จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดิน

รายงานการวิจัย

เรื่อง

สารยับยั้งการสลายตัวของโปรตีนในระหว่างกรรมวิธีแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์

Effect of proteolytic inhibitor during the isolation processes of cytochrome bf complex

มณฑล สงวนเสริมศรี

581.133
42
ม122ส

ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒๕๓๓

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดิน

รายงานการวิจัย

เรื่อง

สารยับยั้งการสลายตัวของโปรตีนในระหว่างกรรมวิธีแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์

Effect of proteolytic inhibitor during the isolation processes of cytochrome bf complex

โดย

มณฑล สงวนเสริมศรี

ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒๕๓๓

รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง

สารยับยั้งการสลายตัวของไบรตีในระหว่างกรรมวิธีแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์

Effect of proteolytic inhibitor during the isolation proceses of cytochrome bf complex

มณฑล สงวนเสริมศรี

ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๒๕๓๓

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนงบประมาณแผ่นดินที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยด้วยดีตลอดมาด้วยการให้ใช้เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และอำนวยความสะดวกต่างๆ ทำให้การวิจัยลุล่วงดำเนินไปด้วยดี

รายงานผลการวิจัยเรื่อง : สารยับยั้งการสลายตัวของโปรตีนในระหว่างกรรมวิธีแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์

คณะผู้วิจัย : มณฑล สงวนเสริมศรี

ปีที่วิจัย : ๒๕๓๓

บทคัดย่อ

การวัดความสามารถในการขนส่งอิเล็กตรอนของคลอโรพลาสต์จากพืชชนิดต่างๆแสดงให้เห็นว่าผักกาดหอมให้อัตราการขนส่งอิเล็กตรอนได้ดีกว่าพืชชนิดอื่นๆที่นำมาทดลอง และเพื่อที่จะได้ทราบถึงการขนส่งอิเล็กตรอนระหว่างระบบแสงที่ ๑ และระบบแสงที่ ๒ จึงได้ทำการแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์

ในการแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์พบว่าออคทีลกลูโคไซด์ในความเข้มข้น ๑๐ มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการแยกคอมเพลกส์ดังกล่าวออกจากเยื่อไทลาคอยด์ อย่างไรก็ตามการใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนอทิเช่น PMSF และ EDTA ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนการดูดแสงระหว่างไซโตโครมบี 563 และคลอโรฟิลล์ ซึ่งผลดังกล่าวเป็นการแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ที่ก่อให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนจึงไม่มีความเจาะเป็นต่อกระบวนการแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์ออกจากเยื่อไทลาคอยด์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Research Title : Effect of proteolytic inhibitor during the isolation processes of cytochrome bf complex

Researcher : Mondon Sanguansermsri

Year : 1990

Abstract

Measurement of electron-transport activities of various plant chloroplasts shows that Lactuca indica chloroplast gives the fastest rate of electron-transport activities. In order to elucidate electron-transfer between photosystem 1 and photosystem 2, cytochrome bf complex of thylakoid membrane has been isolated.

It was found that 10 mM Octylglucoside was the appropriate concentration for the isolation of bf complex. However, proteolytic inhibitors such as PMSF and EDTA show no effect on the absorbance ratio of cytochrome b_{563} to chlorophyll in various experiments. The results indicate that proteolytic inhibitors are not necessary for the preparation of cytochrome bf complex of thylakoid membrane.

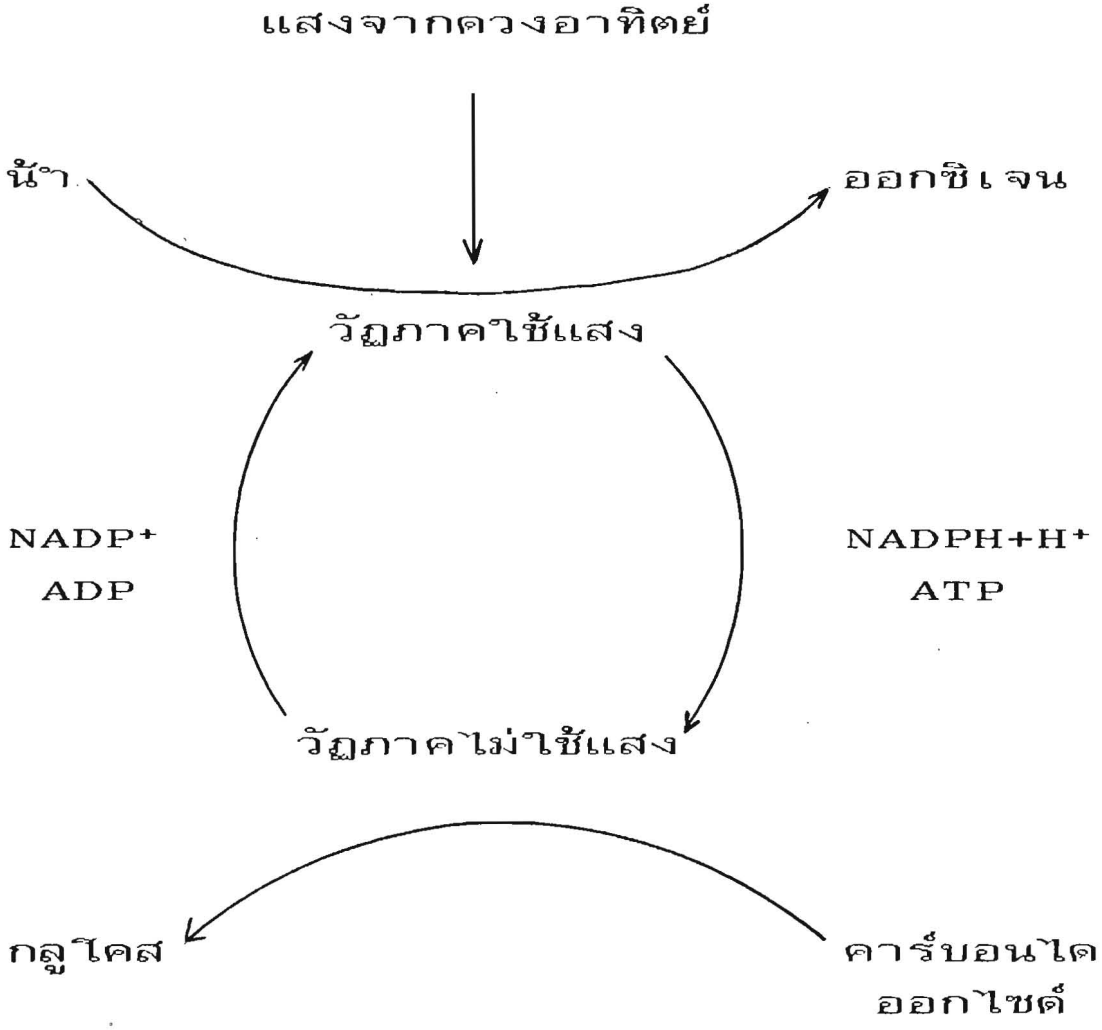
สารบัญเรื่อง

	หน้า
รายงานผลการวิจัย	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อภาษาไทย	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
สารบัญเรื่อง	6
บทที่ ๑ บทนำ	7
บทที่ ๒ วิธีดำเนินการทดลอง	16
บทที่ ๓ ผลการทดลอง	31
บทที่ ๔ สรุป และวิจารย์ผลการทดลอง	37
บรรณานุกรม	40

บทที่ ๑

บทนำ

การสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis)



รูปที่ 1 แสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสงซึ่งเกี่ยวข้องกับวัฏภาคที่ใช้แสง และวัฏภาคที่ไม่ใช้แสง

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง(Photosynthetic reaction)

ปฏิกิริยาเคมีในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ

1. ปฏิกิริยาที่ใช้แสง(light reaction) ปฏิกิริยานี้เป็นการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมีในการสร้าง ATP และ $NADPH^+H^+$ ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นที่ส่วนของไทลาคอยด์ในคลอโรพลาสต์

2. ปฏิกิริยาที่ไม่ใช้แสง (dark reaction) เป็นกระบวนการต่อเนื่องจากปฏิกิริยาที่ใช้แสงในการเปลี่ยน คาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตโดยใช้ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ใช้แสง คือ $NADPH + H^+$ และ ATP อาจเรียกกระบวนการนี้ว่าการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 fixations)หรือวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle)กระบวนการนี้เกิดขึ้นที่ส่วนสโตรมา (Stroma)ในคลอโรพลาสต์

เนื่องจากในส่วนที่ทำการศึกษา เกี่ยวข้องเฉพาะกับปฏิกิริยาที่ใช้แสงเท่านั้น ดังนั้นรายละเอียดของปฏิกิริยาที่ไม่ใช้แสง จะไม่กล่าวถึงในที่นี้

กระบวนการที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่ใช้แสง เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการใช้พลังงานแสงในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี หรือเรียกว่าเกิดปฏิกิริยาโฟโตเคมีคัล (Photochemical reaction)ซึ่งอาจอธิบายได้โดย แบ่งโมเลกุลที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเป็น 3 ส่วน คือ

1. ส่วนของตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor)แทนด้วย D

2. ส่วนของตัวรับพลังงานแสงซึ่งได้แก่ คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll)แทนด้วย Ch.

3. ส่วนของตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor)แทนด้วย

$$D\ Ch\ A \longrightarrow D\ Ch^{*}A \longrightarrow DCh^{+}A^{-} \longrightarrow D^{+} + ChA^{-} \quad (1)$$

จากสมการอธิบายได้ว่า เมื่อมีแสง คลอโรฟิลล์จะเป็นตัวรับพลังงานแสงในช่วงคลื่นที่เหมาะสมทำให้มีพลังงานเพิ่มขึ้น เป็นผลให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์อยู่ในสถานะกระตุ้น (excited state)และถ้าได้รับพลังงานมากพอ อิเล็กตรอนจะหลุดออกไปจากโมเลกุลเดิม โดยจะมี A เป็นตัวมารับอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาทำให้ A อยู่ในรูปรีดิวซ์ (reduced form)และคลอโรฟิลล์ซึ่งสูญเสียอิเล็กตรอจะมีประจุบวก จากนั้น D จะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่คลอโรฟิลล์ ทำให้คลอโรฟิลล์กลับที่สภาวะเป็นกลางเช่นเดิม ในกรณีที่อิเล็กตรอนถูกกระตุ้น และอิเล็กตรอนไม่ได้หลุดออกไปจากโมเลกุลเดิมเนื่องจากได้รับพลังงานไม่มากพอนั้น อิเล็กตรอนอาจกลับสู่งตำแหน่งเดิมในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ได้อีก โดยการปล่อยพลังงานรังสี (radiation energy)ซึ่งอาจเกิดปรากฏการณ์การวาวแสง (Fluorescence) ในกรณีที่ตำแหน่งเดิมของอิเล็กตรอนอยู่ใน Singlet State หรือการเรืองแสง(phosphorescence)ในกรณีตำแหน่งเดิมของอิเล็กตรอนอยู่ใน triplet state

ในสภาพที่เกิดขึ้นจริงนั้น D หรือสารเคมีที่ให้อิเล็กตรอนแก่คลอโรฟิลล์ ก็คือน้ำ ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาไฟโตลิซิส (Photolysis)ให้อิเล็กตรอนแก่โปรตีน และเกิดออกซิเจน ดังสมการต่อไปนี้

$$\begin{aligned} 2H_2O &\longrightarrow 2H^{+} + 2OH^{-} \\ 2OH^{-} &\longrightarrow 2(OH) + 2e^{-} \\ 2(OH) &\longrightarrow H_2 + 1/2\ O_2 \\ \text{รวม}\quad H_2O &\longrightarrow 2H^{+} + 2e^{-} + 1/2\ O_2 \end{aligned} \quad (2)$$

