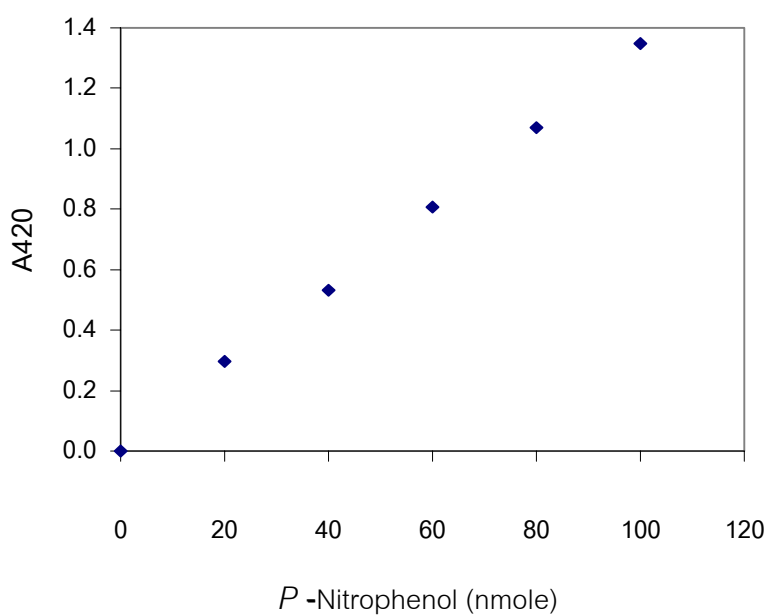


### 3. ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 3.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ในซีรัม

##### 3.1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน *p*-nitrophenol

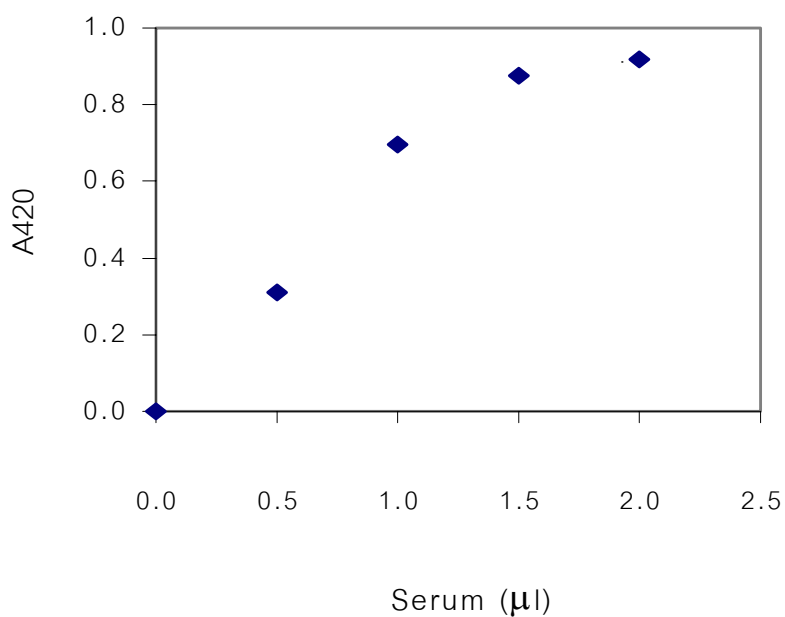
ในการใช้ 0.5 mM *p*-nitrophenol ปริมาณต่าง ๆ เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 และ 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (A420) พบว่าค่า A420 แปรผันเป็นเส้นตรงกับ *p*-nitrophenol ในช่วง 0-100 nmole ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐาน *p*-Nitrophenol

### 3.1.2 การหาปริมาณแอนไทม์ที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตี

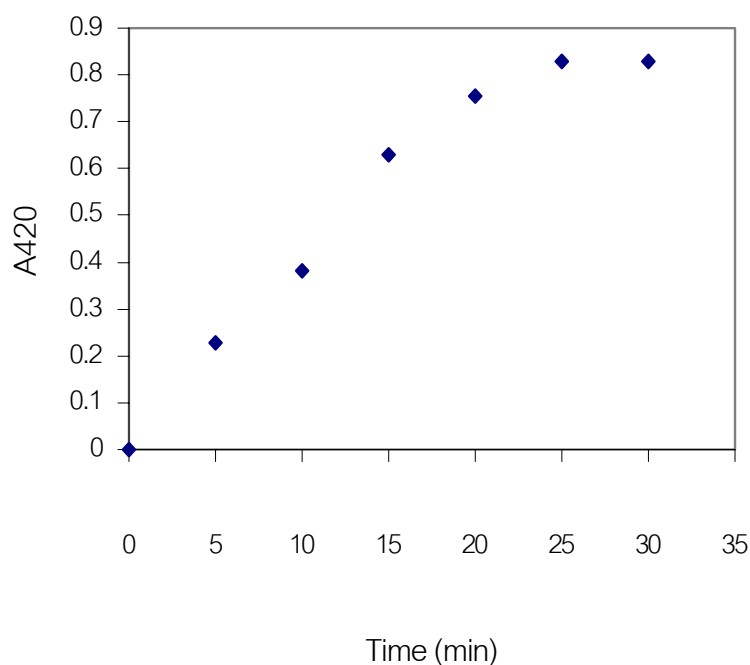
เมื่อนำซีรัมไปเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ด้วยอัตราส่วน 1:10 จากนั้นใช้ซีรัมเจือจาง ปริมาตรตั้งแต่ 0-20 ไมโครลิตร ไปหาแอกทิวิตี พบว่าค่า A420 เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามปริมาณซีรัมที่ใช้ จนเพิ่มสูงสุดที่ 1.5 ไมโครลิตร และเริ่มคงที่ (รูปที่ 5) ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเจือจางซีรัมเป็น 1:20 และใช้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งเท่ากับปริมาณซีรัม 1.25 ไมโครลิตร



รูปที่ 5 ปริมาณแอนไทม์ที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตี

### 3.1.3 การหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

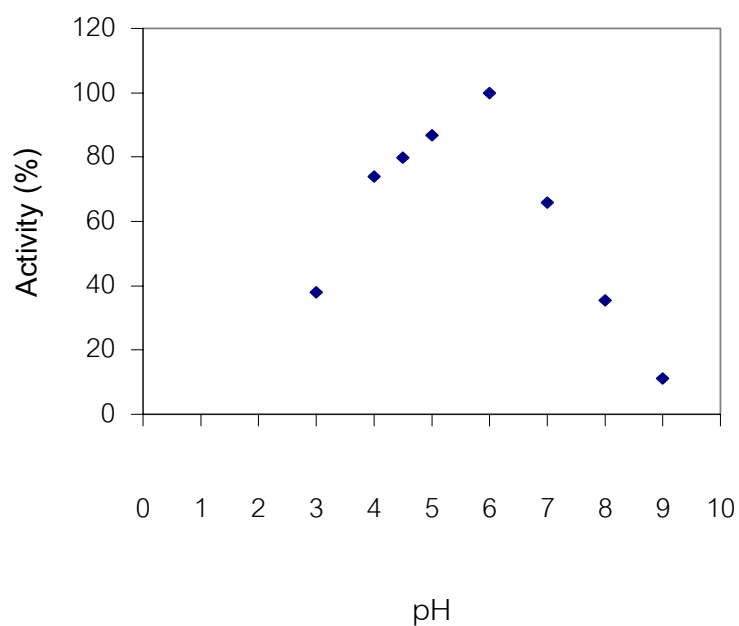
ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ในซีรัมที่ pH 6.0 ณ อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-30 นาที พบว่าเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ค่า A420 เพิ่มขึ้นด้วย แต่ค่า A420 จะเริ่มคงที่ที่เวลา 20 นาทีขึ้นไป ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ยังเป็นเส้นตรงคือที่ 15 นาที (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 เวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

