การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดโปรตีนจาก *Bombyx mori* และการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

COMPARATIVE STUDY OF PROTEIN EXTRACTION METHODS FROM *Bombyx mori* AND ANALYSIS BY SDS-PAGE

ศิริญากร กาทอง[1], เอกวิทย์ ตรีเนตร[1,*], อัจฉรา แกล้วกล้า[1] และ สิริวัฒน์ บุญชัยศรี[2]

Siriyakorn Kathong[1], Ekawit Threenet[1,*], Achara Kleawkla [1] and Siriwat Boochaisri[2]

[1] *สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290*

[2] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000*

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน: เอกวิทย์ ตรีเนตร อีเมล: ekawit73@hotmail.com

บทคัดย่อ:

การศึกษาโปรตีนจาก *Bombyx mori* ด้วยกระบวนการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพและการทำความเข้าใจกลไกทางชีวเคมี อย่างไรก็ตาม การสกัดโปรตีนจาก *Bombyx mori* ซึ่งมีองค์ประกอบที่ซับซ้อนทั้งไคติน ไขมัน และสารรบกวนอื่น ๆ ยังคงเป็นความท้าทายสำคัญในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (เอสดีเอส-เพจ) ที่ต้องการโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดโปรตีนจาก *Bombyx mori* ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ (1) การตกตะกอนด้วยกรดไทรคลอโรอะซิติก-อะซีโตน (ทีซีเอ อะซิโตน เอ็กซ์แทรกชัน) (2) การสกัดด้วยไทโอยูเรีย และ (3) การสกัดด้วยฟีนอล โดยโปรตีนที่สกัดได้จากแต่ละวิธีถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอสดีเอส-เพจเพื่อประเมินปริมาณ ความบริสุทธิ์ และรูปแบบการกระจายตัวของโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากทั้งสามวิธี พบว่าวิธี การตกตะกอนด้วยกรดไทรคลอโรอะซิติก-อะซีโตน การสกัดด้วยไทโอยูเรีย และ การสกัดด้วยฟีนอล ให้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ย 21.24 ± 7.34, 15.67 ± 3.84 และ 13.13 ± 3.83 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ทั้งสามวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอสดีเอส-เพจที่ความเข้มข้น 240 ไมโครกรัมต่อหลุม พบว่าวิธีการสกัดด้วยไทโอยูเรีย ตรวจพบแถบโปรตีนได้มากที่สุด (21 แถบ) รองลงมาคือ วิธี ทีซีเอ อะซิโตน เอ็กซ์แทรกชัน (17 แถบ) ในขณะที่วิธีการสกัดด้วยฟีนอล ไม่พบแถบโปรตีน อย่างไรก็ตาม วิธีการสกัดด้วยไทโอยูเรีย พบปัญหาการลากยาวของพื้นหลังอย่างรุนแรง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 240–600 ไมโครกรัมต่อหลุม ส่งผลให้ไม่สามารถแยกแถบโปรตีนบางชนิดได้อย่างชัดเจน การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมพบว่า 240 ไมโครกรัมต่อหลุมเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับวิธีทีซีเอ อะซิโตน เอ็กซ์แทรกชัน เนื่องจากให้แถบโปรตีนที่คมชัดและปราศจากปัญหาการลากยาวของพื้นหลัง ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าวิธีทีซีเอ อะซิโตน เอ็กซ์แทรกชันเป็นวิธีการสกัดโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนจาก *Bombyx mori* ด้วยเทคนิคเอสดีเอส-เพจ เนื่องจากให้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงและรูปแบบแถบโปรตีนที่ชัดเจน เหมาะสำหรับการวิเคราะห์เชิงลึกด้วยเทคนิคขั้นสูง เช่น แมสสเปกโทรเมทรี ในขั้นตอนต่อไป

คำสำคัญ : การสกัดโปรตีน โปรตีโอมิกส์ เอสดีเอส-เพจ

Abstract:

The study of proteins from *Bombyx mori* through proteomic analysis is of great importance for the discovery of biomarkers and for understanding the biochemical mechanisms. However, protein extraction from

Bombyx mori, which contain complex components such as chitin, lipids, and other interfering substances, remains a major challenge in sample preparation for sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), a technique that requires highly purified proteins. This study aimed to compare the efficiency of three protein extraction methods from *Bombyx mori* (1) trichloroacetic acid–acetone precipitation (TCA–acetone extraction) (2) thiourea extraction and (3) phenol extraction. Proteins obtained from each method were subsequently analyzed using SDS-PAGE to evaluate protein yield, purity and band distribution patterns. The average protein concentrations obtained from the TCA–acetone, thiourea and phenol extraction methods were 21.24 ± 7.34, 15.67 ± 3.84 and 13.13 ± 3.83 µg/µL, respectively. No statistically significant differences were observed among the three methods ($p > 0.05$). SDS-PAGE analysis performed at a loading concentration of 240 µg per lane revealed that the thiourea extraction method detected the highest number of protein bands (21 bands), followed by the TCA–acetone extraction method (17 bands), whereas the phenol extraction method failed to detect any visible protein bands. However, the thiourea extraction method exhibited severe background smearing, particularly at protein loadings of 240–600 µg per lane, which compromised the clear resolution of certain protein bands. Optimization studies indicated that 240 µg per lane was the optimal concentration for the TCA–acetone extraction method, as it provided sharp and distinct protein bands without background smearing. Overall, these findings demonstrate that the TCA–acetone extraction method is the most suitable protein extraction for *Bombyx mori* when analyzed by SDS-PAGE technique, as it yields high-purity proteins and clear banding patterns. This method is therefore appropriate for downstream advanced analyses technique, such as mass spectrometry.

Keywords: Protein extraction, Proteomics, SDS-PAGE