สำหรับสารประกอบ A ซึ่งเป็นสารที่รับอิเล็กตรอนจากคลอโรฟิลล์มานั้น จะมีสารอื่นมารับอิเล็กตรอนต่อไปอีก และเกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนต่อไปเป็นทอดๆ ในขณะที่มีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนนี้จะทำให้เกิดการปั๊ม (pump)โปรตอน (H^{+})จากภายนอกเข้าสู่ไทลาคอยด์ เป็นผลให้เกิดเกรเดียนต์ของโปรตอน (proton gradient)ที่เยื่อของไทลาคอยด์ และเกรเดียนต์ของโปรตอนก่อให้เกิดพลังงานศักย์ พลังงานศักย์ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกนำไปใช้ในการสร้าง ATP จาก ADP ในกระบวนการโฟโตฟอสฟอริเลชัน (Photophosphorylation)ดังนั้น จะเห็นว่ากระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport)และกระบวนการสร้าง ATP จะเกิดควบคู่กันไปเสมอ แต่ถ้ามีสารที่ทำให้ความต่าง

ศักย์ของโปรตีนหมดไป โดยการทำให้โปรตอนสามารถเคลื่อนผ่านเยื่อของไทลาคอยด์ ก็จะมีผลยับยั้งไม่ให้มีการสร้าง ATP เกิดขึ้น สารพวกนี้เรียกว่าตัวแยกการควบคู่ (uncoupler) ตัวอย่างของสารพวกนี้ได้แก่ NH_4^+, $CH_3NH_3^+$ เป็นต้น (1,2)

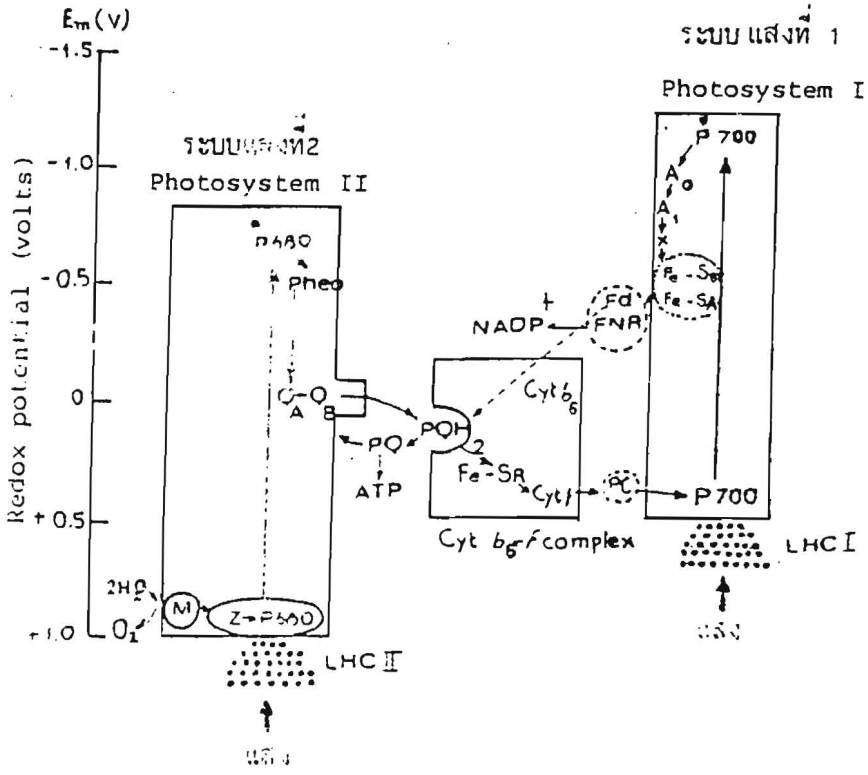
<u>หน่วยการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthetic unit)และศูนย์การเกิดปฏิกิริยาสังเคราะห์ด้วยแสง (Reaction center)</u>

รงควัตถุในคลอโรพลาสต์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ด้วยแสงจะรวมกันเป็นหน่วยย่อยเรียกว่า หน่วยการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthetic unit)ซึ่งจะมีคอลโรฟิลล์เป็นศูนย์กลางรวมรับพลังงานจากรงควัตถุอื่น ก่อให้เกิดปฏิกิริยาไฟโตเคมี (photochemical reaction)โดยเรียกว่าศูนย์การเกิดปฏิกิริยา (reaction center)จากการทดลองของ Emerson และคณะทำให้ทราบว่า หน่วยการสังเคราะห์ด้วยแสงแต่ละหน่วยจะมีศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยา 2 แห่ง หรืออาจกล่าวว่าประกอบด้วยระบบแสง (Photosystem) 2 ระบบ คือ

1. ระบบแสงที่ 1 (Photosystem I หรือ PS I)ซึ่งมีคลอโรฟิลล์-เอ เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ศูนย์กลางการเกิดปฏิกิริยาของระบบแสงนี้ คือ P 700 ซึ่งเป็นคลอโรฟิลล์-เอ ที่มีคุณสมบัติดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 700 นม.(นาโนมิเตอร์)

2. ระบบแสงที่ 2 (Photosystem II หรือ PS II)ซึ่งมีรงควัตถุส่วนใหญ่เป็นคลอโรฟิลล์-เอ ศูนย์การเกิปฏิกิริยาของระบบแสงที่ 2 คือ P 680 ซึ่งมีสมบัติดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 680 นม.

การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในระบบแสงที่ 1 ระบบแสงที่ 2



รูปที่ 2a แผนภาพแสดงการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในระบบแสงที่ 1 และระบบแสงที่ 2

เมื่อพืชได้รับแสงจะเกิดปฏิกิริยาขึ้นพร้อมๆ กันทั้งในระบบแสงที่ 1 และระบบแสงที่ 2

ในระบบแสงที่ 1 สารรับอิเล็กตรอนตัวแรก จะมารับอิเล็กตรอนของ P 700 ที่ถูกกระตุ้นให้มีพลังงานสูงเมื่อได้รับแสง และถ่ายทอดต่อให้สารรับอิเล็กตรอนตัวอื่นๆ เป็นทอดๆ จนถึง $NADP^+$ ทำให้ P 700 ขาดอิเล็กตรอนไป อิเล็กตรอนที่ขาดไปนี้จะถูกแทนที่โดยอิเล็กตรอนที่มาจากการแยกน้ำในระบบแสงที่ 2 กระบวนการแยกน้ำที่เกิดขึ้น จะให้อิเล็กตรอน โปรตอน และออกซิเจน ดังแสดงไว้แล้วในสมการ (3) $2H^+$ ที่ได้จะไปรวมกับ $NADP^+$ ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ในระบบแสงที่ 1 เกิดเป็น $NADPH + H^+$ ดังสมการ

$$NADP^+ + 2H^+ + e^- \longrightarrow NADPH + H^+ \quad (3)$$

การปลดปล่อยออกซิเจน (O_2 evolution) จากน้ำนั้น จะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยระบบเอนไซม์ที่เรียกว่า manganese enzyme complex

จากแผนภาพ(รูปที่ 2)จะเห็นว่า การถ่ายทอดอิเล็กตรอน เป็นไปตามค่า redoxpotential ของสาร กล่าวคือ สารที่มีค่า redox potential สูงจะรับอิเล็กตรอนจากสารที่มีค่า redox potential ต่ำกว่า สำหรับกรณีของ P 700 และ P 680 ที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่สารที่มีค่า redox potential ต่ำกว่าได้นั้น เนื่องจากนั้น เนื่องจากเมื่อ P 700 และ P 680 ถูกกระตุ้นโดยแสง ค่า redox potential ของสารทั้งสองจะลดลงมาก จนมีค่าต่ำกว่า redox potential ของสารรับอิเล็กตรอนตัวแรกในระบบแสงที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ทำให้เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนได้ (3,4)

ในกระบวนการสร้าง ATP โดยอาศัยแสง (Photosynthetic phoshporylation)ใน Choroplast เกิดขึ้น 2 ระบบ คือการขนส่งอิเล็กตรอนแบบไม่เป็นวัฏจักร (non cyclic electron-transport) และ การขนส่งอิเล็กตรอนแบบเป็นวัฏจักร (cyclic electron-transport)

1. <u>การขนส่งอิเล็กตรอนแบบไม่เป็นวัฏจักร (Non-cyclic electron transport)</u> เป็นระบบการขนส่งอิเล็กตรอนแบบเปิดโดยใช้อิเล็กตรอนจาก H_2O และสร้าง $NADPH_2$ จาก $NADP^+$

ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนแบบไม่เป็นวัฏจักร(Non-cyclic electron transport)นั้น อิเล็กตรอนได้มาจากน้ำ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว และจะถูกส่งต่อไปเรื่อยๆโดยสารตัวนำ เช่น chl a, chl b, pheophytin, quinone, cytochrome b และ f, FeS centers, plastocyanin, reductase enzyme และ ferridoxin ไปยัง$NADP^+$ เพื่อจะสร้าง ATP ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังสมการ

$$NADP^+ + H_2O + 2ADP + 2Pi \xrightarrow[\text{คลอโรพลาสต์}]{\text{แสง}} NADPH_2 + 1/2O_2 \quad (4)$$
$$+ATP$$

จากสมการ

เมื่อมีแสงมากระตุ้น ไมเลกุลของน้ำ 1 ไมเลกุลจะให้

- 1 อะตอมของออกซิเจน
- 2 อิเล็กตรอน และ $2H^+$ โดยจะไปรวมกับ $NADP^+$ ได้เป็น $NADPH_2$
- ได้ ATP 2 ไมเลกุล (เกิดจาก 2ADP + 2Pi)ซึ่งจะเป็นแหล่งของพลังงาน

$NADPH_2$ และ ATP จะเป็นแหล่งสะสมพลังงาน (assimilatory power) เพื่อไปรีดิวส์ CO_2 ได้เป็น คาร์โบฮัยเดรต ในช่วง วัฏภาคไม่ใช้แสง(dark phase) (ซึ่ง aassimilatory power นี้ เป็นผลิตผลอันแรกของการเปลี่ยนพลังงานแสงให้เป็นพลังงานเคมี)

องค์ประกอบของวิถีการขนส่งอิเล็กตรอนในการขนส่งอิเล็กตรอนแบบไม่เป็นวัฏจักร (non-cyclic electron transport)ประกอบด้วย 3 complex ซึ่งอยู่บนเยื่อของคลอโรพลาสต์เป็นระยะๆ complex เหล่านี้ได้แก่ (รูปที่ 1)

- PS II complex
- Cyt b/f complex และ
- PS I complex

ซึ่ง complex เหล่านี้สามารถแยกจากเยื่อได้โดยวิธีใช้สารซักฟอก(detergent) ส่วน(Plastoquinone, Plastocyanine และ ferridoxin เป็นตัวนำอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ได้(Mobile carriers) ไปยังแต่ละ complex ก่อให้เกิดการขนส่งอิเล็กตรอน ระหว่าง complex (4,5) (รูปที่ 1 และ 2a)

สรุป การขนส่งอิเล็กตรอนแบบไม่เป็นวัฏจักรอิเล็กตรอนจะถูกแยกออกมาจากน้ำ โดยเกิดใน PS II แสงจะถูกขนส่งผ่านไปยังศูนย์กลางของปฏิกิริยาลูกใช่ แล้วอิเล็กตรอนจะถูกส่งไปยัง PS I และสุดท้ายจะส่งไปยัง $NADP^+$