### 3.1.4 การหา pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

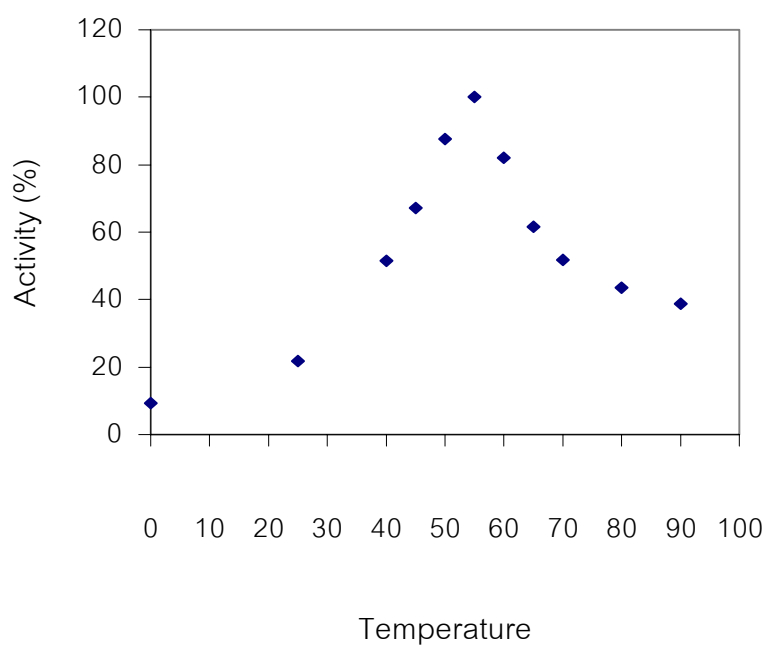
จากการใช้ซีรัม 1:20 ไปหาแอกทิวิตีในช่วง pH 3-9 ตามวิธีการข้อ 2.4.3 พบว่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase มีค่าต่ำที่ pH 3 (37%) มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ใน pH ช่วง 4-5 และมีแอกทิวิตีที่สูงที่สุดที่ pH 6 (100%) จากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ลดลงจนมีแอกทิวิตีที่น้อยที่สุดที่ pH 9 (11%) ดังแสดงผลในรูปที่ 7



รูปที่ 7 pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

### 3.1.5 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-90 °C พบว่าเอนไซม์ NAGase มีแอกทิวิตีที่ต่ำสุดที่อุณหภูมิ 0 °C (9%) มีค่าเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิในช่วง 25-50 °C และสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 °C (100%) จากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ลดลงตามลำดับจนมีค่าน้อยที่สุดที่ 90 °C (38%)



รูปที่ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์

จากการทดลองทั้งหมดนี้พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase คือใช้ซีรัมในการวิเคราะห์ 1.25 ไมโครลิตร ทำใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 15 นาทีและใช้ *p*-nitrophenol ในช่วง 0-100 nmole ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน แต่เนื่องจากการทดลองส่วนใหญ่ได้ทำการวัดแอกทิวิตีที่ 50 °C ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้ทั้งหมดจึงทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °C

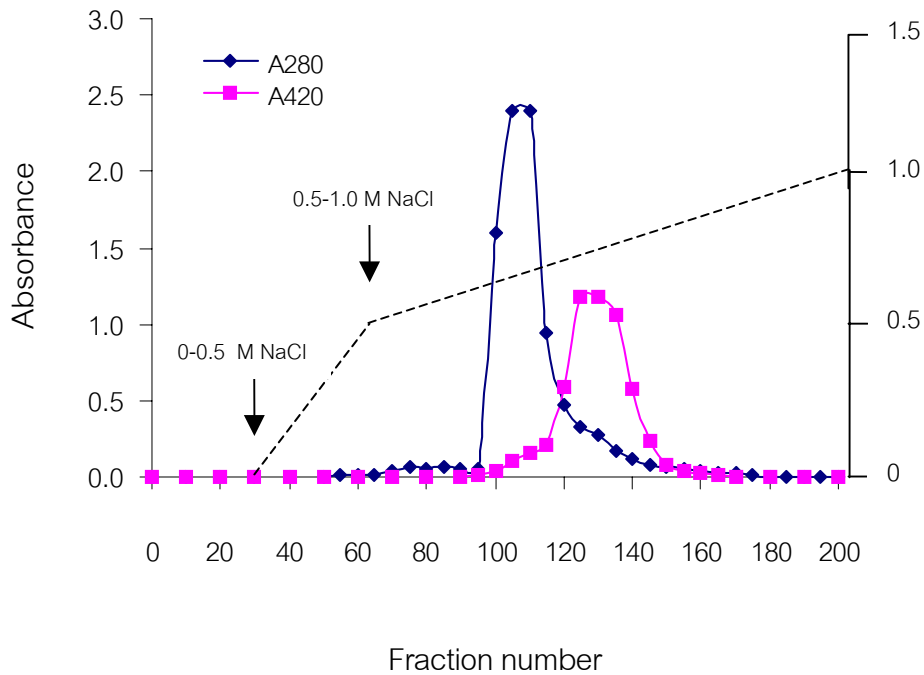
### 3.1.6 การหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ในซีรัม

วัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase โดยใช้ 5 mM *p*NP-NAG เป็น สับสเตรทใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลผลิต *p*-nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้ *p*-nitrophenol ที่ความเข้มข้น 0-100 nmole เป็นสารมาตรฐาน กำหนดให้แอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase 1 หน่วย (unit) เท่ากับ ปริมาณ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้น 1 nmole ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 1 นาที พบว่าเอนไซม์ NAGase ในซีรัมมีแอกทิวิตีจำเพาะ (specific activity) อยู่ในช่วง 30-50 nmol/min/mg protein

## 3.2 การทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากซีรัม

### 3.2.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เมื่อนำซีรัมปริมาตร 4.8 มิลลิลิตร (โปรตีน 676.8 มิลลิกรัม) มีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ NAGase เท่ากับ 20.6 nmol/min/mg protein ไปทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 0-0.5 M พบว่าไม่มีทั้งโปรตีนและแอกทิวิตีของเอนไซม์ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ เมื่อชะคอลัมน์ต่อดัวย 0.5-1.0 M NaCl ที่เตรียมในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาเป็นพีค (peak) เดียว และเอนไซม์ถูกชะออกมาในบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.73 M (รูปที่ 9) เมื่อรวมหลอดที่มีแอกทิวิตีสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นและไดแอลซ์ พบว่าสารละลายเอนไซม์เข้มข้นมีปริมาณโปรตีน 5.12 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.76% ของซีรัมโปรตีนเริ่มต้น และมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase เป็น



### รูปที่ 9 การแยกเอนไซม์ NAGase จากซีรัมด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

นำซีรัม 4.8 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 676.8 มิลลิกรัม) ไปแยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.6 x 9 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร จนค่า A280 เป็นศูนย์แล้วชะด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 0-0.5 M ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นชะต่อด้วย 0.5-1.0 M NaCl ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร

50 เท่าของซีรัมเริ่มต้น (ตารางที่ 1) แต่เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ nondenaturing PAGE พบว่ามีโปรตีนปรากฏอยู่ประมาณ 6 แถบ แสดงว่ายังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ ดังแสดงผลในรูปที่ 10 แถวที่ 3 ซึ่งในงานวิทยานิพนธ์นี้กำหนดแต่ละแถบโปรตีนทั้ง 6 แถบ เป็นแถบที่ 1-6

จากผลการทดลองนี้ เอนไซม์ NAGase จากซีรัมของกุ่มแซบวัยจับกับคอลัมน์ DEAE-Sephacel แน่นกว่าเอนไซม์ NAGase จากแหล่งอื่น โดยถูกชะออกจากคอลัมน์โดย NaCl ที่ความเข้มข้น 0.73 M เอนไซม์ NAGase ของกุ่มมังกรหรือเอนไซม์บริสุทธิ์จากสมองของวัวถูกชะออกมาจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ที่ความเข้มข้น 0.52-0.64 M NaCl หรือ 0.3-0.4 M NaCl ตามลำดับ (Lynn, 1990; Overdijk *et al.*, 1981) ในขณะที่เอนไซม์ NAGase จากม้ามของหนูถูกชะออกจากคอลัมน์ DEAE-Cellulose ที่ความเข้มข้น 0.1-0.25 M NaCl (Dennis and Hart, 1994) แม้การแยกเอนไซม์ NAGase ของกุ่มด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จะยังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนมากับเอนไซม์ แต่สามารถกำจัดโปรตีนออกไปได้ถึง 99% มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 50 เท่าของซีรัมเอนไซม์เริ่มต้น (ตารางที่ 1) ดังนั้นคอลัมน์ DEAE-Sephacel จึงเหมาะสำหรับใช้แยกเอนไซม์ NAGase จากซีรัมของกุ่มแซบวัยในขั้นต้นแรก

