กับปริมาณของ DNA มาตรฐาน



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{600} กับความเข้มข้นของดีออกซีโรบอส



ตอบคำถาม

1. สารละลายนี้ที่เตรียมจากเม็ดเลือดแดงไก่ มีความเข้มข้นเท่ากับ
.....
.....
2. สารละลายนี้ อะดีนีน 瓜氨酸 โซโลชิน และไทมีน จะให้สีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับไดฟินิตามีนหรือไม่
 เพราะ

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 5.3 การหาความหนืดของ DNA

สาร	เวลาการไหล (นาที)
น้ำ	
สารละลายน้ำ	
สารละลายน้ำ ซึ่งผ่านการต้มในอ่างน้ำเดือด 30 นาที	

วิธีคำนวณหาความหนืดสัมพัทธ์

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

ตอบคำถาม

การเปลี่ยนแปลงของความหนืดสัมพัทธ์ที่ได้จากการทดลองคือ.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 5.4 การหาเนส่วนประกอบของ DNA

	สารมาตรฐาน			สารละลายนจากการสลาย DNA		
	$E_M \times 10^{-3}$	R_f	A_{260}	R_f	A_{260}	$\mu\text{mol}/\text{dm}^3$
อะคินีน	14.7	0.35				
กوانีน	11.7	0.25				
ไซโตซีน	6.2	0.45				
ไทดีน	7.9	0.75				

อัตราส่วนของ A:T และ G:C มีค่าเท่ากับ

วิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ตอบคำถาม

1. สาเหตุที่อะคินีนและการนีนเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกันในวิธีโครม่าโทกราฟีแบบกระดาษ เพราะ
.....
.....
.....
.....
.....
2. ถ้าใช้ RNA แทน DNA ในการทดลองลักษณะนี้ จะได้ผลเหมือนกันหรือไม่
 เพราะ
.....
.....
.....
.....
3. จากการทดลองนี้ ถ้าเปลี่ยนอุณหภูมิของการสลายจาก 120°C เป็น 30°C จะได้ผลเหมือนกันหรือไม่
.....
.....

ตารางบันทึกผลการทดลองที่ 5.5 อะการอสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

หลุมที่	ชนิดของ DNA	ปริมาณ DNA (μg)	ปริมาตรของ DNA ก่อนย้อมสีติดตาม (μg/cm ³)
1	DNA มาตรฐาน	0.1	-
2	DNA ที่สกัดได้	-	15
3	DNA ที่สกัดได้	-	15
4	DNA มาตรฐาน	0.1	-

เมื่อเทียบความเข้มข้นของแคน DNA ที่สกัดได้กับ DNA มาตรฐาน DNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นประมาณ

.....

.....

.....

วิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

สรุปผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

บรรณานุกรม

กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์ และชัยณัสร สวัสดิวัฒน์. **ปฐมบัตการและหลักเบื้องต้นในวิชาชีวเคมี.**

กรุงเทพมหานคร : ออมรินทร์การพิมพ์, 2521.

คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. **ตำราปฐมบัตการชีวเคมี เมืองตัน.** กรุงเทพมหานคร, 2536.

คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. **คู่มือปฐมบัตการชีวเคมี เมืองตัน.** เชียงใหม่, 2540.

นิตยา โภชนา. **การวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้หลักการอิเล็กโทรไฟฟ์ชิส.** ศูนย์วิทยาศาสตร์, สถาบันราชภัฏอุตรดิตถ์, 2544.

Campbell, P.N., and Smith, A.D. **Biochemistry Illustrated.** London : Churchill Livingstone, 1982.

Hawk, P.B. Oser, B.L. and Summerson, W.H. **Practical Physiological Chemistry.** 13th ed. McGraw-Hill Books Company Inc., 1954.

Henry, R.J., Cannon, D.C. and Winkelmann, J.W. **Clinical Chemistry, Principles and Teachers.** 2nd ed. Harper and Row, 1974.

Stryer, L. **Biochemistry.** 2nd ed. San Francisco : W.H Freeman, 1982.

Varly, H., Gowenlock, H.A. and Bell, M. **Practical clinical Biochemistry.** Vol. I, London : Willium Heinmans Medical Book Ltd., 1980.