2. การขนส่งอิเล็กตรอนแบบเป็นวัฏจักร (Cyclic electron transport) นกระบวนการนี้ต้องการแสงและคลอโรพลาสต์ ส่วนผลลัพธ์มีเพียง ATP เท่านั้น อาจอธิบายได้ง่ายๆ โดย

$$ADP + Pi \xrightarrow[\text{คลอโรพลาสต์}]{\text{แสง}} ATP \quad (5)$$

การไหลของอิเล็กตรอนแบบวงจรนี้เกี่ยวข้องใน Photosystem I เท่านั้น เพื่อที่จะสร้าง ATP เมื่อให้แสงแก่คลอโรพลาสต์อิเล็กตรอนจะถูกเคลื่อนย้ายจาก P 700 ซึ่ง P 700 ในสถานะกระตุ้น (excited state)จะส่งอิเล็กตรอนให้กับ Fe-S centers และต่อมายัง ferridoxin ซึ่งจะกลายเป็น reduced ferridoxin ต่อจากนั้น reduced ferridoxin จะส่งอิเล็กตรอนต่อไปยัง cytochrome b_6 และส่งผ่านอิเล็กตรอนกลับสู่ P 700 อิเล็กตรอนจะอยู่ในวงจรการไหล ดังนั้นผลิตผลจะเป็น ATP แต่เพียงอย่างเดียว

ferridoxin สามารถให้อิเล็กตรอนทั้ง 2 ระบบ ในระบบไม่เป็นวัฏจักร โดยให้แก่ $NADP^+$ เพื่อที่จะสร้าง $NADPH_2$ และในระบบวัฏจักรโดยให้อิเล็กตรอนกลับเข้าไปในลูกใช่การขนส่งอิเล็กตรอนเพื่อการสร้าง ATP การไหลของอิเล็กตรอนแบบวัฏจักรนี้เชื่อว่าจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของพืชมี NADPH อยู่มากเพียงพอแล้ว แต่ต้องการ ATP เพิ่ม เพื่อใช้ในกระบวนการที่ต้องการ

ในขณะที่การขนส่งอิเล็กตรอนตามธรรมชาติในคลอโรพลาสต์เป็นชนิดไม่เป็นวัฏจักร (non-cyclic) การทำเทียมก่อให้เกิดเป็นวัฏจักรของการขนส่งอิเล็กตรอนสามารถใช้สารกเคมีแทนได้ โดยการใช้สารเคมีที่เรียกว่า Phenazinemethosulfate (PMS) ซึ่งมีความสามารถในการเป็นตัวรับและให้อิเล็กตรอน สำหรับ PS I จะก่อให้เกิดวัฏจักรเทียม

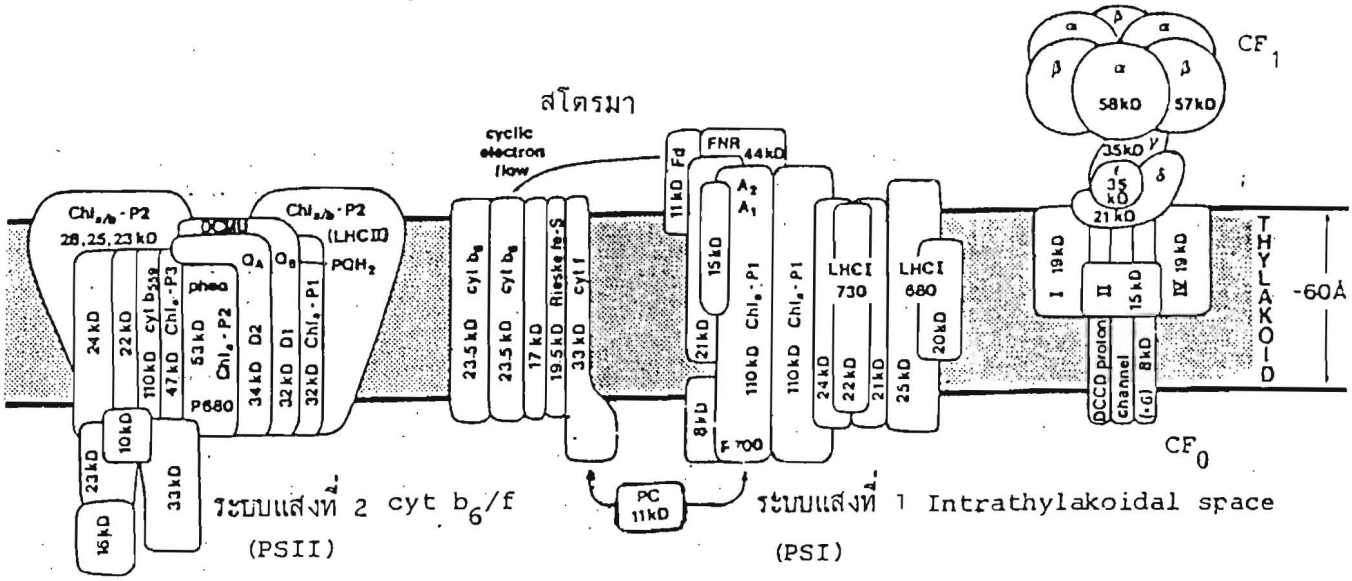
Cytochrome b/f คอมเพลกส์

Cytochrome b/f ที่ถูกแยกออกจากคลอโรพลาสต์ในผักไขมพบว่าประกอบด้วย 5 polypeptide ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 34, 33, 23.5, 20 และ 17.5 kD และในคอมเพลกส์นี้ประกอบด้วย 1 โมเลกุล cytochrome f, 2 โมเลกุล cytochrome b_6 และ Fe-S center อีก 1 โมเลกุล ซึ่งมี 2 non-home irons มันไม่มี plasto-+yanin, chlorophyll และcarotenoid แต่พบ lipid ไม่พบ cytochrome b-559 ถึงแม้ว่า 3 ใน 5 ของ polypeptied จะมี heme อยู่ในการเตรียมจะมี plastoquinol plastocyanin oxiductase กับ plastoquinol-1, plastoquinol-9 ซึ่งจะไวต่อสาร 2, 5-dibromomethylisopropyl-p-benzoquinone, 2-iodo-6-isopropyl -3-methyl-1-2, 4,4-trinitrodiphenyl ether, 5-n-undecyl-6-6-hydroxy -4, 7-dioxobenzothiazole และ bathophenanthroline ซึ่งบทบาทของกลไกนี้จะขึ้นกับความเข้มข้นของ substrate, pH และตัวแปรอื่น

ใน mitochondria Cytochrome complex เป็นกลุ่มโปรตีนที่สำคัญในลูกไซ่การหายใจ ประกอบด้วย 2 heme b และ 1 heme c และ Fe-S-center และอาจจะมี quinone ด้วยการพบโครงสร้างใหม่ๆ ของคอมเพลกส์นี้ทำให้การศึกษาได้ประโยชน์มากขึ้นซึ่งมันจะเป็นคำตอบของกลไกการถ่ายทอดอิเล็กตรอนและโปรตอน และผ่านเยื่อรวมทั้ง quinnone loop ต่างๆ หรือ protein pump (6,7,8)

โครงสร้างที่สอดคล้องในเยื่อไทลาคอยด์ของคลอโรพลาสต์ mitochondria คือ cytochrome คอมเพลกส์ cytochrome b/f ซึ่งเป็นตัวผ่านของอิเล็กตรอนระหว่างระบบแสงทั้งสอง (2 photosystem) จาก plastoquinone ถึง plastocyanin หรือการเคลื่อนเป็นวงกลมรอบๆ ระบบ photosystem I จาก ferridoxin ถึงplastocyanin จากจุดนี้เรานำไปใช้ใน Slow electrogenic step หรือ branch electron pathway ทั้ง 2 step ถูกเร่งด้วยสารประกอบเชิงซ้อนที่กล่าวมาแล้ว ในระยะนี้มีการวิจัยในการศึกษาการทำงานของ cytochrome คอมเพลกส์ มักกระทำในลักษณะที่ถูกแยกเป็นอิสระทั้งในรูป micell ใน detegent หรือรูปที่รวมตัวใหม่ในถุงไขมันดังกล่าว ซึ่งในระยะหลังๆ ประสบความสำเร็จในการรวม photosystem I reaction center ใน liposome และในการย้ายที่โปรตอนที่เปลี่ยนโครงสร้างใหม่ด้วยสารประกอบ redox ที่สร้างขึ้น ซึ่งมันจะเป็นแนวทางที่จะรวบรวม cytochrome complex ในระบบที่จัดโครงสร้างใหม่ เช่นกัน

ขั้นตอนการทำ cytochrome b/f complex ให้บริสุทธิ์ จากผักโขมและพืชอื่นโดยให้มีประสิทธิภาพสูงของ cytochrome b/f นี้ยังไม่สำเร็จ แต่ขณะนี้เราทราบเกี่ยวกับ cytochrome b/c1 complex ของ mitochondria แล้ว การวิจัยเกี่ยวกับ chloroplast พบว่า cytochrome f และ b สามารถแยกออกจากคลอโรฟิลล์จากพืชได้ โดย Mr.Wessels และ Mr.Voorn แต่ส่วนที่เป็น polypeptied ของ complex ของสิ่งที่เตรียมได้ยังไม่ทราบแน่ว่ามีจำนวนกี่ชนิด และการทำงานของ plastoquinone plastocyanin oxidoreductase ยังไม่ได้มีการรายงานไว้องค์ประกอบของเอนไซม์ oxidoreductase มักพบว่า cytochrome b/f มีการสูญเสียขึ้นในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และเมื่อเร็วๆนี้มีรายงานถึง cytochrome b/f complex ที่ถูกแยกจากคลอโรพลาสต์ของผักโขมพบว่ามีเพียง polypeptide 5 ชนิด และการทำงานของ oxidoreductase ยังมีประสิทธิภาพสูงอยู่ (8,9,10)(รูปที่ 2b)



รูปที่ 2b แผ่นภาพซึ่งเขียนขึ้นเพื่อแสดงการจัดตัวของไฟลีเปปไทด์ต่างๆ ซึ่งได้มีการศึกษาและการทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยแยกจากผนังไทลาคอยด์ของพืชชั้นสูงด้วยวิธีต่างๆ เช่น Freeze-fracture; electron microscope; gel electrophoresis และการศึกษาทางชีวเคมี

บทที่ 2

วิธีดำเนินการศึกษา

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน

ตอนที่ 1. นำพืชมาแยก chloroplast โดยทำ Homogenization ให้เซลล์แตกโดยใช้ polytron จากนั้นนำมาแยก thylakoid ออกโดยใช้ centrifuge และ Hypotonic Solution และวัดการเคลื่อนที่ของอิเล็กตรอนในระบบแสงที่ 1 ระบบแสงที่ 2 และระบบแสงที่ 1 และ 2 ร่วมกัน

ตอนที่ 2. แยก Cytochrome b/f complex ออกจากเยื่อ thylakoid โดยใช้สารซักฟอก (detergent)(detergent ที่ใช้คือ Octylglucoside)โดยใช้ค่าความเข้มข้นต่างๆ กันภายหลังการสกัดนำมาหา Ratio ของค่า OD563/OD652 ถ้าค่านี้สูงก็แสดงว่ามี cytochrome สกัดออกมาจากเยื่อไทลาคอยด์มาก (563 คือค่าสูงสุดของการดูดแสงของ cytochrome b 563, 652 คือ ค่าการดูดแสงของ คลอโรฟิลล์)

ตอนที่ 3. เนื่องจากการทดลองนี้ทำที่อุณหภูมิห้อง และเซลล์พืชที่ใช้ทดลองมี proteolytic enzyme อยู่มาก อาจทำให้เกิดการสลายตัวของ protein ในระหว่างการแยกด้วยสารซักฟอกเติมตัวยับยั้ง proteolytic enzyme เช่น PMSF และEDTA ลงไปในการแยก cytochrome b/f complex จากเยื่อไทลาคอยด์

PMSF = phenylmethylsulfonylfluoride

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid

ตอนที่ 1. วิธีดำเนินการศึกษาเป็นการทดลอง ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ

1.1. การเตรียม thylakoid suspension

2.2. การวัดอัตราการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport activity)

1.1. การเตรียม thylakoid suspension

ขั้นตอนการทดลอง

เก็บตัวอย่างพืชที่ต้องการศึกษา(1)มาหั่นให้ละเอียด จนได้น้ำหนักประมาณ 25 gm/90ml

↓

นำมาปั่นกับสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.4 M.sucrose, 10 mM NaCl, 0.17 tris/HCI buffer pH8.0 และ10 mM Sodium ascorbate โดยใช้เครื่อง polytron จนผสมเข้ากันดี (เลือกใช้อัตราเร็ว No.10 ปั่น 2-3 ครั้ง ครั้งประมาณ 10 วินาที) แล้วกรองของผสมที่ได้ผ่านผ้ากรอง (ใช้ผ้าขาวบางพับทบซ้อนกัน 4 ชั้น)

