สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน)

Synchrotron Light Research Institute (Public Organization)

เอกสารความรู้ (knowledge documents)

ประเภทเอกสาร

☑ TR: รายงานเชิงเทคนิค (TECHNICAL REPORT)

☐ TN: รายงานเชิงเทคนิค (ฉบับย่อ) (TECHNICAL NOTE)

☐ MN: คู่มือการดำเนินงาน (Operation Manual) / คู่มือการใช้งาน (Instruction Manual) / แผนปฏิบัติการ (Operation Plan)

หมายเลขเอกสาร(For QDS) **KM Document No.**	SLRI-TR-2025-079
ชื่อเรื่อง **Title**	Optimization and Seeding strategies on protein crystallization การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึกโปรตีน โดยใช้ระบบอัตโนมัติช่วยตกผลึกโปรตีน
ชื่อฝ่าย **Department**	ฝ่ายระบบลำเลียงแสง
วันที่เผยแพร่ **Release date**	21 พฤศจิกายน 2568
ระดับการเปิดเผยข้อมูล **Level of Disclosure**	☐ ข้อมูลในรายงานเป็นความลับ (Undisclosed)
	☐ เปิดเผยข้อมูลเฉพาะภายในฝ่ายหรือส่วนงาน (Information can be disclosed within department/section)
	☐ เปิดเผยข้อมูลได้สำหรับพนักงานของสถาบันฯ และอนุญาตให้บันทึกข้อมูลเข้าเป็นส่วนหนึ่งของระบบ Knowledge Management ภายในสถาบันฯ (Information can be disclosed for SLRI staffs and can be part of SLRI's Knowledge Management System)
	☑ เปิดเผยข้อมูลได้เพื่อเป็นองค์ความรู้สาธารณะ เช่นเว็บไซต์ของสถาบันฯ (Information is available for public)
คำสำคัญ **Keyword**	Crystallization, protein crystal, Xtallab

รายชื่อผู้จัดทำรายงานหรือผู้ดำเนินโครงการ (Name)	**ส่วนร่วมในการปฏิบัติงานในโครงการ Responsible tasks in the project**
ดร. จักริ์รดา อัตตรัถยา	ปรึกษากับผู้เชี่ยวชาญ ทำการทดลอง เก็บข้อมูล จัดทำรายงาน
ดร. ณัฐธวัล ประมาณพล	ปรึกษา ประสานกับผู้เชี่ยวชาญ ทำการทดลอง ตรวจทานรายงาน
ดร. รัตนา เจริญวัฒนาเสถียร	ทำการทดลอง เก็บข้อมูล

บทคัดย่อ

กระบวนการตกผลึกโปรตีนเป็นขั้นตอนสำคัญที่มีผลโดยตรงต่อคุณภาพของข้อมูลการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์และความสำเร็จในการหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน อย่างไรก็ตาม การตกผลึกขั้นต้นมักประสบปัญหาได้ผลึกขนาดเล็กมาก เกิดการตกตะกอน ผลึกเกาะเป็นกลุ่ม หรือมีความเป็นระเบียบภายในผลึกต่ำ ส่งผลให้คุณภาพข้อมูลไม่เพียงพอต่อการประมวลผล รายงานฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากลยุทธ์การหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) และเทคนิคการใช้เมล็ดผลึก (seeding) โดยอาศัยระบบตกผลึกโปรตีนอัตโนมัติ เพื่อยกระดับคุณภาพผลึกโปรตีนสำหรับการใช้งานบนลำเลียงแสงที่ 7.2W: MX ของสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน ในการศึกษาได้อธิบายแนวทางการปรับสภาวะตกผลึก ทั้งด้านปัจจัยทางเคมี (เช่น pH ชนิดและความเข้มข้นของสารช่วยตกผลึก สารเติมแต่ง และความเข้มข้นของโปรตีน) และปัจจัยทางกายภาพ (อุณหภูมิ ปริมาณตัวอย่าง และวิธีการทดลอง) ร่วมกับการใช้โปรแกรมควบคุมเครื่องตกผลึกอัตโนมัติในการออกแบบและคำนวณสารละลายที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังได้นำเสนอขั้นตอนการเตรียม microseed stock การทำซีรีย์การเจือจางเมล็ดผลึก และการใช้โหมด Single Protein Seeding บนระบบอัตโนมัติเพื่อถ่ายทอดนิวคลีไอไปยังสภาวะสารละลายใหม่อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการประยุกต์ใช้กลยุทธ์ดังกล่าวกับตัวอย่างโปรตีนต้นแบบ เช่น *Ls*TIM ที่ผสมสารอนุพันธ์ NSC639174 และโปรตีน EGFP แสดงให้เห็นว่าทั้งเทคนิค optimization และ seeding สามารถช่วยให้ได้ผลึกที่มีขนาดใหญ่ขึ้น รูปทรงเหมาะสม และมีความเป็นระเบียบดีขึ้น ส่งผลต่อการได้ข้อมูลการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ที่มีคุณภาพสูงขึ้นจากสถานีทดลอง BL7.2W: MX แนวทางในรายงานนี้จึงสามารถใช้เป็นคู่มือเชิงปฏิบัติสำหรับเจ้าหน้าที่และผู้ใช้บริการที่ต้องการปรับปรุงประสิทธิภาพการตกผลึกโปรตีน โดยเฉพาะเมื่อใช้เครื่องตกผลึกโปรตีนอัตโนมัติในการสนับสนุนงานโครงสร้างโปรตีนเชิงลึกต่อไป