### 3.2.2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-200

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ซึ่งมีโปรตีน 4.86 มิลลิกรัม ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค แต่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase เพียงพีคเดียวในช่วงหลอดที่ 70-95 โดยหลอดที่ 85 เป็นหลอดที่มีแอกทิวิตีสูงสุด ดังแสดงผลในรูปที่ 11 เมื่อทำการรวมสารละลายหลอดที่มีแอกทิวิตีสูงเข้าด้วยกัน พบว่าแอกทิวิตีจำเพาะมีค่าเป็น 8,793 nmol/min/mg protein และมีโปรตีน 0.366 มิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase คิดเป็น 425 เท่าของซีรัมเริ่มต้น (ตารางที่ 1) แต่เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดย nondenaturing PAGE พบว่ายังมีแถบโปรตีน 4 แถบ คือแถบที่ 1, 3, 4 และ 5 (รูปที่ 10 แถวที่ 4) เมื่อเทียบกับแบบแผนโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนแยกด้วยคอลัมน์นี้ พบว่าคอลัมน์ Sephadex G-200 สามารถกำจัดโปรตีนแถบที่ 2 และ 6 ออกไปได้



ตารางที่ 1 การทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากซีรัม

Purification step	Protein		Activity			Purification fold
	mg	%	unit	%	unit/mg	
Serum	676.8	100	13,989.5	100	20.6	1
DEAE-Sephacel eluate	5.120	0.760	5,237.8	37.44	1,023	50
Sephadex G-200 eluate	0.366	0.054	3,223.2	23.04	8,793	425
NAcGlc-agarose eluate*	0.236	0.035	2,844.5	20.33	12,024	582
Con A-Sepharose eluate*	0.104	0.015	1,685.1	12.05	16,160	782
NAcGal-agarose eluate*	0.092	0.014	2,784.8	19.91	30,375	1,470
Preparative PAGE I*	0.035	0.005	1,166.8	8.34	33,226	1,607
Preparative PAGE II	0.004	0.001	181.2	1.30	40,000	1,935

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3-5 การทดลอง

\* ทำการแยกต่อจากคอลัมน์ Sephadex G-200

unit = nmol/min

**รูปที่ 10** แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลายเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ ที่ย้อมด้วยสีคумаซีบลู (A) ย้อมแบบซิลเวอร์ (B) และย้อมแอกทิวิตี (C)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 ซีรัม

แถวที่ 3 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ DEAE-Sepharose

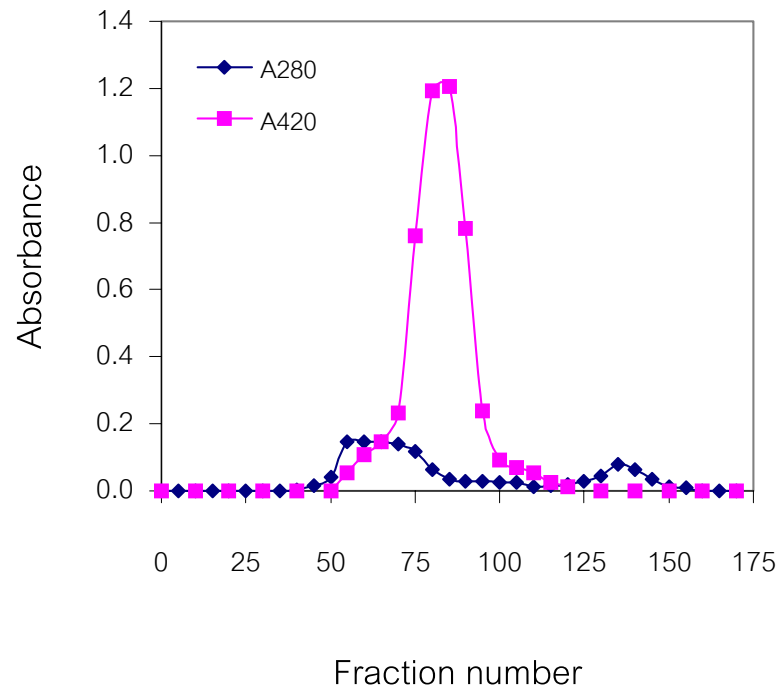
แถวที่ 4 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ Sephadex G-200

แถวที่ 5 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ Con A-Sepharose

แถวที่ 6 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ NAcGal-agarose

แถวที่ 7 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 1

แถวที่ 8,9 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2



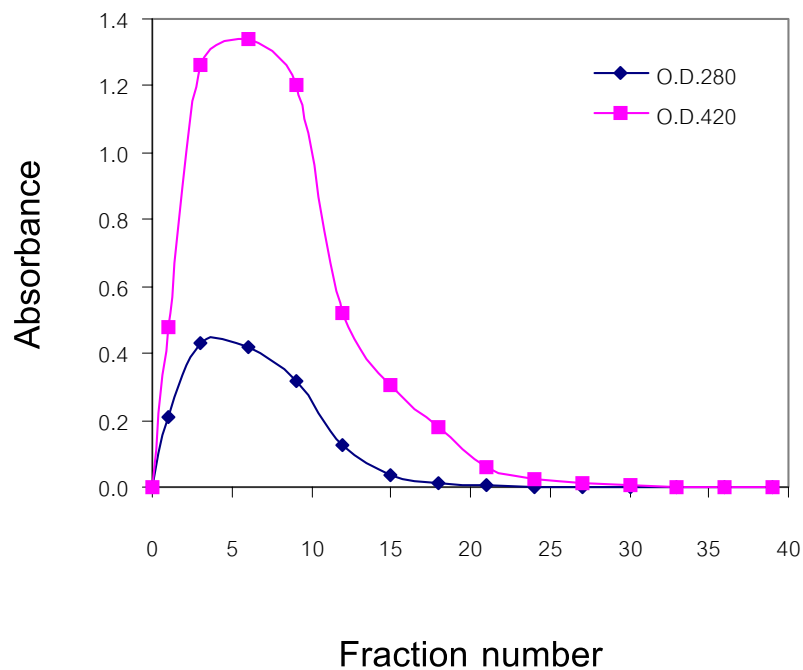
**รูปที่ 11 การแยกสารละลายเอนไซม์ NAGase ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200**

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ปริมาณโปรตีน 4.86 มิลลิกรัม ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.6 x 84 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF ด้วย อัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จนค่า A280 เป็นศูนย์

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ไปหาแถบโปรตีนของเอนไซม์ NAGase ใน nondenaturing PAGE ตามวิธีการข้อ 2.5.5 พบว่าเฉพาะโปรตีนแถบที่ 5 เท่านั้นที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ บ่งชี้ว่าโปรตีนแถบที่ 5 เป็นแถบของเอนไซม์ NAGase ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใน nondenaturing PAGE ประมาณ 72,500 ดัลตัน และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ยังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Lynn (1990) ที่พบว่าการใช้คอลัมน์ Sephadex G-50 ไม่สามารถแยกเอนไซม์ NAGase จากทางเดินอาหารของกิ้งมังกรออกจากโปรตีนอื่นได้หมด แต่ต่างจากของแอนตาร์คติกคริลล์ที่สามารถทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากโปรตีนอื่น ๆ ได้โดยคอลัมน์ Sephadex G-200 (Peters *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับคอลัมน์ Sephadex G-25 ที่สามารถแยกเอนไซม์ NAGase จากสมองของวัวได้ (Overdijk *et al.*, 1981) และสกัดเอนไซม์ NAGase จากม้ามของหนูบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Superose 12 (Dennis and Hart, 1994) ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ NAGase จากกิ้งแซบวียที่พบว่าไม่สามารถทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันได้ ถึงแม้ว่าจะเปลี่ยนเป็นเรซินชนิดอื่น เช่น Superdex 200 ดังนั้นการแยกเอนไซม์ NAGase ต่อด้วยวิธีนี้ยังไม่ได้เอนไซม์ NAGase ที่บริสุทธิ์ แต่ก็ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 425 เท่าของซีรัมเอนไซม์เริ่มต้น (ตารางที่ 1)