↓

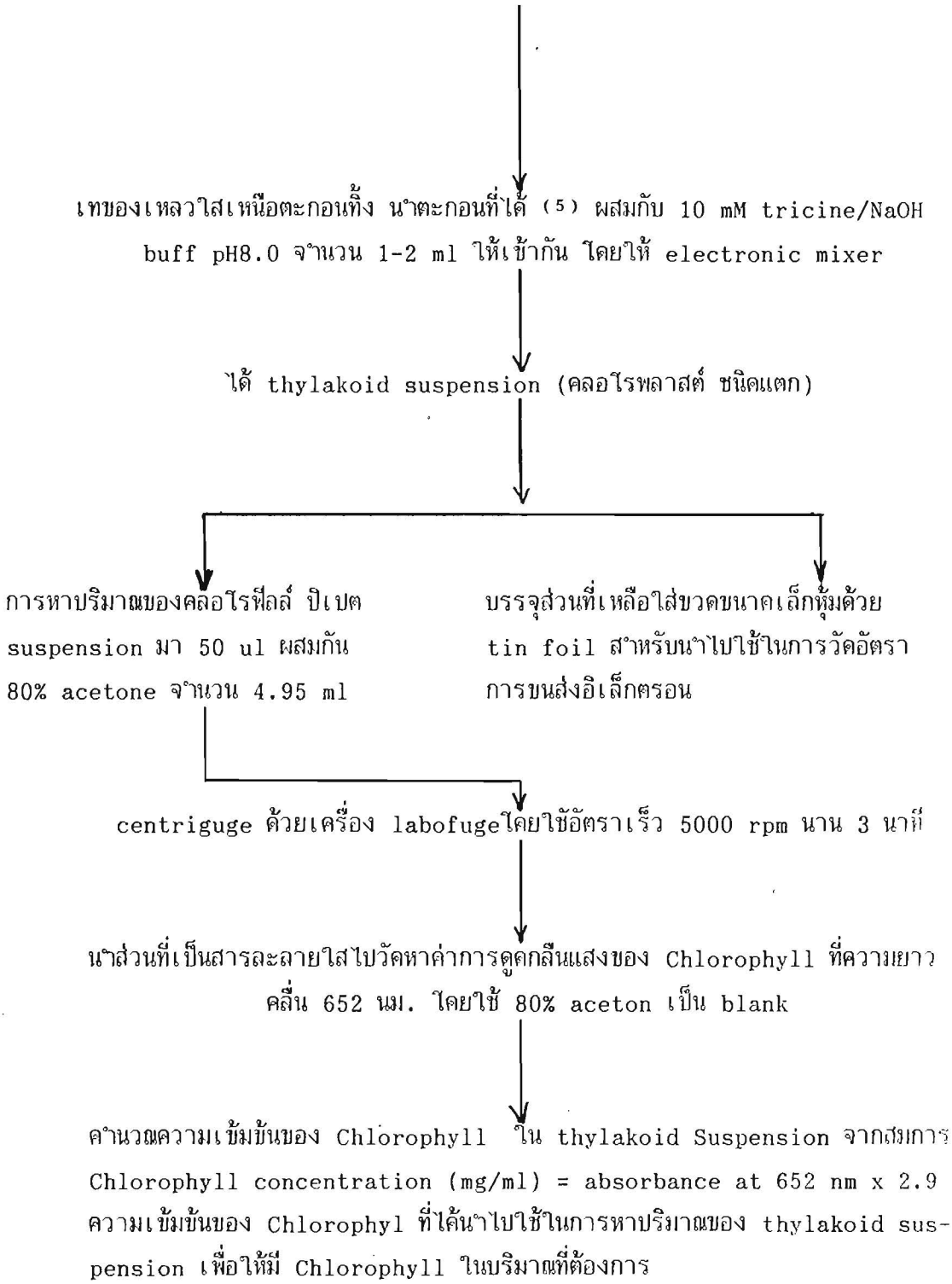
นำสารละลายที่ได้จากการกรอง มาทำให้ตกตะกอน โดย certrifuge ด้วยเครื่อง HIMAC โดยใช้อัตราเร็ว 5,000 rpm นาน 5 นาที

↓

เทของเหลวใสเหนือตะกอนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ (3) มาผสมกับ 10 mM tricine/NaOH buffer pH8.0(4) จำนวน 60 ml ใช้ Stirring rod ที่หุ้มปลายด้วยสำลี เขี่ยให้ชิ้นส่วนของตะกอนกระจายใน buffer

↓

นำไป centirfuge ด้วยเครื่อง HIMAC โดยใช้อัตราเร็ว 15,000rpm. นาน 10 นาที


เทของเหลวใสเหนือตะกอนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ (5) ผสมกับ 10 mM tricine/NaOH buff pH8.0 จำนวน 1-2 ml ให้เข้ากัน โดยให้ electronic mixer
ได้ thylakoid suspension (คลอโรพลาสต์ ชนิดแตก)
การหาปริมาณของคลอโรฟิลล์ ปิเปต suspension มา 50 ul ผสมกัน 80% acetone จำนวน 4.95 ml
บรรจุส่วนที่เหลือใส่ขวดขนาดเล็กหุ้มด้วย tin foil สำหรับนำไปใช้ในการวัดอัตราการขนส่งอิเล็กตรอน
centriguge ด้วยเครื่อง labofugeโดยใช้อัตราเร็ว 5000 rpm นาน 3 นาที
นำส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงของ Chlorophyll ที่ความยาวคลื่น 652 นม. โดยใช้ 80% aceton เป็น blank
คำนวณความเข้มข้นของ Chlorophyll ใน thylakoid Suspension จากสมการ
Chlorophyll concentration (mg/ml) = absorbance at 652 nm x 2.9
ความเข้มข้นของ Chlorophyl ที่ได้นำไปใช้ในการหาปริมาณของ thylakoid suspension เพื่อให้มี Chlorophyll ในปริมาณที่ต้องการ

หมายเหตุ (1) การเก็บตัวอย่างพืชควรทำในตอนเช้า เนื่องจากเป็นช่วงที่พืชยังมีการสังเคราะห์แสงน้อย ทำให้ใบมีแป้ง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่รบกวนผลการทดลองเกิดขึ้นน้อยด้วย

(2) สารละลายดังกล่าวทำให้ Cell membrane แตกออก และ chloroplast หลุดออกมาจาก cell

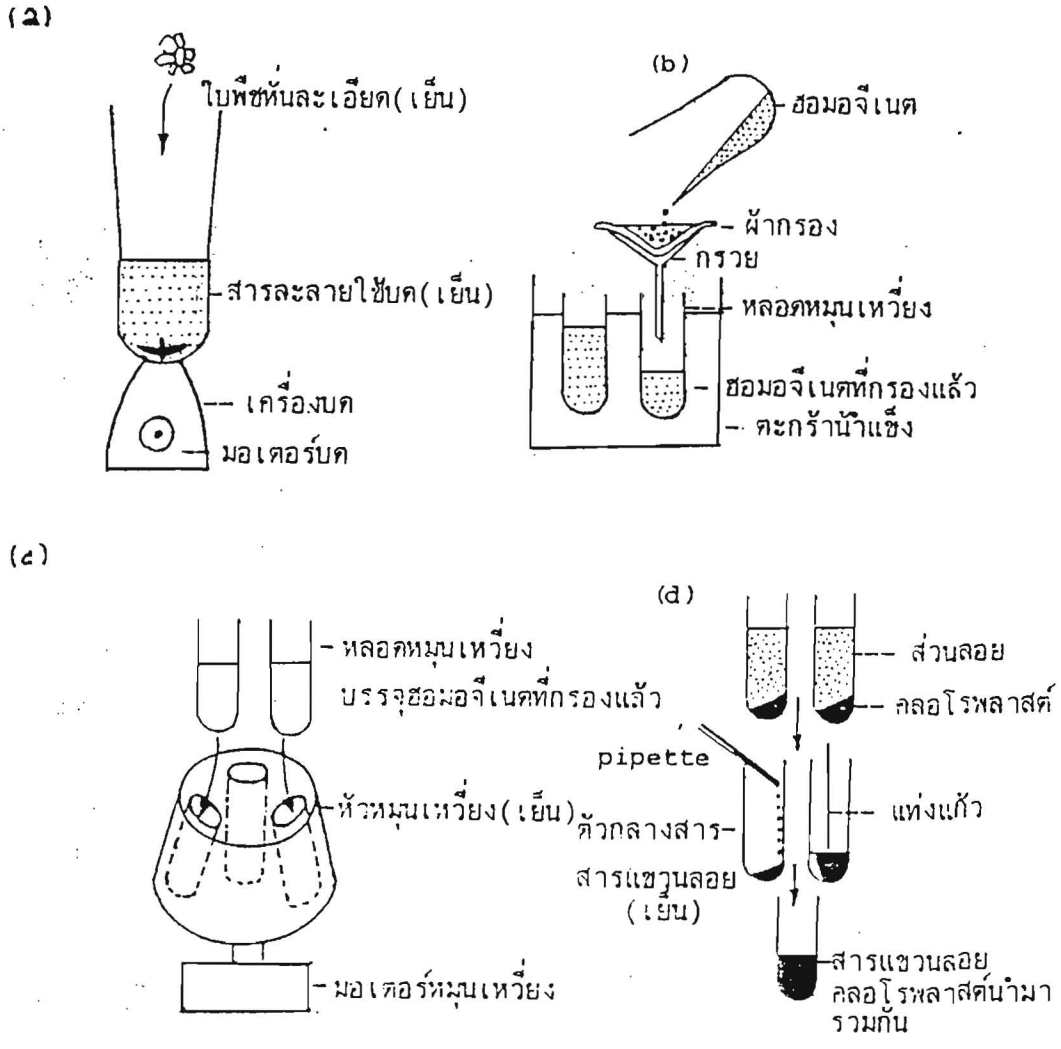
(3) ตะกอนที่ได้ในขั้นตอนนี้คือ Chloroplast

(4) 10 mM tricine/NaOH buffer pH8 เป็น hypotonic Solution จะทำให้ membrane ของ chloroplast แตกออก

(5) ตะกอนที่ได้ในขั้นตอนนี้ คือ thylakoid

ในการทดลองนี้ สารละลายและเครื่องมือที่ใช้ ต้องผ่านการทำให้เย็นมาก่อน และตั้งแต่ขั้นตอนที่ได้ Chloroplast ออกมาแล้ว(หลังจากปั่นในพืชกับสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยเครื่อง polytron) จะต้องระวังมิให้ส่วนที่มี chlorophyll เป็นองค์ประกอบถูกแสง และต้องอยู่ในสภาพที่เย็นตลอดเวลา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ขั้นตอนต่างๆ ในการเตรียม thylakoid Suspension

a การปั่นใบพืชกับสารรละลายบัฟเฟอร์ ให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย เครื่อง bender

b การกรองของผสมที่ได้จากการปั่นใน a

c การ centrifuge สารละลายที่ได้จากการกรองใน b

d การ chloroplast ที่ตกตะกอนมาผสมกับ 10 mM tricine/NaOH buffer pH8 เพื่อให้ membrane ของ chloroplast แตกออก

1.2. การวัดอัตราการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport activity)

การวัด activity ของการขนส่งอิเล็กตรอนของพืชทำโดยการวัดปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อมีแสงมากระตุ้นอิเล็กตรอนของระบบแสง ทั้งสองถูกกระตุ้นเกิดการขนส่งอิเล็กตรอนไปยัง $NADP^+$ น้ำเมื่อให้อิเล็กตรอนแล้วจะสลายได้ออกซิเจนออกมาดังที่กล่าวแล้ว ในการทดลองเราใช้ FeCN เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทน $NADP^+$ เนื่องจากมีค่า Redox potential สูงและหาได้ง่าย (สารที่มี Redox potential สูงจะรับอิเล็กตรอนได้ดี) และในการทดลองเราจะเติม NH_4Cl เป็น uncoupler ทำให้การส่งผ่านเกิดได้ดีขึ้นด้วย ผลการทดลองจะเห็นได้ชัดเจนขึ้น