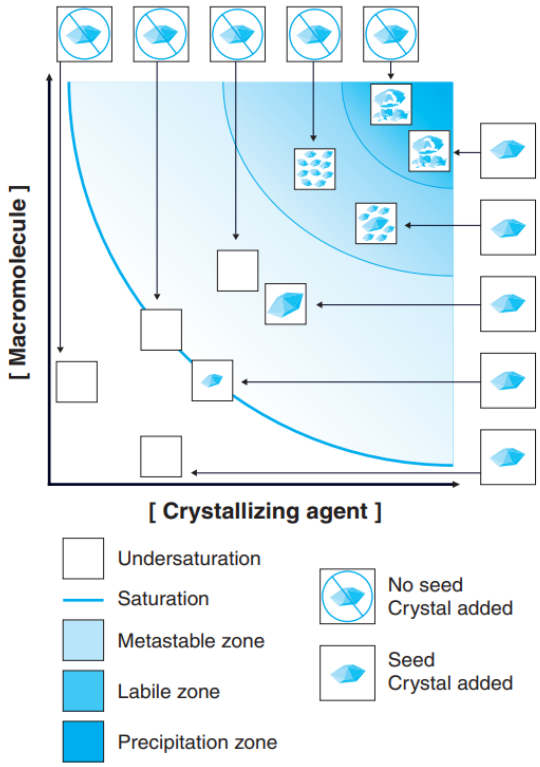
1. บทนำ

ในกระบวนการผลึกศาสตร์ของโปรตีนมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง และหนึ่งในปัจจัยเหล่านี้ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จในการหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน คือ กระบวนการตกผลึกของโปรตีน เมื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์แล้ว นำสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ไปตกผลึก เพื่อนำผลึกโปรตีนไปใช้ในการทดลองต่อไปในการหาโครงสร้างสามมิติของโปรตีนต่อไป อย่างไรก็ตาม บ่อยครั้งการตกผลึกโปรตีนเบื้องต้น (screening) ซึ่งเป็นการทดลองหาสภาวะที่ทำให้โปรตีนตกผลึกได้ โดยอาจใช้สารละลายช่วยตกผลึกชนิดต่างๆ ที่แตกต่างกัน หลายสภาวะ แต่มักจะพบอุปสรรค เช่น ขนาดผลึกที่กิดขึ้นมีขนาดเล็กมาก (microcrystals) โปรตีนเกาะเป็นกลุ่ม (precipitation) แผ่นผลึกโปรตีนเกาะเป็นกลุ่มใหญ่ (multi-crystals) หรือความเป็นระเบียบของโปรตีนภายในผลึกต่ำ (mosaicity) เป็นต้น ส่งผลต่อคุณภาพของผลึกโปรตีน และการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ผ่านผลึกโปรตีน ทำให้คุณภาพของข้อมูลการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ไม่ดีพอและยากต่อการประมวลผลต่อไป ดังนั้นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกโปรตีน (optimization) จึงเป็นกระบวนการที่สำคัญ และจำเป็นต่อการปรับปรุงคุณภาพของผลึกโปรตีนให้ดีขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อข้อมูลการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์โดยตรง

ในขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึกโปรตีนนี้ จะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่มีความสำคัญต่อการตกผลึกของโปรตีน เช่น ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ pH ionic strength ความเข้มข้นของสารเคมีความเข้มข้นของโปรตีน และปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณของตัวอย่าง ระเบียบวิธีการทดลองเป็นต้น โดยมีจุดประสงค์หลัก คือ ปรับปรุงคุณภาพของการเกิดผลึก (nucleation) และ/หรือ พัฒนาคุณภาพผลึกให้ดีขึ้น อย่างไรก็ดี การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกโปรตีนนั้น ยังไม่มีหลักการที่แน่นอน นอกจากความรู้พื้นฐานเชิงเคมีและกายภาพของโปรตีนนั้นๆ ดังคำกล่าวของ Bob Cudney ที่ว่า “There is only one rule in the crystallization. And that rule is, there are no rules.”

นอกจากเทคนิค Optimization เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพในการตกผลึกของโปรตีน ยังมีอีกเทคนิคหนึ่ง คือ Seeding ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการเพิ่มคุณภาพของผลึกโปรตีนจากนิวคลีไอของโปรตีน โดยหลักการของการตกผลึกโปรตีนทั่วไป เริ่มต้นจากการแพร่ของสารตัวทำละลายในระบบปิดของโปรตีนกับ crystallization screen จากสภาวะ undersaturated solution ไปสู่ supersaturated solution ก่อให้เกิดนิวคลีไอของโปรตีน (nucleation) ภายใต้สภาวะ Labile ดังรูปที่ 1 ซึ่งสภาวะนั้นยังสามารถทำให้เกิดผลึกโปรตีนพร้อมกัน อย่างไรก็ตามบางครั้งในสภาวะความเข้มข้นของสารละลายสูงเกินไป ทำให้ปริมาณของนิวคลีไอสูงและผลึกโปรตีนเล็กเกินไป ดังนั้นการที่ลด

ความเข้มข้นของสารละลายและโปรตีนเพื่อให้สภาวะตกใน Metastable ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่ก่อเกิดนิวคลีไอแต่สามารถทำให้ผลึกโปรตีนเติบโตได้ แนวคิดเช่นนี้จึงนำไปสู่การทำ seeding ของผลึกโปรตีน



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและสารละลายที่มีผลต่อการเกิดผลึกของโปรตีน

Undersaturation (Stable) – สารละลายมีลักษณะใส ไม่มีการเกิดนิวคลีไอและผลึกของโปรตีน

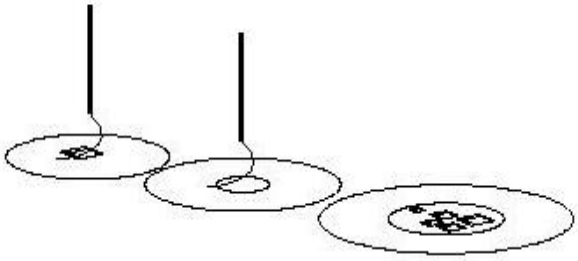
Metastable zone – สภาวะที่โปรตีนไม่สามารถเกิดนิวคลีไอแต่ผลึกของโปรตีนสามารถเกิดขึ้นบริเวณนี้

