ชื่อ _____ นามสกุล _____ รหัสประจำตัวนิสิต _____

Assignment: Determination of Biomolecules

จงเติมคำตอบที่ถูกต้องและเหมาะสมที่สุดลงในช่องว่างที่กำหนดให้

1. นักวิจัยดำเนินการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของปลากะพง *Lates calcarifer* โดนนำเนื้อเยื่อของปลากะพงมาบดโดยใช้ hand homogenizer จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนของสารละลายส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยรายงานค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วย กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) ต่อความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายส่วนใส (total protein concentration)

   1.1 จากการทดลองดังกล่าว ในขั้นตอนการวัดความเข้มข้นของโปรตีน นักวิจัยควรวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี การใด (Biuret test / Bradford protein assay / Lowry protein assay) พร้อมให้เหตุผลประกอบ

1.2 จากการทดลองดังกล่าว หากนักวิจัยเลือกใช้การวัดความเข้มข้นโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford assay test โดยทำการเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับการหาความเข้มข้นโปรตีนในตัวอย่าง โดยใช้ Bovine Serum Albumin เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (standard protein) โดยมีความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน 6 ความเข้มข้นด้วยกัน ค่าการดูดกลืนแสง (spectrum absorbance) ที่ความยาวคลื่น 595 nm ที่วัดได้ดังแสดงในตาราง

การวัดครั้งที่ 1		**การวัดครั้งที่ 2**	
ความเข้มข้นของ Standard BSA (mg/ml)	**Absorbance ที่ 595 nm**	**ความเข้มข้นของ Standard BSA (mg/ml)**	**Absorbance ที่ 595 nm**
1.5	1.4	1.5	1.5
1.0	0.97	1.0	0.81
0.8	0.79	0.8	0.79
0.6	0.59	0.6	0.60
0.4	0.37	0.4	0.45
0.2	0.17	0.2	0.13

1.2.1 สำหรับการวัดความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง (supernatant samples) นักวิจัยควรใช้สร้างกราฟมาตรฐานจากการวัดครั้งใด เพราะเหตุใด

1.2.2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm ของตัวอย่างสารน้ำชั้นบน (supernatant sample) อ่านค่าได้ 0.84 ดังนั้นความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างดังกล่าวมีค่าเท่าใด ในหน่วย **“mg/l”** พร้อมแสดงวิธีการคำนวณ

2. นักชีววิทยาทางทะเลได้สกัด DNA จากครีบของปลาทูเพื่อการศึกษาวิจัยทางด้านพันธุศาสตร์ประชากร จากนั้นต้องการตรวจความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง DNA ที่ได้จากสกัดเบื้องต้นอย่างคร่าวๆ โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่อ 280 nm (A260:A280) โดยได้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงตามตามตาราง

ตัวอย่าง DNA ที่ได้จากการสกัด	**A260 : 280**
Replication No. 1	1.8
Replication No. 2	2
Replication No. 3	1.1

จากผลการวัดดังกล่าว นักวิจัยควรเลือกอย่างตัวอย่างใดสำหรับใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป เพราะเหตุใด จงอธิบาย

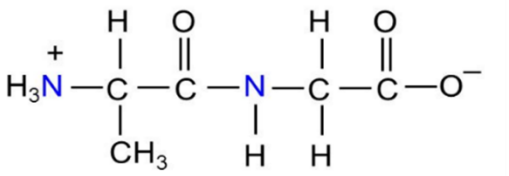
3. การทดสอบสารละลายน้ำตาลโดยใช้การทดสอบกับสารละลายเบเนดิกต์ (Benedict's test) เป็นหนึ่งในวิธีการที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากสำหรับการตรวจสอบน้ำตาลแบบเบื้องต้นในสารละลายตัวอย่าง จากการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการดังกล่าวได้ผลการทดลองตามตาราง

ตัวอย่างสารละลายน้ำตาล	**ผลการทดสอบ**
1 g % Glucose	สารละลายมีสีเขียวเข้ม
5 g % Glucose	สารละลายมีสีเขียวเข้มและเกิดตะกอนสีแดงอิฐ
3 g % Fructose	สารละลายมีสีส้มและเกิดตะกอนสีแดงอิฐ
3 g % Maltose	สารละลายมีสีเขียวและเกิดตะกอนสีแดงอิฐ
5 g % Sucrose	สีฟ้า (ไม่มีการเปลี่ยนแปลง)