### 3.2.3 โดยคอลัมน์ N-Acetyl-D-glucosamine-agarose

จากการนำสารละลายเข้มข้นที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 (โปรตีน 366 ไมโครกรัม) ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ NAcGlc-agarose โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ในคอลัมน์นาน 24 ชั่วโมง ก่อนล้างคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF พบว่าเอนไซม์ถูกล้างออกมาในช่วงแรกโดยไม่จับกับคอลัมน์ (รูปที่ 12) เมื่อรวมหลอดที่มีแอกทิวิตีสูงเข้าด้วยกัน พบว่ามีแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 12,024 nmol/min/mg protein และมีปริมาณโปรตีน 236 ไมโครกรัม มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase เป็น 582 เท่าของซีรัมเริ่มต้น เพิ่มขึ้นจากสารละลายเอนไซม์ก่อนบ่มด้วยคอลัมน์ (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่าแม้เอนไซม์จะไม่จับกับคอลัมน์ แต่มีโปรตีนอื่นบางส่วนจับกับคอลัมน์จึงทำให้ความบริสุทธิ์ของ



**รูปที่ 12 การแยกสารละลายเอนไซม์ NAGase ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ด้วยคอลัมน์ N-Acetyl-D-glucosamine-agarose**

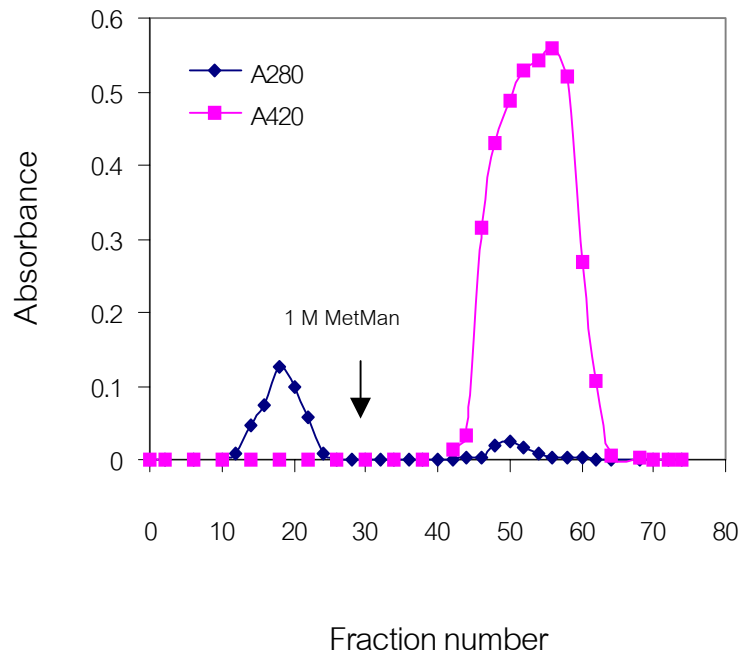
นำสารละลายเข้มข้นจากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาณโปรตีน 116 ไมโครกรัม ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ NacGlc-agarose (1.4 x 4 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TBS-PMSF ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

เอนไซม์ NAGase เพิ่มขึ้นจาก 425 เท่าเป็น 582 เท่าของซีรัมเริ่มต้น เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ nondenaturing PAGE พบยังมีโปรตีน 4 แถบ ในทำนองเดียวกับสารละลายเอนไซม์ก่อนแยกด้วยคอลัมน์นี้ (รูปที่ 10 แถวที่ 4) แสดงให้เห็นว่าคอลัมน์ NAcGlc-agarose ไม่สามารถแยกเอนไซม์ NAGase ออกจากโปรตีนอีก 3 แถบได้ ซึ่งต่างจากการทดลองของ Nok และคณะ (2001) พบว่าการใช้คอลัมน์ NAcGlc-agarose สามารถแยกเอนไซม์ NAGase ออกจากโปรตีนอื่นในพิษของงูอัฟริกัณฑ์ได้

### 3.2.4 โดยคอลัมน์ Concanavalin A-Sepharose 4B

จากการทดสอบการจับของเอนไซม์ NAGase กับ Con A-Sepharose 4B โดยการบ่มซีรัม 20 ไมโครลิตรกับ Con A-Sepharose 4B 400 ไมโครลิตร นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างเรซินด้วยบัฟเฟอร์ TBS-CaMg 800 ไมโครลิตร ตามวิธีการข้อ 2.6.5.1 พบว่าเอนไซม์ในซีรัมจะจับกับเรซินได้ 81% เมื่อทดสอบการชะเอาเอนไซม์ออกจากเรซินโดยน้ำตาล MetMan ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า MetMan ที่ความเข้มข้น 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M, 1.0 M และ 1.2 M จะชะเอนไซม์ออกจากเรซินได้ 45.0, 69.4, 70.2, 80.4 และ 83.0% ตามลำดับ จึงเลือกใช้ 1.0 M MetMan ในการชะเพราะจะชะได้มากถึง 80.4% และเป็นการประหยัดน้ำตาลกว่าการใช้ 1.2 M

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (โปรตีน 366 ไมโครกรัม) ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Con A-Sepharose 4B (ปริมาตรเรซิน 10 มิลลิลิตร) โดยบ่มสารละลายในคอลัมน์นาน 5 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย TBS-CaMg จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์ พบว่ามีโปรตีนถูกล้างออกมา 1 พีค แต่ไม่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ จากนั้นบ่มคอลัมน์ด้วย 1 M MetMan นาน 24 ชั่วโมง แล้วชะต่อด้วย TBS-CaMg พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาเพียงพีคเดียวและมีแอกทิวิตีของเอนไซม์ (รูปที่ 13) เมื่อรวมหลอดที่มีแอกทิวิตีสูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นและไดแอไลซ์ พบว่าสารละลายโปรตีนที่แยกได้มีปริมาณโปรตีน 104 ไมโครกรัม คิดเป็น 0.015% ของซีรัมโปรตีนเริ่มต้น (ตารางที่ 1) และมีแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ NAGase เป็น 16,160 nmol/min/mg protein มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ เป็น 782 เท่าของซีรัมเริ่มต้น แต่จากการทำ nondenaturing PAGE ดังแสดงผลในรูปที่ 10 แถวที่



**รูปที่ 13 การแยกสารละลายเอนไซม์ NAGase ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ด้วยคอลัมน์ Concanavalin A-Sepharose 4B**

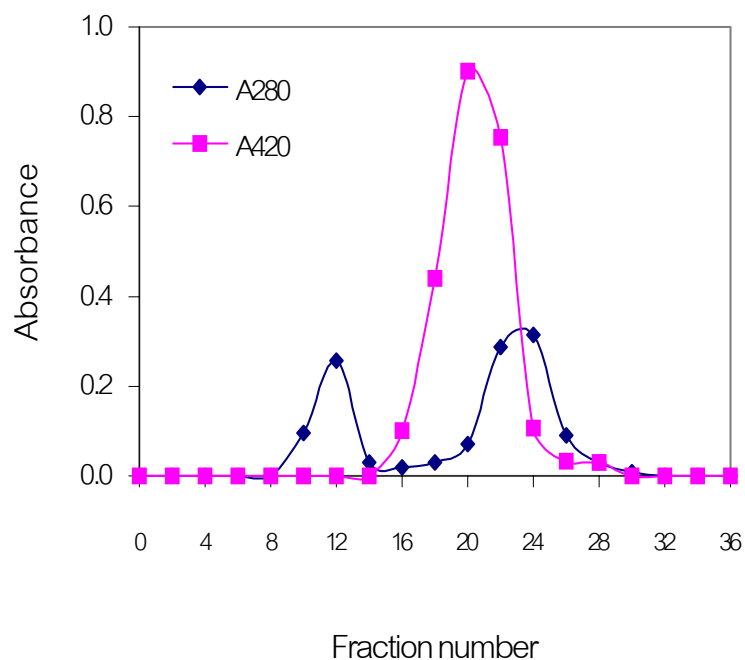
เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาณโปรตีน 116 ไมโครกรัม ไปบ่มในคอลัมน์ Con A-Sepharose 4B (1.6 x 5 เซนติเมตร) นาน 5 ชั่วโมง ล้างคอลัมน์ด้วย TBS-1 mM CaCl<sub>2</sub> -1 mM MgCl<sub>2</sub> ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จนค่า A280 เป็นศูนย์ แล้วบ่มคอลัมน์ต่อด้วย 1 M methyl-  $\alpha$ -D-mannose (MetMan) นาน 24 ชั่วโมง ทำการล้างคอลัมน์ต่อด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหลและเก็บแต่ละหลอดปริมาตรเท่าเดิม