Labile zone – สภาวะที่โปรตีนสามารถเกิดได้ทั้งนิวคลีไอและผลึก

Precipitation zone – สภาวะตกตะกอนของโปรตีน โดยไม่มีการเกิดทั้งนิวคลีไอและผลึก

การทำ seeding นั้นสามารถทำได้หลายวิธี และวิธีที่นิยมใช้คือ streak seeding ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายที่สุด โดยใช้ขนสัตว์เช่น ขนแมวหรือขนกระต่ายที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ แล้วจุ่มในหลุมที่คาดว่ามีนิวคลีไอของ

โปรตีนหรือกลุ่มผลึกโปรตีนขนาดเล็ก แล้วนำไปป้ายบนสารละลายที่มีความเข้มข้นสารละลายต่ำในหลุมใหม่ดังรูปที่ 2 แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถทราบปริมาณนิวคลีไอของโปรตีนบนขนได้



รูปที่ 2 วิธีการทำ streak seeding

อีกวิธีหนึ่งคือ seed stock ซึ่งทำได้โดย หาหลุมที่มีกลุ่มผลึกโปรตีนขนาดเล็ก แล้วบดด้วยแท่งหัวกลม (crystal crusher) จนแตกละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปทำเจือจางเป็นซีรีย์ระหว่าง 10^{-2} จนถึง 10^{-7} เท่า แล้วนำสารละลายผสมนิวคลีไอจากชุดเหล่านี้ไปทำการตกผลึกต่อไป ซึ่งวิธีนี้จะอธิบายในขั้นตอนการดำเนินงานข้างล่างนี้

2. วัตถุประสงค์

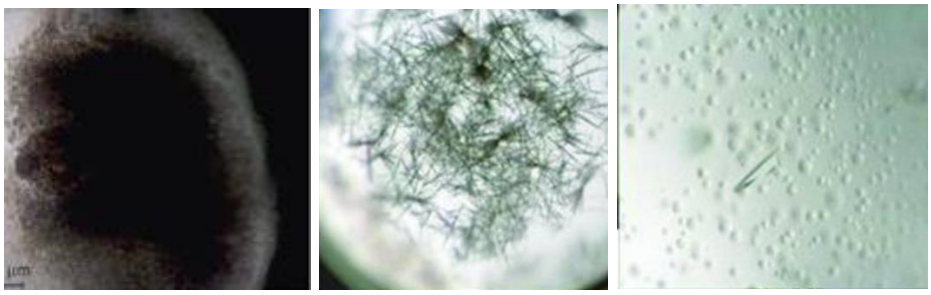
1. สร้างความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการตกผลึกด้วยเทคนิค Optimization และ Seeding
2. ปรับปรุงประสิทธิภาพในการตกผลึกโปรตีนด้วยเทคนิค Optimization และ Seeding
3. การใช้โปรแกรมในการตกผลึกด้วย Optimization และ Seeding จากเครื่องตกผลึกอัตโนมัติ

3. วิธีการดำเนินงาน

3.1 Optimization strategy

3.1.1 Assessment on protein crystals

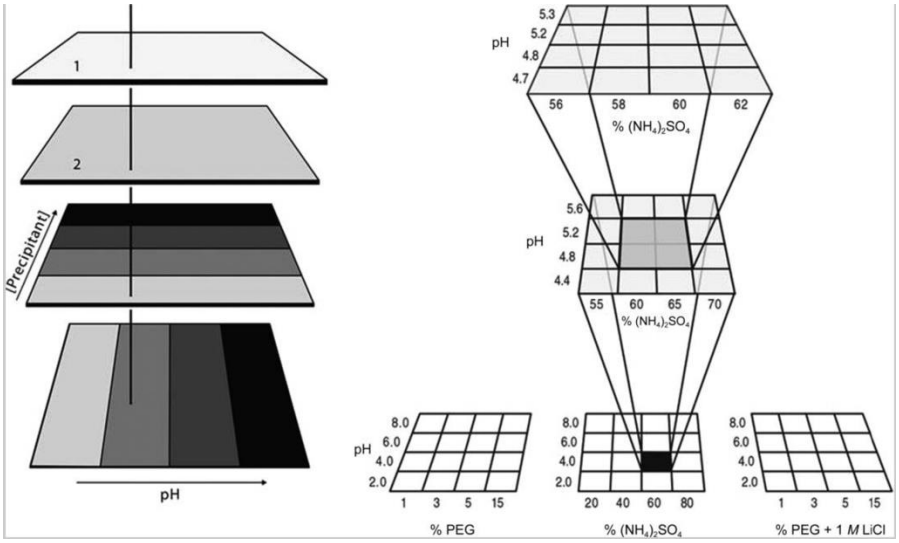
หลังขั้นตอน screening ถ้าพบสภาวะที่เกิดผลึกโปรตีน (hit condition) หรือสภาวะที่มีโอกาสส่งผลต่อการเกิดผลึกโปรตีน เช่น กลุ่มก้อนของสารละลายโปรตีน กลุ่มผลึกขนาดเล็กมาก หรือกลุ่มก้อนของเหลว ดังรูปตัวอย่างที่ 1



รูปที่ 1 ตัวอย่างภาพกลุ่มก้อนของตะกอนโปรตีน, กลุ่มผลึกขนาดเล็กมาก และ กลุ่มก้อนของเหลวแยกชั้น (เรียงตามลำดับ)