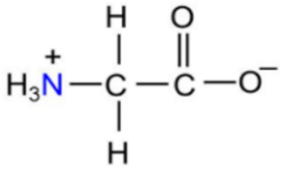
3.1 จงอภิปรายผลการทดสอบดังกล่าว

3.2 เมื่อผู้ทดสอบเติมกรด 1 M HCl ลงไปในสารละลายน้ำตาล 5 g % sucrose เล็กน้อย จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 นาที จากนั้นรีบนำมาทดสอบกับสารละลายเบเนดิกต์ ปรากฏว่าให้ผลบวก (positive result) กับการทดสอบกับสารละลายเบเนดิกต์ เกิดตะกอนสีแดงส้มบริเวณก้นของหลอดทดลอง จงอภิปรายผลการทดสอบดังกล่าว

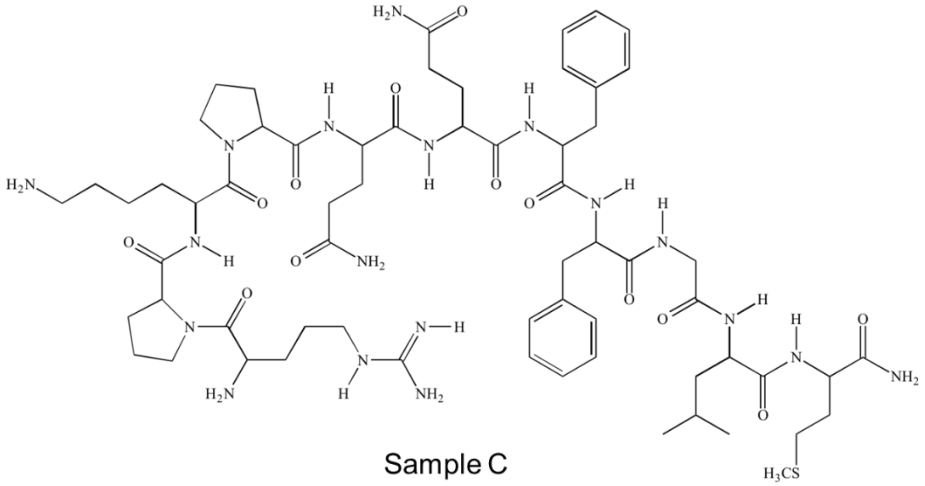
4. นิสิตทำการทดสอบโปรตีนโดยใช้การทดสอบกับสารละลายไบยูเร็ต (Biuret's test) ในสารละลายที่ประกอบด้วยพอลิเพปไทด์และกรดอะมิโนตัวอย่างที่โครงสร้างดังต่อไปนี้



Sample A



Sample B



Sample C

จากการทดสอบดังกล่าว ได้ผลการทดลองดังแสดงในตาราง

ตัวอย่าง	Biuret' test
Sample A	Negative
Sample B	Negative
Sample C	Positive

จากตารางแสดงผลการสอบตัวอย่างทั้ง 3 ตัวอย่าง จงอภิปรายผลการทดสอบดังกล่าว

5. ระดับความเค็ม (salinity) เป็นหนึ่งในปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตและการตอบสนองเชิงสรีระของสัตว์ทะเลได้ โดยความเค็มที่ลดลงสามารถส่งผลให้เกิดการลดลงของความเข้มข้นออสโมติกและไอออน (osmotic and ionic concentration) ในเลือดของสัตว์ทะเล นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดการเพิ่มปริมาตรของเซลล์ หรือ อาจเรียกว่า การบวมของเซลล์ (cell swelling) โดยการเกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรและขนาดของเซลล์ทำให้เซลล์สูญเสียโครงสร้างและการทำงานในหลายด้าน ในด้านการตอบสนองเชิงสรีระเพื่อรักษาปริมาตรของเซลล์ (cell volume regulation) กรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) และไอออนบางชนิด เช่น K^+ มีบทบาทสำคัญในการรักษาหรือปรับปริมาตรของเซลล์ โดยสัตว์ทะเลมีการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นและชนิดของกรดอะมิโนอิสระภายในเซลล์เพื่อรักษาปริมาตรของเซลล์ขณะเผชิญกับการเปลี่ยนแปลงความเค็ม

   จากข้อมูลดังกล่าว นักนิเวศสรีรวิทยาทางทะเลต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดอะมิโนอิสระในเลือดและในเซลล์ของกุ้งลายเสือ *Penaeus monodon* เมื่อถูกเลี้ยงในระดับความเค็มที่แตกต่างกัน นักวิจัยควรใช้หลักการทดสอบใดสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Biuret’ test / Bradford assay / Lowry test / Ninhydrin test) พร้อมอธิบายว่าเพราะเหตุใดถึงเลือกวิธีการดังกล่าวและวิธีการอื่นมีข้อจำกัดอย่างไรถึงไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้