5 พบยังมีโปรตีนปรากฏอยู่ 4 แถบ คือแถบที่ 1, 3, 4 และแถบที่ 5 ซึ่งเป็นเอนไซม์ NAGase แสดงว่าคอลัมน์ Con A-Sepharose ยังไม่สามารถกำจัดโปรตีนแถบที่ 1, 3 และ 4 ออกจากเอนไซม์ได้ แม้จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Dennis และ Hart (1994) ที่พบว่าการใช้คอลัมน์แบบจำเพาะชนิดนี้ไม่สามารถแยกเอนไซม์ NAGase จากน้ำของหนูกอกจากโปรตีนอื่นได้หมด เช่นเดียวกับที่ไม่สามารถแยกเอนไซม์ NAGase จากส่วนต่าง ๆ ของแอนตาร์คติกคริลล์, จากเซลล์ไข่ของหนูไฮนิสแฮมสเตอร์, จากสมองของวัวและตับของคนออกจากโปรตีนอื่นได้หมด (Perters *et al.*, 1998; Zhao and Neufeld, 2000; Overdijk *et al.*, 1981; Sasaki *et al.*, 1991) ดังนั้นการแยกเอนไซม์ NAGase ออกจากโปรตีนอื่นด้วยวิธีการนี้จึงยังไม่ได้เอนไซม์ NAGase ที่บริสุทธิ์

### 3.2.5 โดยคอลัมน์ N-Acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine-agarose

เมื่อแยกสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200 แล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (โปรตีน 366 ไมโครกรัม) โดยคอลัมน์ NAcGal-agarose (ปริมาตรเรซิน 6 มิลลิลิตร) จากการล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค และเอนไซม์ถูกล้างออกมาในช่วงปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ คือในหลอดที่ 18-24 (รูปที่ 14) โดยมีแอกทิวิตีที่ถูกชะออกมาคิดเป็น 86.4% ของเอนไซม์ที่ใส่ในคอลัมน์ หรือ 19.91% ของซีรัมเริ่มต้น และมีแอกทิวิตีที่จำเพาะเป็น 30,375 nmol/min/mg protein คิดความบริสุทธิ์เป็น 1,470 เท่าของซีรัมเริ่มต้น ใช้คอลัมน์นี้แยกเอนไซม์ได้ดีเพราะมีความบริสุทธิ์เพิ่มจากคอลัมน์ Sephadex G-200 ถึง 3.5 เท่า ดังแสดงผลในตารางที่ 1 แต่เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ nondenaturing PAGE พบยังมีโปรตีน 3 แถบ คือแถบที่ 3, 4 และ 5 (แถบเอนไซม์) บ่งชี้ว่ายังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ แต่คอลัมน์นี้สามารถกำจัดโปรตีนแถบที่ 1 ออกไปจากสารละลายเอนไซม์ได้





รูปที่ 14 การแยกสารละลายเอนไซม์ NAGase ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ด้วยคอลัมน์ N-Acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine-agarose

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ปริมาณโปรตีน 93 ไมโครกรัมไปแยกต่อกับคอลัมน์ NAcGal-agarose (1.4 x 4 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จนค่า A280 เป็นศูนย์

### 3.2.6 โดย Preparative PAGE ครั้งที่ 1

จากการนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ไปแยกต่อโดย preparative PAGE โดยตัดเฉพาะแถบโปรตีนของเอนไซม์ NAGase เพียงแถบเดียว (โปรตีนแถบที่ 5 ในรูปที่ 10 แถวที่ 4) แล้วชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลตามวิธีการข้อ 2.6.6 นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้น หาปริมาณโปรตีนและหาแอกทิวิตี พบว่าสารละลายที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีน 35 ไมโครกรัม และมีแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 33,226 nmol/min/mg protein คิดความบริสุทธิ์เป็น 1,607 เท่าของซีรัมเริ่มต้น เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดย nondenaturing PAGE พบโปรตีนแถบที่ 3, 4 และ 5 (เอนไซม์) ซึ่งยังมีโปรตีนแถบที่ 3 และ 4 ปนเปื้อนอยู่ แต่เห็นแถบของเอนไซม์ (แถบที่ 5) ชัดขึ้น ดังแสดงผลในรูปที่ 10 แถวที่ 7

### 3.2.7 โดย Preparative PAGE ครั้งที่ 2

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 1 ไปแยกต่อโดย preparative PAGE ครั้งที่ 2 โดยตัดเฉพาะแถบโปรตีนในช่วงแถบของเอนไซม์ NAGase เพียงแถบเดียวอีกครั้ง แล้วชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลในทำนองเดียวกัน พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้มีปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัม มีแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 40,000 nmol/min/mg protein คิดความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase เป็น 1,935 เท่าของซีรัมเริ่มต้น และจากการทำ nondenaturing PAGE พบโปรตีนเพียงแถบเดียว (รูปที่ 10 แถวที่ 8) เมื่อนำไปย้อมแอกทิวิตีตามข้อ 2.5.6.1 พบว่าโปรตีนแถบนี้มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ (รูปที่ 10 แถวที่ 9) แสดงว่าโปรตีนแถบนี้เป็นเอนไซม์ NAGase และการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 สามารถแยกเอนไซม์ได้บริสุทธิ์

### 3.3 การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ NAGase

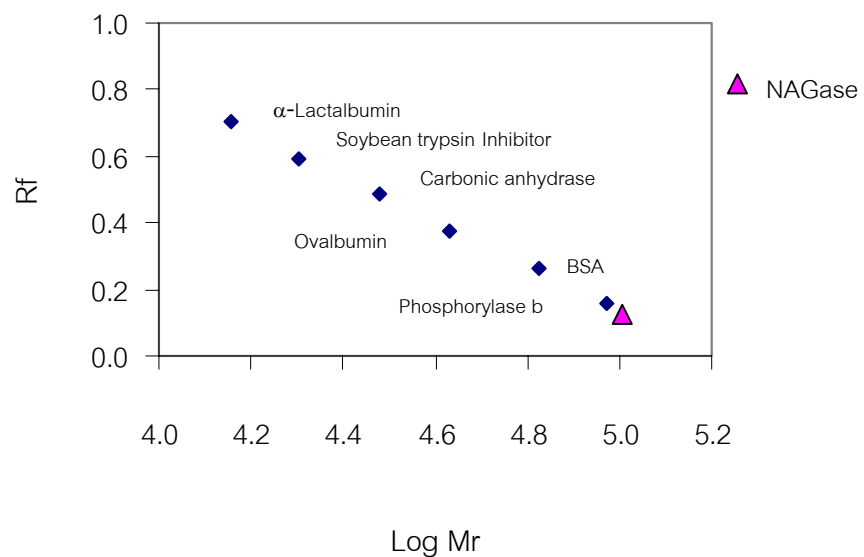
#### 3.3.1 แบบแผนโปรตีนใน PAGE

จากการทำ nondenaturing PAGE ของเอนไซม์ NAGase ที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียว (รูปที่ 10 แถวที่ 8) เมื่อนำไปย้อมแอกทิวีที่ตามข้อ 2.5.6.1 พบว่าแถบแอกทิวีที่ของเอนไซม์เพียงแถบเดียวเช่นกัน (รูปที่ 10 แถวที่ 9) แสดงว่าโปรตีนที่แยกได้เป็นเอนไซม์ NAGase ที่บริสุทธิ์