เราจะทำการศึกษาโดยตรวจวัด activity ของ PSI และ PSII ควบคู่กันไป จากนั้นก็ศึกษาเฉพาะ PSI และ PSII ทีละระบบ ซึ่งทำได้โดยการหาสารเคมีที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวรับอิเล็กตรอนที่มีความเจาะจงต่อบางบริเวณของกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนรวมทั้งสารที่มาขัดขวางขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอนตามปกติ

$$H_2O \longrightarrow M \longrightarrow PSII \longrightarrow Q \longrightarrow PQ \longrightarrow cyt\ b/f \longrightarrow PC \longrightarrow PSI \longrightarrow Fe\text{-}S_A \longrightarrow Fd \longrightarrow FNR \longrightarrow NADP^+ \quad Fe\text{-}S_B \qquad (6)$$

แผนแสดงขั้นตอนการขนส่งอิเล็กตรอนของพืช

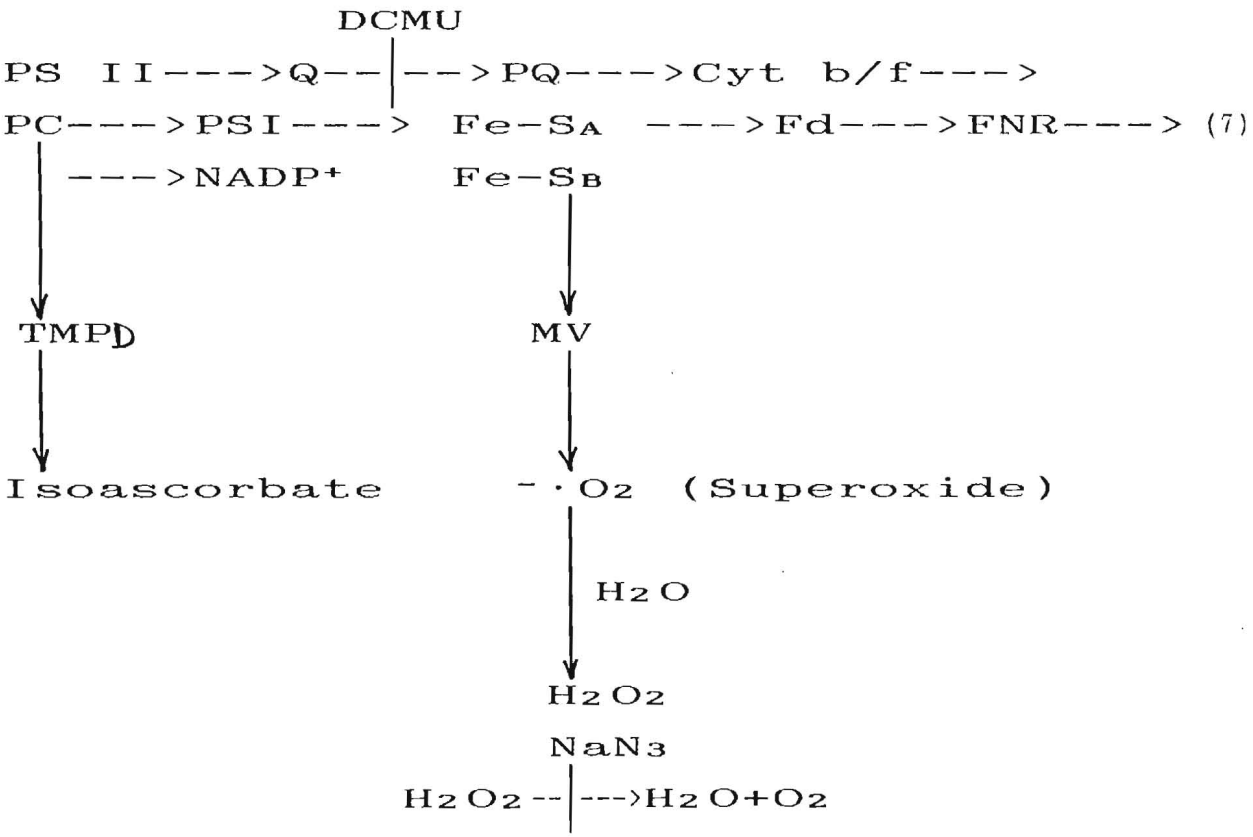
M	: Manganese enzyme complex
PSII	: Photosystem II
Q	: Quencher (ตัวรับอิเล็กตรอนตัวแรกของ PSII)
PQ	: Plastoquinone
Cytb/f	: Cytochrome b/f complex
PC	: Plastocyanin
PSI	: Photosystem I
Fe-S	: Non-heme iron sulfure center
Fd	: Ferredoxin
FNR	: Ferredoxin $NADP^+$ reductase
FeCN	: Potassium ferricyanide

ในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาการขนส่งอิเล็กตรอน ที่เกิดขึ้นใน chloroplast โดยพิจารณากระบวนการที่เกิดขึ้นเป็น 3 ส่วนคือ การขนส่งอิเล็กตรอนในระบบแสงที่ 1 ในระบแสงที่ 2 และในสองระบบที่ 1 และ 2 ต่อเนื่องกัน

<u>การศึกษาการขนส่งอิเล็กตรอนใน PSI</u>

เราจะทำการทดลองโดยใช้ DCMU ปิดกั้นการส่งผ่านอิเล็กตรอน จาก Q (primary acceptor ของ PS II) ไปยัง PQ (plastoquinone) และใช้ TMPD/Vitc เป็นตัวให้อิเล็กตรอนแทนน้ำ แต่ TMPD ต้องอยู่ในสภาพถูกรีดิวซ์จึงให้อิเล็กตรอนได้ เราใช้ isoascorbate มารีดิวซ์ ส่วนตัวรับออิเล็กตรอนนั้น เราใช้ MV แทน Fd(Ferredoxin) สาเหตุที่เราเลือกใช้ตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน ทั้งสองเนื่องมาจา TMPD มีความจำเพาะต่อ PC และ MV ความจำเพาะต่อ Fe-S เป็นพิเศษ

MV จะรับอิเล็กตรอน Non-heme iron sulfur center แล้วส่งต่อให้ O_2 ทำให้ O_2 อยู่ในรูป superoxide ซึ่งจะรวมกับน้ำเป็น H_2O_2 แต่เนื่องจาก H_2O_2 สามารถสลายตัวกลายเป็น O_2 ได้อีก โดย enzyme catalase ใน thylakoid เราจึงใช้ NaN_3 block เพื่อให้การเปลี่ยนแปลง O_2 ที่วัดได้ เป็นของ O_2 ที่ถูกใช้ไปเท่านั้น อัตราการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบนี้ สามารถวัดได้จากปริมาณ O_2 ที่ใช้ไป



(7)

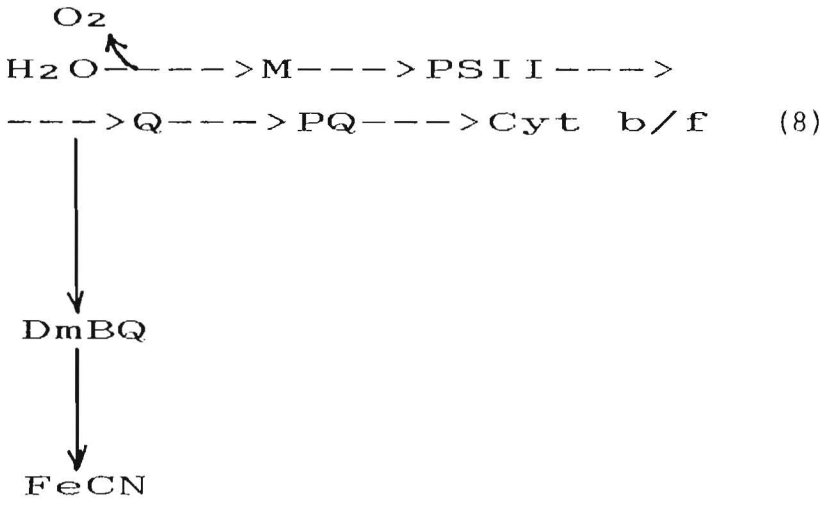
DCMU : 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1,Dimethylurea

TMPD : N-Tetramethyl-p-phenylene diamine

MV : Methyl viologen

การศึกษาการขนส่ง อิเล็กตรอนใน PSII

เมื่อน้ำสลายตัวให้ O_2 และอิเล็กตรอนถูกส่งต่อผ่านเป็นทอด ๆจนถึง PQ เราจะใช้ DmBQ ซึ่งจำเพาะต่อ PQ (Plastoquinone) มารับอิเล็กตรอนแทน Cytochrome (เพราะมีค่า Redox potential สูงกว่า cytochrome) แล้วส่งต่อไปยัง FeCN ซึ่งจะทำให้อิเล็กตรอนที่ได้จากน้ำ ผ่าน PSII เท่านั้น โดยจะไม่ผ่านไปยัง PSI อัตราการขนส่งอิเล็กตรอน ในระบบนี้สามารถวัดได้จากปริมาณ O_2 ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของน้ำ



(8)

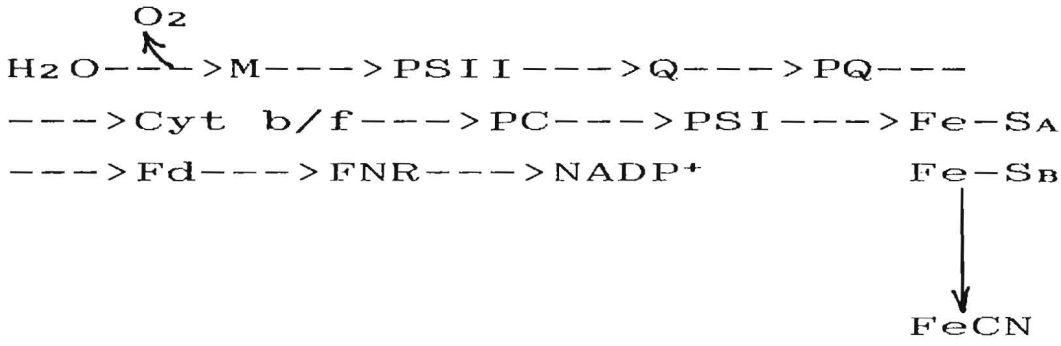
DmBQ : Benzoquinone

FeCN : Potassium ferricyanide

การศึกษาการขนส่งอิเล็กตรอนใน PSI และ PSII ต่อเนื่องกัน

อิเล็กตรอนจะถูกส่งผ่านหาเป็นทอดๆ ตามที่เกิดขึ้นจริงในพืชจนถึง Non-heme iron sulfure center เราก็จะใช้ FeCN เป็นตัวมารับอิเล็กตรอนแทน Fd

(Ferredoxin) ดังรูป อัตราการขนส่งอิเล็กตรอนสามารถวัดได้จากปริมาณ O_2 เกิดขึ้นจากการสลายตัวของน้ำ



(9)

การทดลอง

เราจะทดลองวัดอัตราการขนส่งอิเล็กตรอนใน PSI และ PSII ต่อเนื่องกัน เฉพาะ PSI, PSII โดยดูผลของสาร uncoupler ที่ใส่ลงไปด้วย (ใช้ NH_4Cl)

Reagant ที่ใช้

PSI

1. 20 mM Hepes/NaOH+10 mM NaCl (O_2free) pH8.0	0.9 ml
2. Thylakoid suspension (30 mg/ml)	30 µl
3. 0.1 mM TMD + mM Isoascorbate	10 µl
4. 10 uM DCMU	10 µl
5. 30 µg/ml MV	10 µl
6. 1 mM NaN_3	10 µl
7. 2 mM $MgCl_2$	10 µl
8. H_2O (O_2free)	820 µl

ใส่ reagent ต่างๆ ตามลำดับลงใน chamber แล้วทำการทดลองเช่นนี้ 2 ครั้ง ในครั้งที่ 3 และ 4 ทดลอง เช่นเดียวกัน แต่ใส่ 25 mM NH_4Cl 10 µl และใช้น้ำ 810 µl

PSII

1. 2 mM Hepes/NaOH + 10 mM NaCl (O_2 free) pH8.0	0.9 ml
2. 1 mM DmBQ	10 µl
3. 1 mM $K_3Fe(CN)_6$	10 µl
4. 2 mM $MgCl_2$	10 µl
5. Thylakoid suspension	30 µl
6. H_2O (O_2 free)	840 µl