เมื่อพบสภาวะที่มีความเป็นไปได้สูงต่อการพัฒนาผลึกโปรตีนที่ดีขึ้น แบ่งเป็น 2 กรณี คือ

กรณีที่ 1 ถ้าตรวจสอบ แล้วพบสภาวะที่เกิดผลึกเพียงสภาวะเดียว จะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยอาศัยปัจจัยหลักคือ pH และความเข้มข้นของสาร precipitant เช่น เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายช่วยตกผลึก precipitant และ pH ของสารละลาย ตามแนวแกน X หรือ Y จากสารละลายมาตรฐาน (stock solution) ที่มีความเข้มข้นสูง ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การแบ่งเรียงลำดับความเข้มข้นของสารละลายช่วยตกผลึก precipitant และ pH ตามแนวแกน X และ Y

กรณีที่ 2 ถ้าพบความเป็นไปได้ในหลายสภาวะจากหลายหลุม เริ่มต้นด้วยการตรวจสอบและเปรียบเทียบสารเคมีต่างๆที่มีอยู่ในสภาวะเหล่านั้น ปัจจัยที่นำพิจารณาเปรียบเทียบ เช่น pH, ชนิดของบัฟเฟอร์, precipitants polymers, salts และ additives เป็นต้น เพื่อหาความคล้ายกัน ตัวอย่างเช่น หลายหลุมมีสภาวะคล้ายกันคือ pH 5.0, 5.5 และ 6.0 และ Polyethylene glycol (PEG) 25% w/v 3350, 20% w/v 4000 และ 15% w/v 6000 ดังนั้นออกแบบการทดลองโดยเรียงลำดับ pH ระหว่าง 4.5 และ 6.5 ต่อ 15-25% w/v PEG4000 ตามแนวแกน X และ Y โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นสูงอย่าง 50%w/v PEG4000 และสารละลายบัฟเฟอร์ 1M สำหรับควบคุม pH

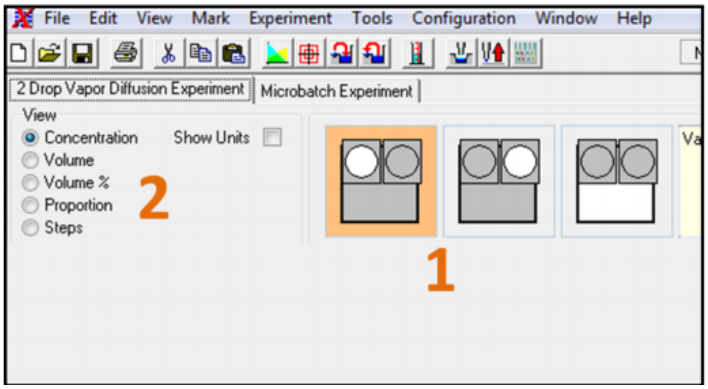
ในขณะเดียวกัน มีอีกหลายปัจจัยที่นำพิจารณาด้วย เช่น ความเข้มข้นของโปรตีน โดยทั่วไปความเข้มข้นที่นิยมใช้ในการตกผลึกอยู่ระหว่าง 5-20 mg/ml อย่างไรก็ตามในขั้นตอน screening อาจตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมจากสารละลายผสมในแต่ละหลุมว่า มีความใสหรือขุ่นมากน้อยแค่ไหน ถ้าสารละลายใสเกิน 70% ในแต่ละเพลทมีความเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นโปรตีนต่ำเกินไป ถ้าสารละลายขุ่นแสดงว่าความเข้มข้นสูงเกินไป นอกจากนี้ยังมีปัจจัยด้านอุณหภูมิเกี่ยวข้อง คือ อุณหภูมิทั่วไปที่นิยมใช้ในการตกผลึกอยู่ระหว่าง 4 – 25 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อ stability, hydrophobility, diffusion และ kinetics ของโปรตีน บางครั้งถ้าไม่เกิดผลึก ณ อุณหภูมิสูงกว่า 20 °C อาจย้ายมาบ่มที่ต่ำกว่า 10 °C อย่างไรก็ตามโปรตีนบางตัวเป็นชนิด thermophilic อาจเกิดผลึกได้ภายใต้อุณหภูมิสูงกว่า 25 °C เป็นต้น

3.1.2 การใช้ระบบอัตโนมัติช่วยตกผลึกโปรตีน สำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสม

3.1.2.1 เตรียมสารละลายสต็อกความเข้มข้นสูงของ precipitant, salt, additives รวมทั้ง buffer ที่ระบุค่า pH เพื่อควบคุม pH ในแต่ละหลุม

3.1.2.2 เปิดโปรแกรม XStep

3.1.2.3 เลือก File>New Project แล้วเลือกหลุมที่ต้องการให้โปรแกรมคำนวณสารละลาย

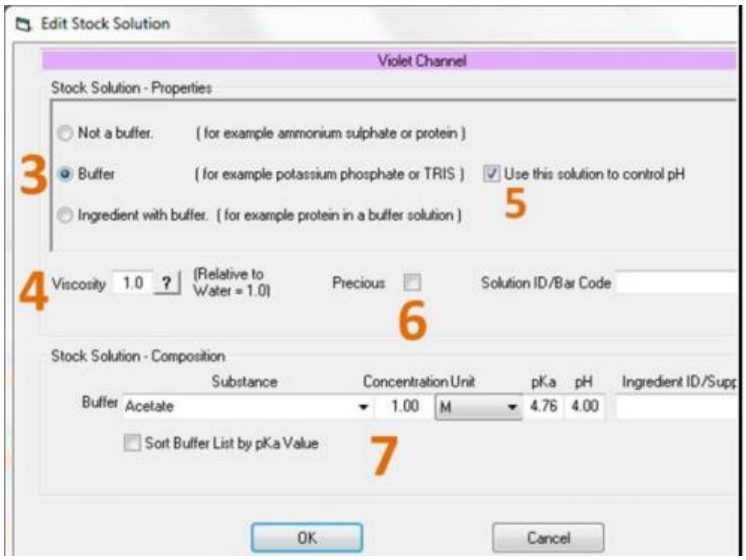


รูปที่ 3 การเลือกหลุม (1) ที่ต้องการคำนวณปริมาณหรือความเข้มข้นของสารละลาย (2)