ในทำนองเดียวกันเมื่อนำเอนไซม์ NAGase ที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 ไปทำ SDS-PAGE ปรากฏโปรตีน 3 แถบ (รูปที่ 15A แถวที่ 2) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 97,700, 84,100 และ 70,800 ดัลตัน เมื่อนำไปย้อมแอกทิวีที่ตามข้อ 2.5.6.2 ปรากฏแถบแอกทิวีที่ของเอนไซม์เพียงแถบเดียว ดังแสดงผลในรูปที่ 15A แถวที่ 3 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 97,700 ดัลตัน (รูปที่ 15B) จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์ NAGase ที่แยกได้อาจจะยังไม่บริสุทธิ์โดยมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนซึ่งตรวจหาไม่ได้จากการทำ nondenaturing PAGE หรืออาจเกิดจากการที่เอนไซม์ NAGase ถูกย่อยสลายไปบางส่วนทำให้มีโปรตีนอื่น 2 แถบ ปรากฏใน SDS-PAGE ซึ่งอาจสูญเสียแอกทิวีที่ไปจึงย้อมไม่ติดสีในรูปที่ 15A แถวที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase ที่ทำใน nondenaturing PAGE (72,500 ดัลตัน) กับใน SDS-PAGE (97,700 ดัลตัน) พบว่ามีค่าต่างกันพอสมควร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ใน nondenaturing PAGE ไม่ได้ขึ้นกับขนาดโมเลกุลอย่างเดียวเหมือนใน SDS-PAGE โดยยังขึ้นกับประจุสุทธิและรูปร่างด้วย แต่ถึงแม้ว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase ในการทำทั้ง 2 วิธี ต่างกัน แต่ก็ยังพอบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์นี้ไม่มีหน่วยย่อย ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ NAGase จากกุ่มมังกร อีพิเดอร์มิสของบูปิดเดลอร์และจากอินทีกูเมนต์ของแมลงหวี่ ที่ไม่มีหน่วยย่อยและมีน้ำหนักโมเลกุล 116,000 89,000 และ 100,000 ดัลตัน ตามลำดับ (Lynn, 1990; Zou and Fingerman, 1999; Spindler, 1976) หรือเอนไซม์ของเชื้อรา *P. blakesteanus* (Cohon, 1986) และจากเซลล์ไข่ของหนูไฮนิสแฮมสเตอร์ (Zhao and Neufeld, 2000) ที่ไม่มีหน่วยย่อยและมีน้ำหนักโมเลกุล 72,000 และ 83,000 ดัลตัน ตามลำดับ แต่ต่างจากการทดลองของ Nok และ

A

B



รูปที่ 15 แบบแผนโปรตีนใน SDS-PAGE และ blot ของ เอนไซม์ NAGase ซึ่งได้จากการทำ Preparative PAGE ครั้งที่ 2 (A) และกราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุล (B)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 ที่ย้อมด้วยสี Amido black B

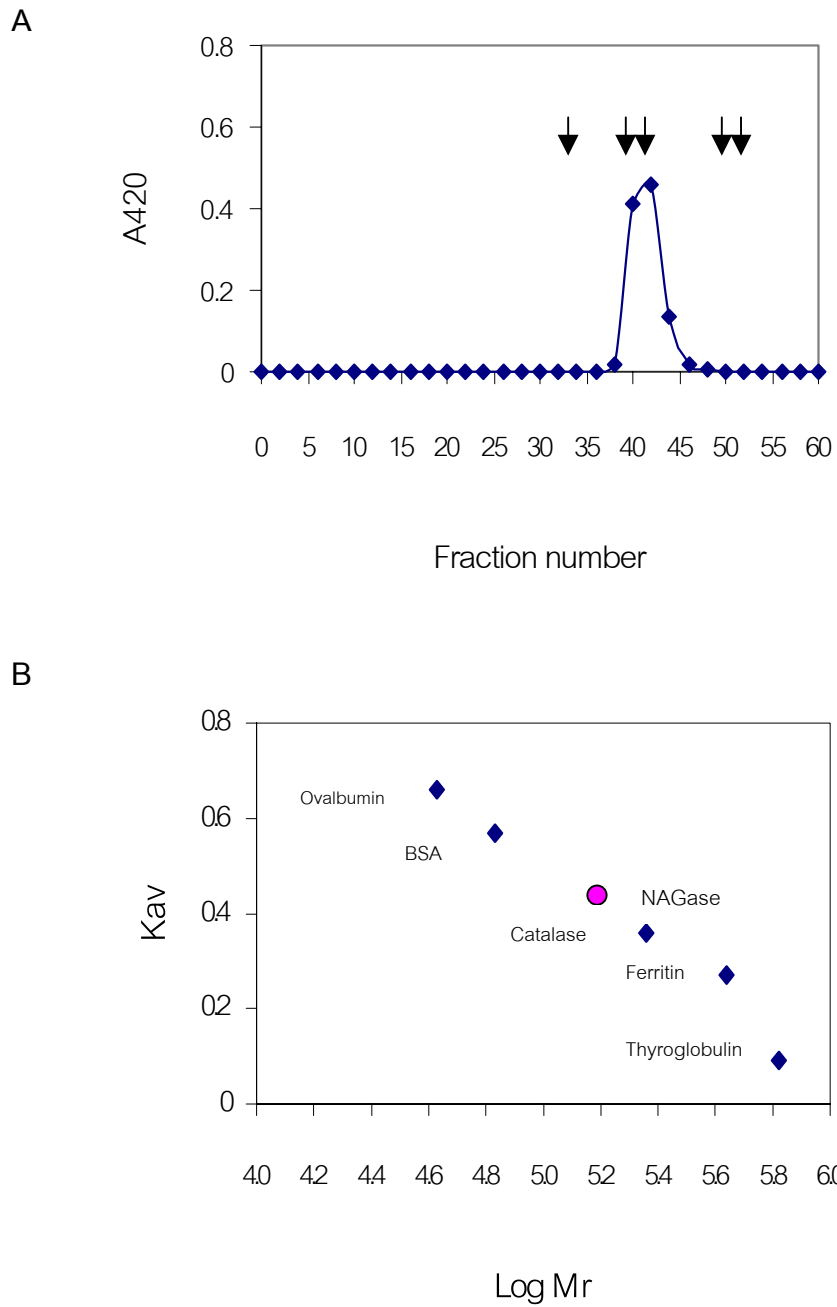
แถวที่ 3 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 ที่ย้อมแอสทิวรี

คณะ (2001) ที่พบว่าเอนไซม์ NAGase จากพิษของงูอัฟริกัณัพพ์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 51,000 ดัลตัน ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์จากม้ามที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 54,000 ดัลตัน (Dennis and Hart, 1994)

### 3.3.2 น้ำหนักโมเลกุล

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase ที่แยกได้จากทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR10/30 พบว่ามีพีคแอกทิวิตีที่ถูกระบายออกมาเพียงพีคเดียว แต่หาพีคโปรตีนไม่ได้เพราะมีปริมาณต่ำมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $K_{av}$  ของโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์ NAGase มีน้ำหนักโมเลกุล 107,000 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 16 ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์จากงูมังกกรและจากพิษของงูอัฟริกัณัพพ์มีน้ำหนักโมเลกุล 116,000 ดัลตัน และ 102,000 ดัลตัน ตามลำดับ (Lynn, 1990; Nok *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับการทดลองของ Dennis และ Hart (1994) พบเอนไซม์จากม้ามของคนมีน้ำหนักโมเลกุล 106,000 ดัลตัน ต่างจากเอนไซม์ NAGase ในเชื้อรา *B. bassiana* และตับของหนู ซึ่งพบมีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 ดัลตันและ 43,000 ดัลตัน ตามลำดับ (Havukkala *et al.*, 1993; Aronson *et al.*, 1989) ส่วนการทดลองของ Sasaki และคณะ (1991) ยังพบเอนไซม์ NAGase ในตับของคนมีน้ำหนักโมเลกุล 300,000 ดัลตัน

นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ที่หาโดยคอลัมน์ Superdex 200 (107,000 ดัลตัน) ยังมีค่าใกล้เคียงกับการหาใน SDS-PAGE (97,700 ดัลตัน) ซึ่งช่วยยืนยันว่าเอนไซม์นี้ไม่มีหน่วยย่อย

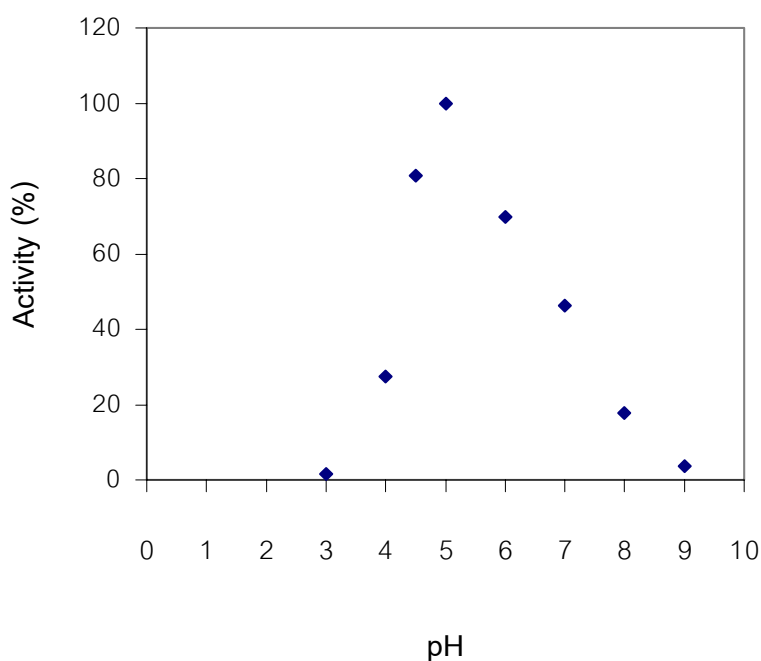


รูปที่ 16 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase โดยคอลัมน์ Superdex 200 (A) และกราฟมาตรฐาน (B)

T = Thyroglobulin; F = Ferritin; C = Catalase; B = BSA; O = Ovalbumin

### 3.3.3 ผลของ pH

เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์เร่งปฏิกิริยาได้แตกต่างกันในสารผสมปฏิกิริยาที่มี pH แตกต่างกันตั้งแต่ pH 3-9 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์มีแอกทิวิตีที่ต่ำสุดที่ pH 3.0 (1%) มีค่าแอกทิวิตีที่เพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH ในช่วง 4.0-4.5 และสูงที่สุดที่ pH 5.0 (100%) จากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ลดลงเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้นจนมีแอกทิวิตีที่น้อยสุดที่ pH 9.0 (3%) ดังแสดงผลในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ผลของ pH ต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase

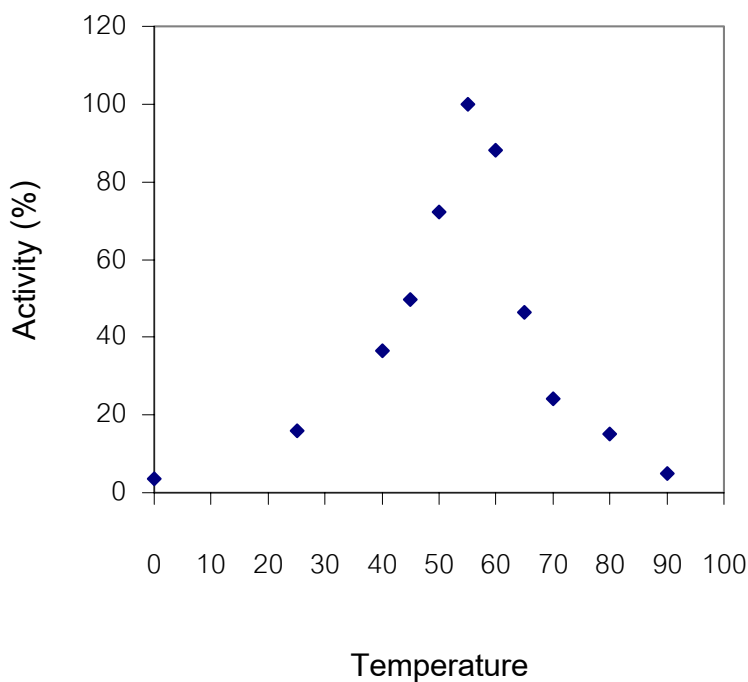
เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ซึ่งต่างจากเอนไซม์นี้ในซีรัมที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 (รูปที่ 7) อาจจะเป็นเพราะมีสารบางชนิดในซีรัมที่มีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 6.0 และสารนี้ถูกกำจัดไปในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์

จากผลการทดลอง พบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์มีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5.0 ใกล้เคียงกับเอนไซม์ NAGase ที่พบจากแหล่งต่าง ๆ เช่น จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* พบเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 5.0 (Cohon, 1986) ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ NAGase จากอินทิมูเนนที่ของตั๊กแตน *L. migratoria* และแมลงหวี่ *D. hydei* ที่มีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 4-5 และ pH 5.5-6.2 ตามลำดับ (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976) เอนไซม์จากฮีโมลิมพ์ของ *B. glabrata* มีแอคติวิตีสูงที่ pH 5.5-6.5 (Zelck et al., 1996) จากตับและอิพิเดอริมิสของปูฟิเดเดลอร์ พบเอนไซม์มีแอคติวิตีสูงที่ pH 5-6 (Zou and Fingerman, 1999) จากการทดลองของ Esaiassen และคณะ (1992) และการทดลองของ Overdijk และคณะ (1981) พบเอนไซม์ NAGase จากตับของกุงนอร์ทเทิร์นมีแอคติวิตีสูงที่ pH 4-6 และจากรกของคนพบเอนไซม์ NAGase มีแอคติวิตีสูงที่ pH 5-7 ตามลำดับ ต่างจากการทดลองของ Deane และคณะ (1998) พบเอนไซม์ NAGase จากรา *T. harzianum* มีแอคติวิตีสูงที่สุดที่ pH 3.5 และจากการทดลองของ Overdijk และคณะ (1981) พบเอนไซม์ NAGase จากสมองของวัวมีแอคติวิตีสูงที่ pH 6-7



### 3.3.4 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ โดยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน นาน 15 นาที หลังจากหยุดปฏิกิริยา และวัดค่า A420 พบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์มีแอกทิวิตีต่ำสุดที่อุณหภูมิ 0 °C (3%) มีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในช่วง 25-50 °C และสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 °C (100%) จากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ลดลงตามลำดับเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 55 °C จนมีค่าน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 90 °C (รูปที่ 18)