ใส่ reagent ต่างๆ ตามลำดับลงใน chamberทำการทดลองเช่นนี้ 2 ครั้ง ในครั้งที่ 3 และ 4 ทดลองเช่นเดียวกัน แต่ใส่ 2.5 mM NH_4Cl 10 ul และน้ำ 830 ul

PSI และ PSII ต่อเนื่องกัน

1. 20 mM Hepes/NaOH+10 mM NaCl (O_2 free)pH8.0	0.9 ml
2. 2 mM $MgCl_2$	10 µl
3. 1 mM K_3 $Fe(CN)_6$	10 µl
4. Thylakoid suspension	30 µl
5. H_2O (O_2free)	80 µl

ใส่ reagent ต่างๆ ตามลำดับลงใน chamber แล้วทำการทดลองเช่นนี้ 2 ครั้ง ในครั้งที่ 3 และ 4 ทดลองเช่นเดียวกัน แต่ใส่ 2.5 mM NH_4Cl 10 ul และใช้น้ำ 840 ul

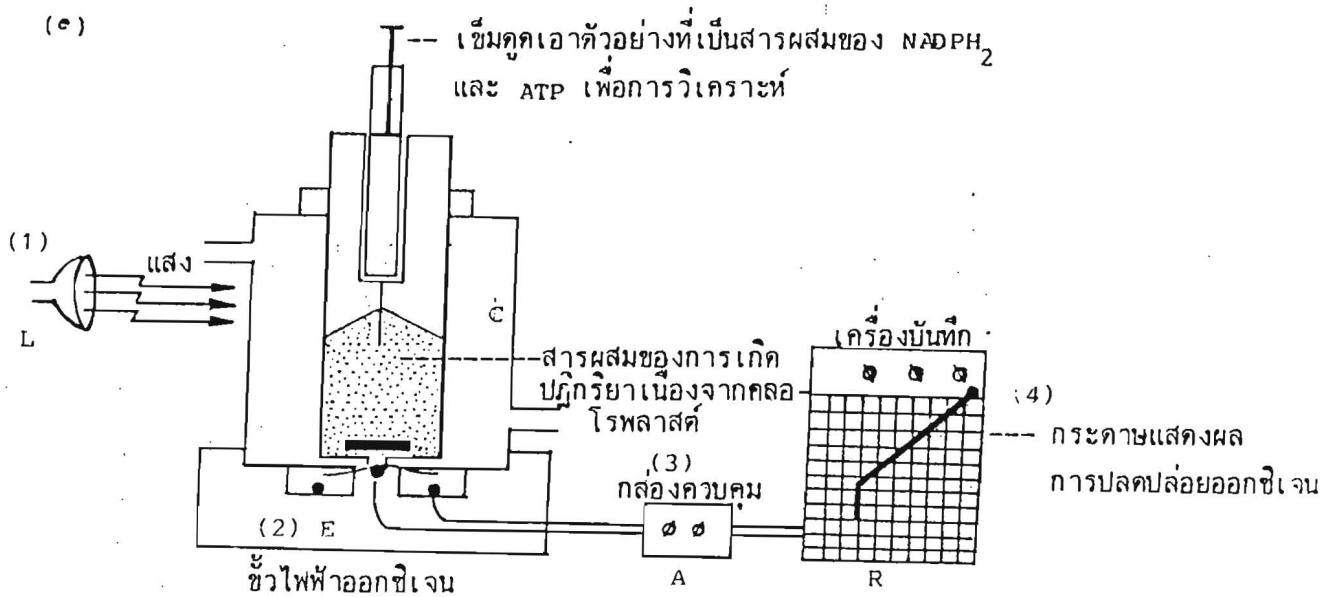
หมายเหตุ ปริมาตรรวมทุกครั้งต้องเท่ากับ 1.8 ml.

2.5 mM NH_4Cl : NH_4+ เป็น uncoupler agent

2 mM $MgCl_2$: Mg^{2+} เป็นตัวเร่งกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน

10 mM Hepes/NaIH + 10 mM NaCl (O_2 free) ปรับ pH ให้เป็น 8 เพราะเป็นสภาพที่เหมาะสำหรับการเกิดการขนส่งอิเล็กตรอน

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 4 Oxygen electrode

จากรูปที่ 4 จะเห็นว่าเครื่องมือที่ใช้ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 4 ส่วนดังนี้

1. หลอดไฟ (L) ซึ่งจะให้แสงสีแดงสำหรับกระตุ้นอิเล็กตรอนของคลอโรฟิลล์ที่เป็นศูนย์การเกิดปฏิกิริยาในแต่ละระบบแสง (สาเหตุที่ใช้แสงสีแดง เนื่องจากเป็นแสงซึ่งมีความยาวคลื่นที่รงควัตถุสำหรับการสังเคราะห์ด้วยแสงสามารถดูดซับพลังงานได้ดีที่สุด)

2. Oxygenelectrode (E) ประกอบด้วย chamber (C) ซึ่งเป็นส่วน

30·ซ ผ่านเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ภายใน chamber มี magnetic bar สำหรับปั่นและผสมให้รีเอเจนต์ต่างๆ เข้ากัน เมื่อใน electrode เกิดการเปลี่ยนแปลงในปริมาณของออกซิเจน จะมีสัญญาณไฟฟ้าเกิดขึ้น

3. เครื่องขยายสัญญาณ หรือ Amplifier (A) ทำหน้าที่ขยายสัญญาณไฟฟ้าซึ่งส่งผ่านมาจาก oxygen electrode ให้มีขนาดเหมาะสม และส่งต่อไปยังส่วนบันทึกผล

4. ส่วนบันทึกผล หรือ recorder (R) แสดงผลออกมาในรูปของเส้น Curve

อัตราการขนส่งอิเล็กตรอนในแต่ละแบบทำได้จากปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยแปลงไปเมื่อบรรจุรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับแต่ละรอบ ลงในส่วน Chamber ของ oxygen electrode แทนน้ำ (ใช้น้ำเป็นตัวอ้างอิงปริมาณออกซิเจน โดยใช้ $Na_2S_2O_4$ ไล่ออกซิเจนออกจากน้ำ) สำหรับปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงนี้ จะหมายถึง ปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไป (O_2 consumption) สำหรับกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบแสงที่ 1 และหมายถึงปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้น (O_2 evolution) สำหรับกระบวนการในระบบแสงที่ 2 และสองระบบต่อเนื่องกัน อัตราการขนส่งอิเล็กตรอน จะคำนวณออกมาในรูปของปริมาณออกซิเจนที่เปลี่ยนแปลงไป ต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อ 1 ชั่วโมง

ขั้นตอนในการทดลอง

- เตรียม reagent ต่างๆ ในปริมาณ และความเข้มข้นที่ต้องการเก็บไว้ในที่เย็น
- จัดเครื่องมือที่ใช้ให้พร้อม นำ reagent สำหรับระบบที่ต้องการทดลอง มาบรรจุใน Oxygen electrode chamber ตามปริมาณที่กำหนด (Thylakoid suspension, NH_4Cl, $MgCl_2$ ควรใส่หลัง reagent อื่นๆ)
- เปิดไฟให้แสงสีแดงส่องผ่าน electrode เปิดเครื่องให้ recorder ทำงาน
- คำนวณอัตราการขนส่งอิเล็กตรอนจากปริมาณออกซิเจนที่เกิดขึ้นหรือใช้ไป ซึ่งแสดงออกมาในรูป

คำนวณอัตราการขนส่ง

การทดลอง ใช้น้ำเป็นสารอ้างอิง ในการวัดปริมาณ O_2 (การสมมุติ) (ที่ 30·ซ)น้ำ 1.8 ml ทำให้กราฟเคลื่อนที่ไปได้ 85 ช่อง(เป็นการสมมุติ) ตามแกน X

85 ช่อง = 0.445 μg atom of O_2/ml

= 0.223 μ mole of O_2/ml

$$= \frac{0.223 \times 1.8\ \mu \text{ mole of } O_2\text{/ml}}{85}$$

ถ้ากราฟเคลื่อนที่ไปได้ a ช่องตามแกน x $= \frac{0.223 \times 1.8 \times a\ \mu \text{ mole of } O_2\text{/ml}}{85}$

สมมุติ เครื่องมือให้กระดาษเคลื่อนที่ตามแกน y-2.5 cm/min (ความเร็วของ chart recorder) 1 ชม. จะเคลื่อนได้ 2.5 x 60

ถ้ากระดาษเคลื่อนที่ได้ b cm คิดเป็นเวลา $= \frac{b}{2.5 \times 60}$ ชม.

$$\text{Slope} = \frac{X}{Y} = \frac{0.223 \times 1.8 \times a \times 2.5 \times 60\ u \text{ mole of } O_2\text{/hr}}{85 \times b}$$

อัตราการขนส่งอิเล็กตรอนคือ อัตราส่วนระหว่างการเปลี่ยนแปลง O_2 ในหนึ่งหน่วยเวลาต่อ ปริมาณ chlorophyll เป็น mg

$$\text{อัตราการขนส่งอิเล็กตรอน} = \frac{\text{Slope}}{\text{ปริมาณ chlorophyll}}$$

หน่วยเป็น μ mole of $O_2 hr^{-1}$ mg $chlorophyll^{-1}$ (เราใช้ Thylakoid suspension 30 μl)

ตอนที่ 2. การแยก Cyt.ochrome b/f complex ออกจากเยื่อ Thylakoid (10)

วิธีทดลอง : sample

- เก็บพืช(ผักกาดขาว)มาหั่นให้ละเอียด 180 g แบ่งเป็น 3 บีกเกอร์

- แต่ละบิกเกอร์นำมาบั่นกับสารละลาย ซึ่งประกอบด้วย 0.4 M sucrose, 10 mM NaCl, 1.0 M tris/HCL buffer pH 8.0 และ 10 mM Sod ascorbate จำนวน 90 ml โดยใช้เครื่อง polytron ผสมเข้ากันดี(เลือกใช้อัตราเร็ว) No.10 ปั่น 2-3 ครั้งๆ ละ 10 วินาที) แล้วกรองของผสมที่ได้ผ่านการกรอง (ใช้ผ้าขาวบางพับทบซ้อนกัน 4 ชั้น)
- นำสาละลายที่ได้จากการกรอง มาทำให้ตกตะกอนโดย centrifuge ด้วยเครื่อง HIMAC โดยใช้อัตราเร็ว 5,000 rpm นาน 5 นาที
- เทของเหลวใสเหนือตะกอนทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาผสมกับ 10 mM tricine/NaOH buffer pH8 จำนวน 60 ml ใช้ stirring rod ที่หุ้มปลายด้วยสำลีเขี่ยให้ชิ้นส่วนของตะกอนกระจายใน buffer
- นำไป centrifuge ด้วยเครื่อง HIMAC โดยใช้อัตราเร็ว 15000 rpm.
- เทของเหลวใสเหนือตะกอนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ผสมกับ* 10 mM Octylglucoside จำนวน 1-2 ml นาน 10 นาที
- ได้ thylakoid suspension
- ปิเปต Suspension มา 50 µl ผสมกับ 80% acetone จำนวน 4.95 ml
- centrifuge ด้วยเครื่อง labofuge โดยใช้อัตราเร็ว 5000 rpmนาน 3 นาที
- ตะกอนละลายใน detergent (ใช้ Octyl glucoside)

* ความเข้มข้นขึ้นกับจุดประสงค์ที่ต้องการ

- นำส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดค้าการดูดกลืนแสงของ chlorophyll ที่ความยาวคลื่น 652 โดยใช้ 80% acetone เป็น blank
- คำนวณความเข้มข้นของ Chlorphyll ใน thylakoid suspension จากสมการ

  chlorophyll (mg/ml) = absorbance at 652 nmx2.9 ความเข้มข้นของ chlorophyll ที่ได้บันทึกลงตารางที่ 1 นำไปใช้ในการหาปริมาณของ thylakoid suspension เพื่อให้มี chlorophpyll ในปริมาณที่ต้องการ
- adjust ให้ได้ความเข้มข้น 2 mg/ml
- เทใส่ขวดสีชา นำไปกวนนาน 30 นาที (เป็นการ extract เอา Cyt b/f complex)