3.1.2.4 ระบุชนิดของการตกผลึกระหว่าง Microbatch under oil, Vapour diffusion และ Stock Plate preparation (การเตรียมเพลทสต๊อก) จาก Experiment > Experiment type

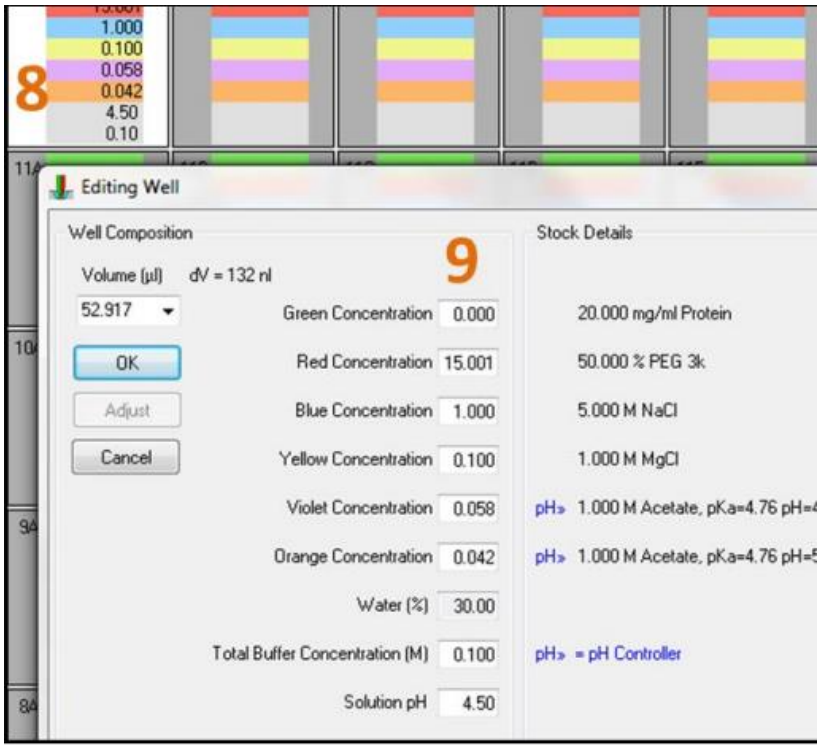
3.1.2.5 เลือกชนิดของเพลท Experiment > Plate เช่น SwissCl_2drop, MRC Maxi เป็นต้น

3.1.2.6 ระบุชนิดของสารเคมีที่ใช้ในการตกผลึก Experiment > Stock solutions เช่น Buffer, Additives, Salts และโปรตีน พร้อมระบุชนิดของสาร, ความหนืด, pH, ชื่อของสารนั้นๆ



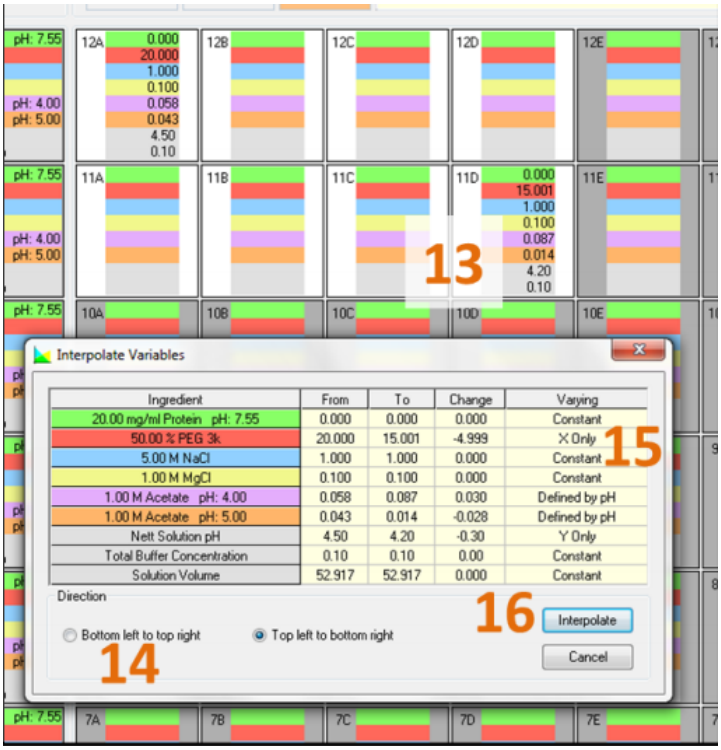
รูปที่ 4 การระบุชนิดของสารเคมี (3) ความหนืด (4) และชื่อและความเข้มข้นของสต็อกสารเคมี (7)

3.1.2.7 ออกแบบการทดลองบนเพลทแบบเรียงตามลำดับความเข้มข้น โดย double click บน well หลุมแรกและสุดท้าย เพื่อระบุค่าความเข้มข้นหรือ pH สูงสุดและต่ำสุด แล้วลากเม้าส์ข้ามผ่านหลายช่องระหว่างค่าต่ำสุดถึงค่าสูงสุดเพื่อครอบคลุม wells ที่ต้องการให้คำนวณ



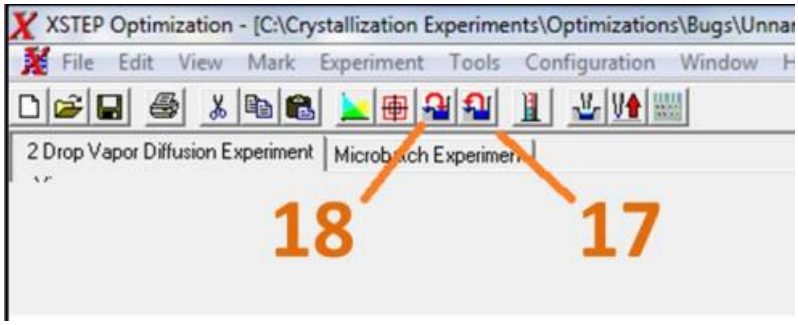
รูปที่ 5 การเลือกหลุมสำหรับระบุค่าความเข้มข้นหรือปริมาณของสาร (8 และ 9)

3.1.2.8 เลือก Interpolate (Tools>Interpolate) แล้วเลือกสารตัวใดที่ต้องการปรับเรียงลำดับตามแกนไหน จากนั้นกด Interpolate



รูปที่ 6 การ Interpolate เพื่อเรียงลำดับความเข้มข้นหรือ pH ของสารละลายตามแกน X หรือ Y

3.1.2.9 ถ้ามีการใช้เพลทที่มีทั้ง wells สำหรับผลึกโปรตีนและสารละลายช่วยตกผลึก (reservoir) ในเพลทเดียวกัน ก็สามารถให้โปรแกรมคำนวณอัตโนมัติสำหรับสารละลายสุดท้ายบนหลุมที่ใช้ในตกผลึกโปรตีน โดยคลิก Generate drop solution from reservoirs



รูปที่ 7 การคำนวณอัตโนมัติสำหรับปริมาณหรือความเข้มข้นของสารละลายระหว่างหลุมโปรตีนกับหลุม Reservoirs

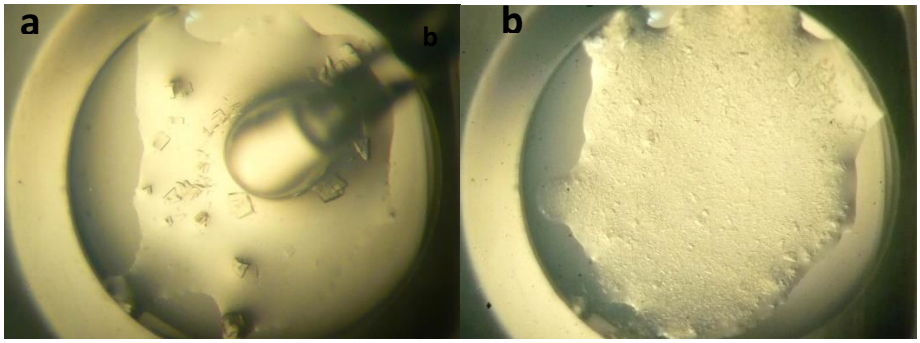
3.1.2.10 เมื่อตรวจสอบทุกปัจจัยแล้ว สามารถ dispense เพื่อให้เครื่องมือดำเนินการผสมสารละลายต่อไป

3.2 Seeding strategy

3.2.1 การเตรียม microseed stock

3.2.1.1 วางหลอด Eppendorf ที่มีลูกบีด (seed bead) บนถังน้ำแข็ง

3.2.1.2 เลือกหลุมที่มีผลึกขนาดเล็กหลายชิ้นดังรูปที่ 4a แล้วบดด้วยแท่นหัวกลมจนแตกละเอียดอย่างรูปที่ 4b



รูปที่ 4 การเลือกหลุมที่มีผลึกโปรตีนขนาดเล็กและการบดด้วยแท่งบด (a) และลักษณะของผลึกโปรตีนที่ถูกบดอย่างละเอียด (b)

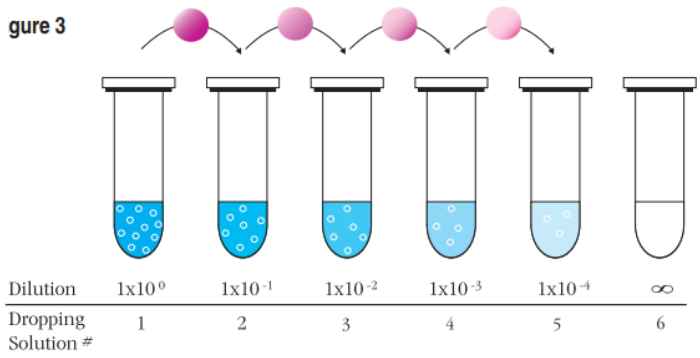
3.2.1.3 เติมสารละลายช่วยตกผลึก (reservoir solution) 6 µl ลงในหลุมที่มีผลึกถูกบด แล้วปิเปตขึ้น ๆ ลง ๆ หลายครั้งแล้ว ปิเปตลงในหลอด Eppendorf ที่มีลูกบีด

3.2.1.4 ทำซ้ำ 8 ครั้งจนมีปริมาณขั้นสุดท้ายเท่ากับ 48 µl ในหลอด

3.2.1.5 เขย่าบน vortex เป็นระยะเวลา 2 นาที โดยแช่ลงในถังน้ำแข็งเพื่อทำให้เย็นทุกๆ 30 วินาที

3.2.1.6 ได้ seed stock ที่นำไปทำการตกผลึกต่อไปได้

3.2.1.7 นำ seed stock ไปทำการเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-6} เท่า ก่อนนำไปทำการตกผลึกต่อไป