- centrifuge ที่ 17,000 rpm 20 นาที (ใช้เครื่อง Hitachi, Rotor PRP 18-3-1122)
  เอาตะกอนทิ้ง แบ่งน้ำใสไปวัด spectrophotometer โดยใช้ Octylglucoside เป็น blank เสร็จแล้วเทกลับคืน และเก็บน้ำใสทั้งหมดในหลอดทดลองที่ปิดฝา และ label ให้เรียบร้อย เก็บไว้ในที่เย็น
- หา Ratio ของ absorbance
  OD_{563}/OD_{652} โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของ Octylglucoside เป็น 20 mM, 30 mM และ 40 mM ตามลำดับ บันทึกผลลงในตารา 1 และ 2

ตอนที่ 3. ผลของ proteolytic inhibitors ต่อกระบวนการแยก cytochrome b/f complex จากเยื่อไทลาคอยด์

<u>วิธีทดลอง</u>

เหมือนตอนที่ 2 แต่เติม PMSF+EDTA ความเข้มข้น 1 mM ลงไปโดยผสมไปกับสารละลายที่มี Octylglucoside อยู่ด้วย

บทที่ 3
ผลการทดลอง

ได้ทำการแยกคลอโรพลาสต์ของพืชต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบต่างๆ ซึ่งปรากฏผลในตารางที่ 1

พืชที่ใช้ในการทดลอง

	Botanical Name	Family
คะน้า	Brassica oleracea	Cruciferae
ผักแว่น	Marsilea crenata	Marsileaceae
หญ้าคา	Imperata cylindrica	Gramineae
ผักตบชวา	Eichho rnia crassipes	Pontederiaceae
เปล้าน้อย	Croton sp.	Euphobiaceae
อังกาบฝรั่ง	Ruellia tuberosa	Acanthaceae
ผักกาดหอม	Lactuca indica L.	Compositae

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบแสงที่ 1, ที่ 2 และระบบแสงที่ 1 ควบคู่ไปกับระบบแสงที่ 2 ของคลอโรพลาสต์ของพืชชนิดต่างๆ

พืช	มก.คลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตร	อัตราการขนส่งอิเล็กตรอน * (ไมโครโมลของ O_2 ต่อ มก.คลอโรฟิลล์ต่อ ชม.)					
		ระบบแสงที่ 2		ระบบแสงที่ 1		ระบบแสงที่1และที่ 2	
			+NH_4Cl		+NH_4Cl		+ NH_4Cl
ผักกาดหอม	2.00 2.00	120.8	182.6	-180	-386	120	126
คะน้า	2.00 2.02	0.20	9.31	-10.0	-123.31	10.25	15.38
ผักแว่น	1.32 1.32	32.94	25.55	-128.20	-111.48	19.51	23.23
หญ้าคา	0.91 0.91	29.56	22.30	-178.37	-94.74	25.34	27.84
ผักตบชวา	0.30 0.30	80.73	181.27	-103.58	-492.02	113.29	116.53
เปล้าน้อย	2.80 2.80	6.31	8.01	-52.34	-43.76	14.59	-
อังกาบฝรั่ง	2.21 2.21	32.32	31.13	-14.51	-	16.90	11.88

* ค่าที่ได้ ได้จากการหาค่าเฉลี่ยของการทดลองจำนวน 2 ครั้ง ; - หมายถึงปฏิกิริยาการใช้ก๊าซออกซิเจน

ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นถึงการแยกไซโตโครม บีเอฟ คอมเพลกส์ จากเยื่อไทลาคอยด์ (ผักตบชวา) โดยใช้ Octylglucoside ในความเข้มข้นต่างๆ กัน

เยื่อไทลาคอยด์ +Octylglucoside	ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ (มล.ต่อมิลลิลิตร)	OD_{652}	OD_{563}	OD_{563}/OD_{652}
10 mM	1.12	0.20	0.14	0.70
20 mM	0.42	0.33	0.21	0.64
30 mM	1.00	0.72	0.24	0.32
40 mM	0.34	0.75	0.42	0.56

ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นถึงการใช้ Octylglucoside ในการแยก ไซโตโครม บีเอฟ คอมเพลกส์ จากเยื่อไทลาคอยด์ (คลอโรพลาสต์ของผักกาดหอม) ในความเข้มข้นต่างๆ กัน และแสดงการเปรียบเทียบเมื่อใช้ PMSF ร่วมกับ EDTA

เยื่อไทลาคอยด์* +Octylglucoside	OD_{652}	OD_{563}	** OD_{563}/OD_{652}
10 mM	0.73	0.53	0.73
10 mM+EDTA+PMSF	0.71	0.50	0.70
20 mM	0.83	0.54	0.65
20 mM+EDTA+PMSF	1.00	0.52	0.52
30 mM	1.34	0.94	0.70
30 mM+EDTA+PMSF	1.32	0.86	0.65
40 mM	1.49	1.1	0.74
40 mM+EDTA+PMSF	1.48	1.1	0.74

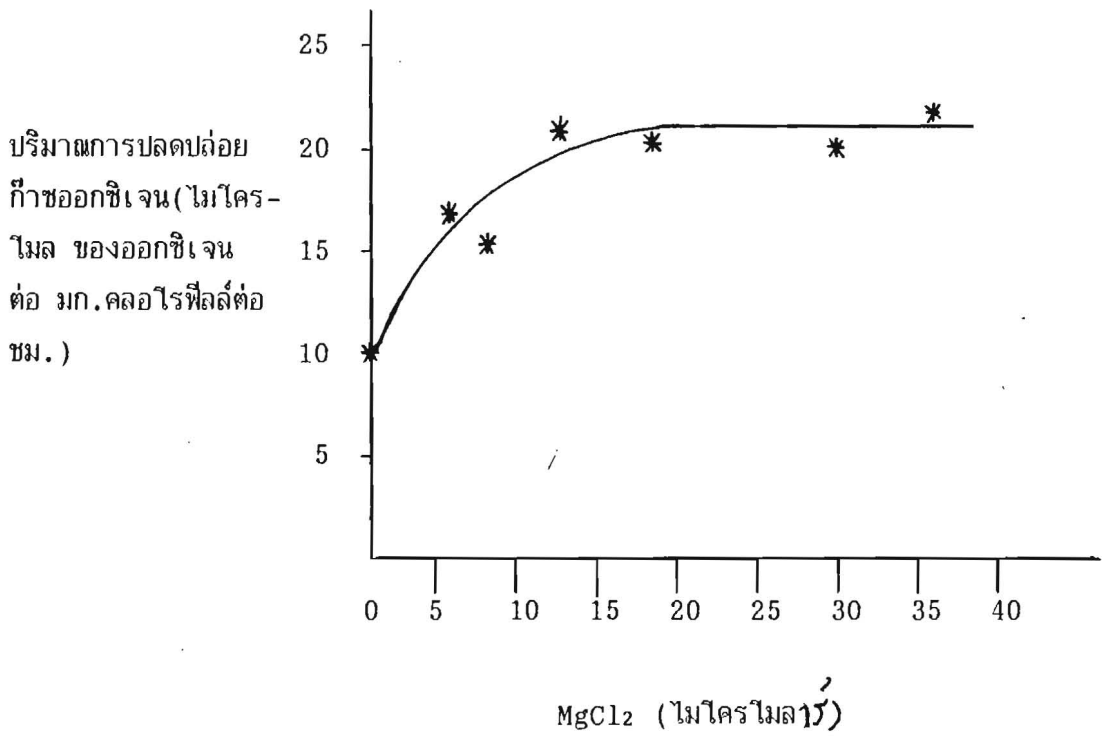
PMSF และ EDTA ความเข้มข้น 1 mM

* ความเข้มข้น 2 มก.คลอโรฟิลล์ต่อมิลลิลิตร

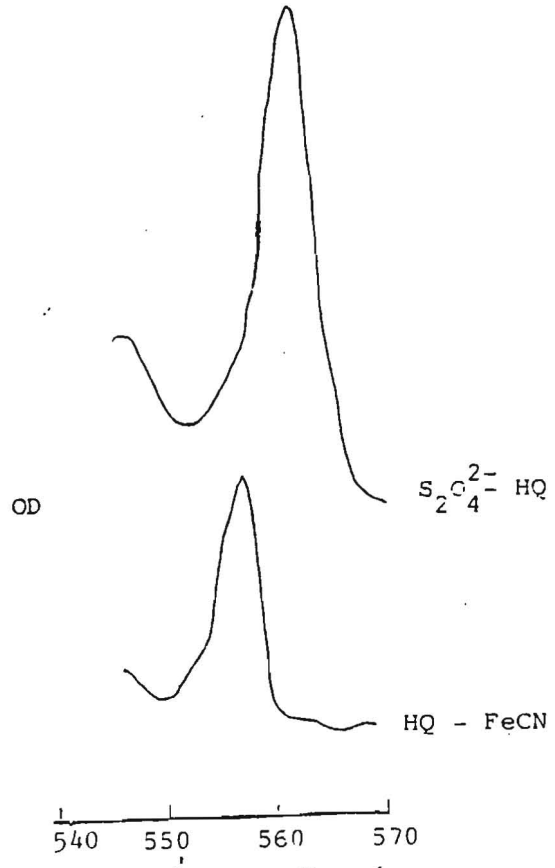
** เป็นค่าเฉลี่ยจากการเตรียมตัวอย่าง 2 ครั้ง

ตารางที่ 4 แสดงการเตรียมไซโตโครม บีเอฟ คอมเพลกส์จากผักกาดหอมจำนวนมากโดยให้ความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์มีค่า 2 มก.ต่อมิลลิลิตร (10 mM Octylglucoside +PMSF+EDTA)

ครั้งที่	ปริมาณผักกาดหอม กิโลกรัม	ปริมาณสุดท้าย มิลลิลิตร	OD_{652}	OD_{563}	OD_{563}/OD_{652}
1	0.3	4	0.68	0.48	0.71
2	0.3	3	0.50	0.37	0.74
3	2.4	30	0.36	0.25	0.69
4	0.6	10	0.90	0.60	0.67
5	2.87	60	0.29	0.20	0.69



รูปที่ 5 แสดงผลของ Cation (Mg^{2+}) ต่อการขนส่งอิเล็กตรอนของระบบแสงที่ 2 (พืชที่ใช้คือคลอโรพลาสต์ของอังงาบฝรั่ง)



HQ = Hyddroquinone

FeCN = Potassium Ferricyanide

$Na_2S_2O_4$ = Sodium dithionite

รูปที่ 6 แสดงสเปกตราของไซโตโครม บีเอฟ คอมเพลกส์ ซึ่งประกอบด้วย ไซโตโครม เอฟ (HQ-FeCN) และไซโตโครม บี 563 ($Na_2S_2O_4$-HQ)

บทที่ 4

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

ไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์เป็นกลุ่มของไปลีเปนไทด์ ที่ฝังตัวอยู่ภายในเยื่อไทลาคอยอด์ทำหน้าที่รับและส่งอิเล็กตรอนระบบแสงที่ 1 และระบบแสงที่ 2 ของกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง(5) พบว่าไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์ที่พบในคลอโรพลาสต์นี้มีลักษณะคล้ายไซโตโครมบีซี-1คอมเพลกส์ที่พบในไมโตคอนเดรีย คือประกอบด้วยไซโตโครมชนิด บี 2 โมเลกุล ไซโตโครมชนิด ซี 1 โมเลกุล และองค์ประกอบซึ่งเป็นโมเลกุลซึ่งมีเหล็กเป็นองค์ประกอบแต่ไม่ใช่ฮีมอีกหนึ่งโมเลกุลที่เหลือจะมีไปลีเปปไทด์ และไขมันมารวมตัวกันเป็นคอมเพลกส์(4) ไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์มีการวางตำแหน่งให้อยู่ในระบบแสงที่หนึ่ง และระบบแสงที่สองนั้นก็เนื่องจากค่ามาตรฐานศักย์รีดอกส์(Standard redox potential) การทำงานที่แท้จริงของไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์ที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ประจักษ์ชัดได้มีความพยายามแยกไซโตโครมคอมเพลกส์โดยใช้สารสกัด(10)แต่ให้ความบริสุทธิ์ต่ำมีคลอโรฟิลล์และโปรตีนอื่นๆ เป็นจำนวนมาก การเปลี่ยนสารสกัดเป็นวิธีการอันหนึ่งในการรักษาสภาพการทำงานของคอมเพลกส์เอาไว้ นอกจากนี้การเลือกชนิดของพืชที่นำมาทดลองก็เป็นส่วนหนึ่งในการที่จะแยกคอมเพลกส์ที่มีองค์ประกอบที่สมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพในการรับและส่งต่ออิเล็กตรอนได้ดี ดังนั้นในการทำการวิจัยในครั้งนี้จึงจำเป็นต้องเลือกพืชที่หาได้ง่าย และขึ้นอยู่ทั่วไป หรือพืชที่หาซื้อได้สะดวกมาทำการวิจัย โดยเริ่มการทดลองต้องมีการวัดประสิทธิภาพของการขนส่งอิเล็กตรอนของพืชชนิดต่างๆ ก่อนเพื่อเปรียบเทียบกัน โดยนำพืชเหล่านั้นมาเตรียมคลอโรพลาสต์ชนิดแตก พืชที่นำมาทดลองได้แก่ ผักคะน้า, ผักแว่น, หญ้าคา, ผักตบชวา, เปล้าน้อย, อังกาบฝรั่ง, ผักกาดหอม จากการทดลองพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบแสงต่างๆ ของคลอโรพลาสต์ในพืชต่างชนิดกันแล้วพบว่าผักกาดหอมและผักตบชวาให้อัตราการขนส่งอิเล็กตรอนที่สูงมากในทุกระบบแสงโดยเฉพาะผักกาดขาวซึ่งให้ผลการขนส่งอิเล็กตรอนที่สูงและ การเตรียมคลอโรพลาสต์ได้ง่ายเนื่องจากไฟเบอร์ของพืชชนิดนี้ไม่เหนียว สำหรับผักตบชวามีอุปสรรคอย่างมากในการเตรียมคลอโรพลาสต์เนื่องจากองค์ประกอบของใบมีความเหนียวมาก ดังนั้นจึงได้นำคลอโรพลาสต์ของผักกาดขาวมาเตรียมเยื่อไทลาคอยด์เพื่อทำการแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์ และทำการทดลอง ในการวิจัยครั้งนี้เป็นส่วนใหญ่ จากผลของการวัดการขนส่งอิเล็กตรอนในผักกาดขาวได้ผล คือ 120.8 ไมโครโมลออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมงในระบบแสงที่ 2, 180 ไมโครโมลออก-

ซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมงในระบบแสงที่ 1 และ 120 ไมโครโมลของออกซิเจนต่อมิลลิกรัมคลอโรฟิลล์ต่อชั่วโมง ในสองระบบต่อเนื่องกัน(ตารางที่ 1) นอกจากนี้เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าเยื่อไทลาคอยด์ที่เตรียมได้เป็นเยื่อไทลาคอยด์ที่สมบูรณ์ซึ่งทดลองได้โดยการเติม NH_4Cl ซึ่งเป็นสารแยกการควบคู่(uncouplers) และพบว่าการขนส่งอิเล็กตรอนในทุกระบบเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน(ตามตารางที่ 1) ยิ่งไปกว่านั้นเพื่อที่จะให้ผลการขนส่งอิเล็กตรอนในทุกระบบของการสังเคราะห์ด้วยแสงเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดจึงได้ทำการทดลองใส่เคทไอออนลงไป(cation) ซึ่งผลการทดลองเป็นการยืนยันว่ารเคทไอออน เช่น Mg^{2+} ประมาณที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้น 20 μM จะทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนมีประสิทธิภาพสูงสุด (ดูรูปที่ 5)

เมื่อได้เยื่อไทลาคอยด์จากพืชที่มีประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ด้วยแสงสูงแล้วจึงนำมาทำการสกัดไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์โดยใช้ Octylglucoside เป็นสารชักฟอกโดยทำการทดลองโดยการใช้สารชักฟอกในความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 10 mM, 20 mM, 30mM และ 40 mM ตามลำดับ(ดูตารางที่ 2) จากผลของการใช้สารสกัด Octyl-glucoside ในขนาดความเข้มข้นต่างๆ กันนี้พบว่าอัตราส่วนของ OD_{563}/OD_{652} ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดแสงของไซโตโครมบี-563 ที่อัลฟาแบน (α-band) กับค่าการดูดแสงของคลอโรฟิลล์(คลอโรฟิลล์เอ และบี) ผลการทดลองในตารางที่ 2 ใช้เยื่อไทลาคอยด์จากผักตบชวาให้ค่าความเข้มข้นของสารสกัด Octylglucoside ความเข้มข้น 10 mM โดยดูจากตารางที่ 2 คือค่า OD_{563}/OD_{652} มีค่าเป็น 0.70 อันเป็นค่าสูงสุดไม่ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของO ctylglucoside ขนาดเท่าใด(ในการทดลองใช้ถึง 40 mM) เช่นเดียวกันเมื่อทดลองกับผักตบชวาแล้วได้ทำการทดลองกับผักกาดขาวโดยการทดลองในลักษณะเดียวกันคือเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของ octylglucoside ในการสกัดไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์จากเยื่อไทลาคอยด์ของคลอโรพลาสต์ของผักกาดขาว(ดูตารางที่ 3) ผลการทดลองไม่เห็นความแตกต่างของการเพิ่มความเข้มข้นของ Octylglucoside เนื่องจาก OD_{563}/OD_{652} ไม่เปลี่ยนแปลงนั่นคือ 10 mM Octylglucoside เป็นขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์ จากผักกาดหอม

สำหรับการป้องกันการสลายตัวของโปรตีนในขณะที่ทำการแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์ออกจากเยื่อไทลาคอยด์ของผักกาดขาวนั้นได้นำเอาสารเคมีที่นิยมใช้กันมากในการยับยั้งเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการสลายตัวของโปรตีนคือ PMSF และ EDTA ทั้งนี้เนื่องจากมีผลการทดลองที่ผ่านมาซึ่งมีผู้รายงานว่าประสิทธิภาพของไซโตโครมบีเอฟคอม-เพลกส์ที่แยกด้วย Octylglucoside จะต่ำเหลือประมาณ 40 % ของประสิทธิภาพที่ควรเป็นสภาพที่มันฝังตัวอยู่ในเยื่อไทลาคอยด์(6) ทั้งนี้เป็นสาเหตุมาจากการที่ไซโตโครมบี 563

มักมีการตสลายตัวง่ายเนื่องจากเป็นไซโตโครมชนิดบี ผลจากการทดลองซึ่งปรากฏในตาราง ที่ 3 พบว่าการเติม PMSF และ EDTA ในระหว่างการสกัดไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์โดยใช้ Octylglucoside ในความเข้มข้นต่างๆ กันนั้นไม่มีผลต่ออัตราส่วนของ OD_{563}/OD_{652} แต่ประการใดเลยซึ่งเมื่อเป็นเช่นนี้ก็แสดงว่า PMSF และ EDTA ไม่มีผลต่อการแยกไซโตโครมคอมเพลกส์แต่ประการใดค่า OD_{563}/OD_{652}ดังนั้นการสกัดคอมเพลกส์ออกจากเยื่อไทลาคอยด์ด้วย Octylglucoside จึงไม่จำเป็นต้องเติมตัวยับยั้งเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน ซึ่งผลจากการทดลองพอสรุปได้ว่าการเตรียมไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์จากเยื่อไทลาคอยด์น่าที่จะเป็นกระบวนการและขั้นตอนในการปฏิบัติการคือต้องทำการแยกด้วยความรวดเร็วปราศจากแสงรบกวนและให้การทดลองอยู่ในสภาพเย็นอยู่ตลอดเวลา

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสิ่งเตรียมที่เตรียมได้เป็นไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์จริง จึงได้ทำการตรวจสอบสเปกตรัมของไซโตโครมเอฟ (554 นาโนมิเตอร์) บี563 (563 นาโนมิเตอร์)ซึ่งปรากฏในรูปที่ 6 การทำเช่นนั้นจำเป็นที่จะต้องเตรียมสารละลายของไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์เป็นจำนวนความเข้มข้นสูง(ตารางที่ 4)

โดยสรุปพบว่าการแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์จากพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากผักกาดขาวซึ่งซื้อหามาจากตลาดนั้นค่อนข้างมีความเปลี่ยนแปลงอย่างมากในแต่ละครั้งของการทดลอง เนื่องจากผักการขาวที่ซื้อมาจากตลาดในที่ต่างๆ ไม่สามารถควบคุมคุณภาพให้มีลักษณะเดียวกันตามที่ต้องการได้และปริมาณแป้งซึ่งเป็นอุปสรรคในการเตรียมเยื่อไทลาคอยด์บางครั้งก็มีจำนวนมาก การสกัดด้วย Octylglucoside เพื่อแยกไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์นั้นสามารถแยกคอมเพลกส์ออกมาได้บริสุทธิ์ขึ้น การที่จะแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นจะเป็นผลต่อคุณสมบัติของคอมเพลกส์ซึ่งจะลดลงตามความบริสุทธิ์ที่ต้องการมากขึ้น(10)และการแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นนั้นจำเป็นที่จะต้องใช้เครื่องมือตรวจสอบที่ซับซ้อนมากขึ้นอันได้แก่ Electron Paramagnetic Resonance Spectrophotometer และ Dual Wavelength Spectrophotometer ซึ่งหาได้ยากในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการเตรียมไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์จากผักกาดหอมที่เตรียมได้นับเป็นไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์ที่บริสุทธิ์ในระดับหนึ่งซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาการทำงานของคอมเพลกส์ซึ่งการทดลองนั้นอาจกระทำได้โดยการนำคอมเพลกส์สอดใส่เข้าไปองค์ประกอบของไขมันซึ่งทำหน้าที่คล้ายเยื่อเทียมและอาจจะอยู่ในรูปแบบของ Liposome ดังนั้นเมื่อไซโตโครมคอมเพลกส์เข้าไปอยู่ในรูปของ Liposome แล้วจะทำให้การศึกษาการทำงานของคอมเพลกส์ง่ายขึ้นไม่ว่าจะเป็นการขนส่งอิเล็กตรอน การปั๊มโปรตอนความเกี่ยวข้องของคอมเพลกส์กับวัฏจักรคิว (Q-cycle) (9) ซึ่งปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอนว่าทำงานในลักษณะใด นอกจากนี้ยังนำไปสู่การวางตัวของไซโตโครมบีเอฟคอมเพลกส์ในเยื่อไทลาคอยด์ได้ด้วย

บรรณานุกรม

1.- มณฑล สงวนเสริมศรี (๒๕๒๘) ชีวพลังงานศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.- มณฑล สงวนเสริมศรี (๒๕๓๒) การสังเคราะห์ด้วยแสง
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.- Arnon, D.I. (1949) Plant Physiol. 24, 1-15

4.- Gregory, R.R.F(1989) Biochemistry of Photosynthesis

5.- Hall, D.O. and Rao, K.K.(1986) Photosynthesis,
Fourth edition, Whitstable Litho ltd, Whitstable, Kent.

6.- Hurt, E and Hauska, G, (1981) Eur.J.Biochem. 174

7.- Nelson, N. and Neumann, J.(1969) J.Biol. Chem., 244,
1926, 1932.

8.- Nicholls, D.G.(1982) Bioenergetics, Academic Press,
London/Newyork.

9.- Mitchell, P.(1967) Fed. Proc. 26, 1370.

10.- Rolfe, S.A. Sanguansermsri, M. and Bendall, D.S.
(1987) Biochim. Biophy. Acta, 894, 434-442

11.- Sanguansermsir, M.(1982) PhD. Thesis, Electron-Transport
system of chlamydomonos chloroplasts, Darwin College,
University of Cambridge, England.