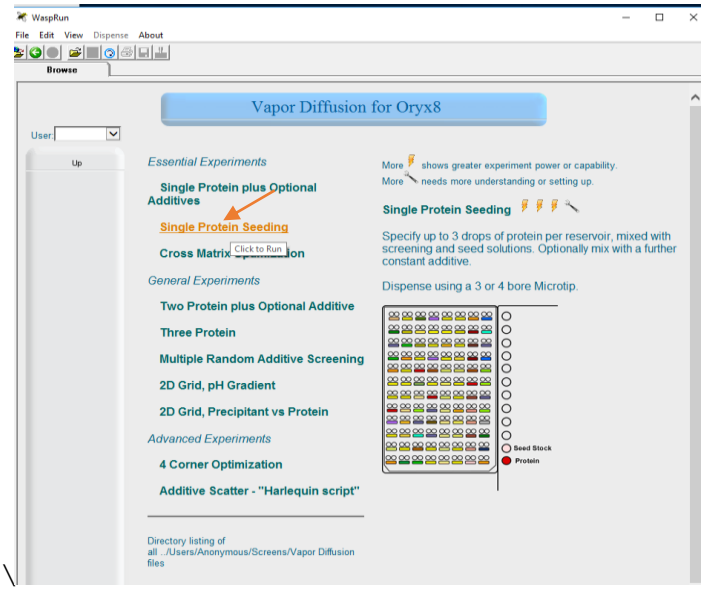
รูปที่ 5 ซีรีย์การเจือจางของ seed stock ระหว่าง 10^0 ถึง 10^{-4} เท่า (ที่มา: Bergfors (2003))

3.2.1.8 หากยังคงเหลือ seed stock ที่ยังไม่ได้เจือจาง นำไปแช่แข็ง ณ อุณหภูมิ -80 หรือ -20 °C ทันที

3.2.2 การใช้ระบบอัตโนมัติช่วยตกผลึกโปรตีนสำหรับ seeding

3.2.2.1 เปิดโปรแกรม WaspRun

3.2.2.2 เลือกหัวข้อ Single Protein Seeding

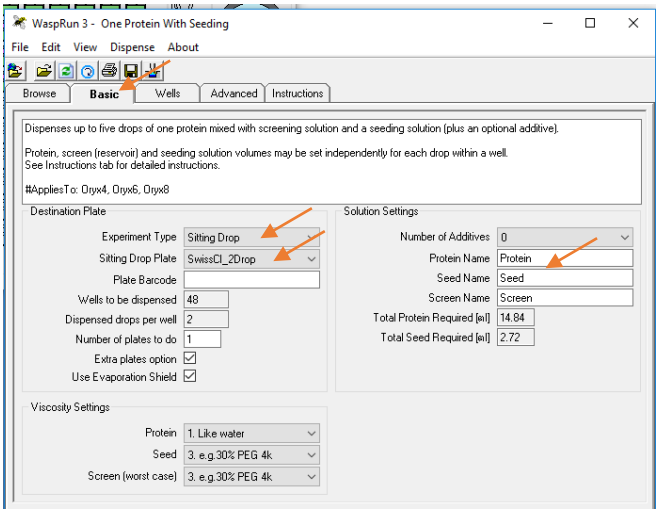


รูปที่ 6 เลือกหัวข้อ ‘Single Protein Seeding’

3.2.2.3 ไปยัง ‘Basic Tab’

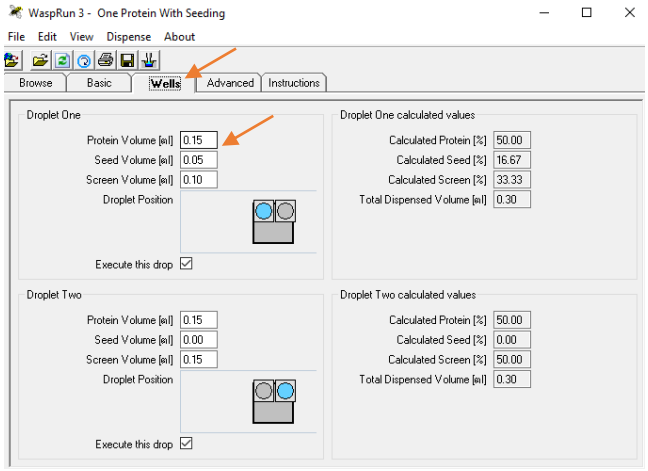
3.2.2.4 แล้วเลือกชนิดของการทดลองระหว่าง Sitting Drop หรือ Hanging Drop แล้วเลือกชนิดของเพลทที่จะทำการตกผลึก โดยในห้องปฏิบัติการตกผลึกแห่งนี้ (Xtallab) นิยมใช้เพลทชนิด SwissCl_2Drop

3.2.2.5 กรอกชื่อโปรตีนและ seed stock (ระบุจำนวนเท่าของการเจือจาง)



รูปที่ 7 การเลือกช่องข้อมูลในแต่ละช่องบนหน้า ‘Basic Tab’

3.2.2.6 ไปยัง ‘Wells Tab’ เพื่อระบุปริมาณของโปรตีน, seed และสารละลายช่วยตกผลึก (Screen) ตามอัตราส่วนที่ต้องการเช่น 1:1:1, 0.5:0.5:1 หรือ 2:1:1 เป็นต้น โดยมีหน่วยไมครอน (µl) เพื่อคำนวณปริมาณโปรตีนและ seed ทั้งหมดที่ต้องใช้ต่อ 1 เพลท

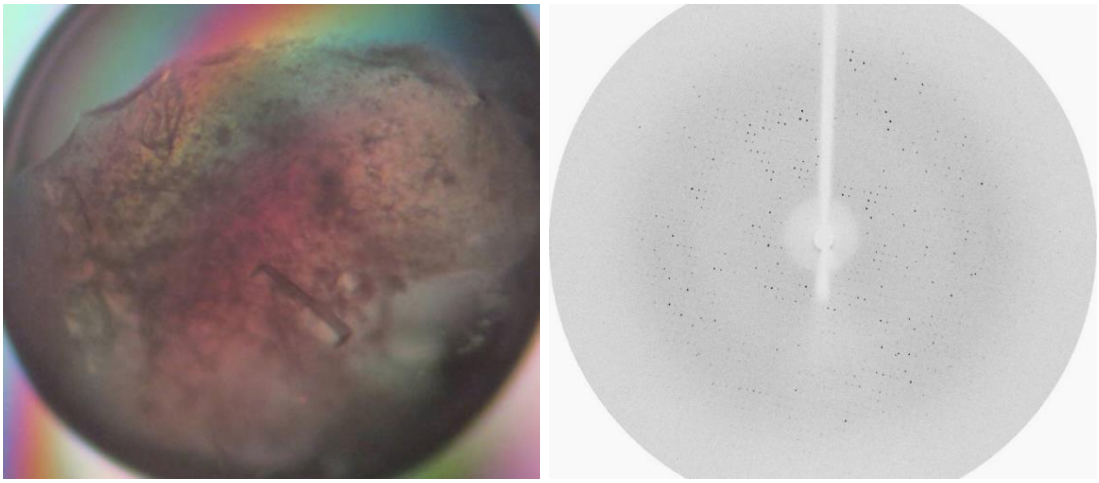


รูปที่ 8 การกรอกปริมาณของโปรตีน, seed และสารละลาย screen บนหน้า ‘Wells Tab’

3.2.2.7 หลังจากตรวจสอบทั้งหมดแล้วกด Dispense เพื่อให้เครื่องทำงานต่อไป ซึ่งทางโปรแกรมจะมีหน้าต่างขึ้นให้ชี้นำแต่ละขั้นตอน

4. ผลลัพธ์ และอภิปรายผล

4.1 ผลของการตกผลึกโปรตีนจากวิธี Optimization



รูปที่ 9 ผลึกโปรตีนของ *Ls*TIM ผสมกับสารอนุพันธ์ NSC639174 หลังจากปรับปรุงประสิทธิภาพในการตกผลึกด้วยเทคนิค Optimization และผลการยิงผลึกโปรตีนจากระบบลำเลียงแสงที่ 7.2W: MX

4.2 ผลของการตกผลึกโปรตีนจากวิธี Seeding

รูปที่ 10 ผลึกโปรตีนของ Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) ที่ปรับปรุงประสิทธิภาพการตกผลึกด้วยเทคนิค Seeding ซึ่งเห็นว่ามีการตกผลึกชนิดหกเหลี่ยมขนาดใหญ่ขึ้นแยกจากผลึกรูปทรงอื่น ๆ

6. สรุปผล

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกโปรตีน เป็นเทคนิคหนึ่งที่ช่วยการตกผลึกโปรตีนให้ดีขึ้น โดยอาศัยหลักการปรับสภาวะสารละลายในการตกผลึกให้เหมาะสม โดยเริ่มจากสภาวะที่สามารถตกผลึกโปรตีนได้แบบสุ่ม โดยมีผลึกเกิดขึ้น แต่ลักษณะของผลึกโปรตีนยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปทำการเก็บข้อมูลการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ จึงควรนำเทคนิคนี้มาใช้ในการเพิ่มคุณภาพของผลึกโปรตีน โดยอาศัยระบบอัตโนมัติช่วยตกผลึกโปรตีนช่วยอำนวยความสะดวกในการคำนวณสารละลาย และผสมสารละลายที่เหมาะสมต่อการตกผลึกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนเทคนิค seeding เป็นเทคนิคที่ช่วยให้โปรตีนตกผลึกดีขึ้นโดยอาศัยนิวคลีไอจากโปรตีนเดิมมาทำการตกผลึกภายใต้สภาวะสารละลายใหม่ (new screens) หรือ สภาวะสารละลายตัวเดิมแต่ลดความเข้มข้นลงเพื่อให้การเกิดผลึกโปรตีนเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และส่งผลดีต่อการเก็บข้อมูลของผลึกโปรตีนจากเทคนิค X-ray diffraction ในสถานีทดลองที่ 7.2W:MX และขั้นตอนการทำ Microseed stock มีการร่วมมือกับบริษัท Douglas ที่ผลิตเครื่องตกผลึกโปรตีนอัตโนมัติ ทำคลิปวิดีโอเพื่อให้เข้าใจง่ายยิ่งขึ้น, https://youtu.be/tXGmX81sc0A พร้อมกับใบคู่มือการทำ seed stock, https://www.douglas. co.uk/f_ftp1/rMMS_Procedure.pdf

7. กลุ่มผู้ใช้ประโยชน์

เจ้าหน้าที่ และผู้ใช้บริการที่ต้องการปรับปรุงประสิทธิภาพในการตกผลึกโปรตีนให้ดีขึ้น และต้องการใช้เครื่องตกผลึกโปรตีนอัตโนมัติจากห้องปฏิบัติการตกผลึกโปรตีน

8. เอกสารอ้างอิง

- Luft, J.R. et al. (2007) Efficient optimization of crystallization conditions by manipulation of drop volume ratio and temperature. Protein Science. 16, 715-722.
- McPherson, A. and Cudney, B. (2014) Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. Acta Crystallographica. F70, 1445-1467.
- Optimization. Crystal Growth 101 by Hampton Research as access on August 2019. https://hamptonresearch.com/crystal-growth101.php
- Stura, E.A. and Wilson, I.A. (1991) Applications of the streak seeding technique in protein crystallization. Journal of Crystal Growth. 110, 270-282.
- Bergfors, T. (2003) Seeds to crystals. Journal of Structural Biology. 142, 66-76.
- Seeding in Crystal Growth 101 by Hampton Research, https://hamptonresearch.com/crystal-growth101.php as access on August 2019.