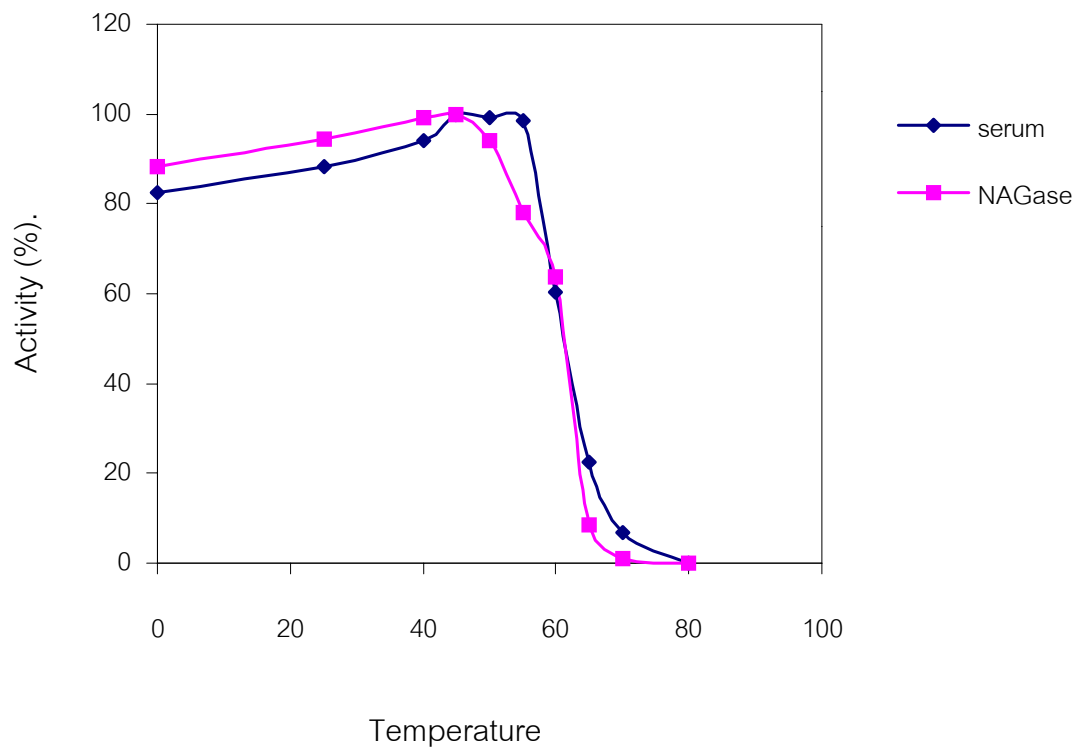


รูปที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์และเอนไซม์ในซีรัมของกิ้งแชบ๊วย (รูปที่ 17 และ 8) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 °C เช่นเดียวกับเอนไซม์ NAGase จากตับและอีพิเดอร์มิสของปูฟิดเดลอร์และจากตับของกิ้งนอร์ทเทิร์นที่มีแอกทิวิตีที่สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50-60 °C (Zou and Fingerman, 1999) และ 50-55 °C (Esaiassen *et al.*, 1992) ตามลำดับ และใกล้เคียงกับเอนไซม์ NAGase จากอินทิกูเมนต์ของแมลงหี *D. hydei* และจากตับของคนที่มีแอกทิวิตีที่สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °C (Spindler, 1976; Sasaki *et al.*, 1991) แต่ต่างจากเอนไซม์จากอินทิกูเมนต์ของตั๊กแตน *L. migratoria* ซึ่งมีแอกทิวิตีที่สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 70 °C (Zielkowski and Spindler, 1978) หรือที่อุณหภูมิ 40 °C ของเอนไซม์ NAGase จากพิษของงูอัฟริกันพัพพี (Nok *et al.*, 2001)

### 3.3.5 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

ทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25-70 °C นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่บนน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปหาแอกทิวิตีเทียบกับเอนไซม์ซึ่งเก็บไว้ที่ 0 °C นาน 15 นาทีเช่นกัน พบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 25-50 °C และเริ่มมีแอกทิวิตีลดลงตามลำดับเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55-65 °C จนเสียแอกทิวิตีอย่างสมบูรณ์ที่ 80 °C ในทำนองเดียวกันเอนไซม์ในซีรัมของกิ้งแชบ๊วยก็ให้ผลคล้ายกัน แต่ที่อุณหภูมิ 55 °C ยังคงเสถียรมากกว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ (รูปที่ 19) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ NAGase มีโครงสร้างเป็นโปรตีนซึ่งถูกแปลงสภาพ (denature) ได้เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงทำให้สูญเสียแอกทิวิตี ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ NAGase จากอินทิกูเมนต์ของแมลงหี *D. hydei* ตับของกิ้งนอร์ทเทิร์น และอีพิเดอร์มิสของปูฟิดเดลอร์ พบว่าเอนไซม์มีแอกทิวิตีลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50-60 °C (Spindler, 1976; Esaiassen *et al.*, 1992; Zou and Fingerman, 1999) ต่างจากการทดลองของ Lynn (1990) และของ Cattaneo และคณะ (2002) ที่พบเอนไซม์ NAGase จากทางเดินอาหารของกิ้งมังกงและเมมเบรนของแมลงหี *D. melanogaster* มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 20-30 °C เท่านั้น



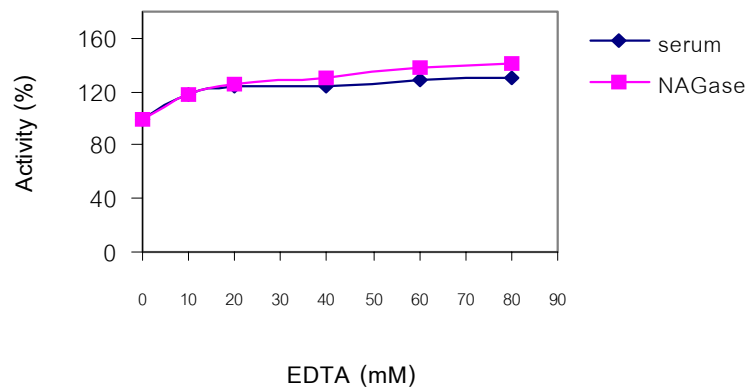
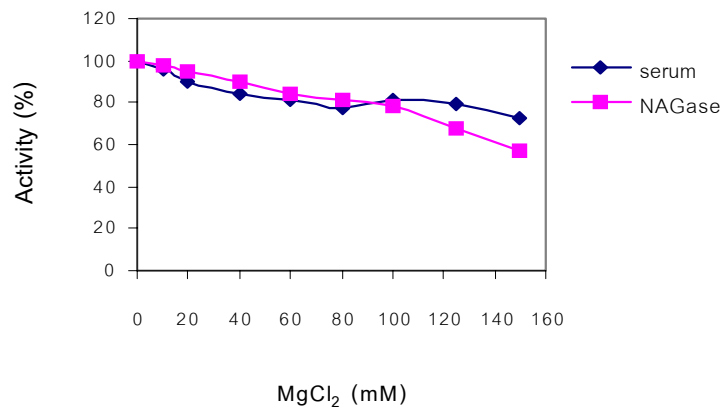
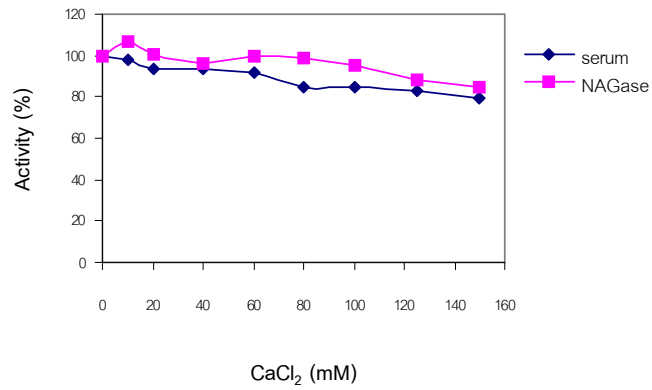
รูปที่ 19 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ NAGase

### 3.3.6 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

เมื่อทำการทดสอบเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์และเอนไซม์ในซีรัม โดยใช้ สับสเตรทต่าง ๆ กัน คือ 5 mM 4-methylumbelliferyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide, 5 mM *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, 5 mM N, N'-diacetylchitobiose และ 5 mM *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (*p*NP-NAG) พบว่าทั้งเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์และเอนไซม์ในซีรัมของกิ้งก่าบิวมีความจำเพาะกับ 5 mM *p*NP-NAG เพียงชนิดเดียว โดยมีแอกทิวิตีคิดเป็น 40,000 nmol/min/mg protein ในขณะที่การใช้สับสเตรทชนิดอื่นอีก 3 ชนิด ไม่มีค่าแอกทิวิตีเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sasaki และคณะ (1991) ที่พบว่าเอนไซม์จากตับของคนมีความจำเพาะกับ *p*NP-NAG เพียงชนิดเดียว ต่างจากเอนไซม์จากอินทิงูเมนท์ของ ตั๊กแตน *L. migratoria* และ แมลงหวี่ *D. hydei* ที่มีความจำเพาะกับสับสเตรท 2 ชนิด คือ *p*NP-NAG และ *p*-nitrophenyl- $\beta$ -N-acetyl galactosaminide (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976) เช่นเดียวกับการทดลองของ Cohon (1986) พบเอนไซม์ NAGase จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* มีความจำเพาะกับ *p*NP-NAG และ N, N'-diacetylchitobiose

### 3.3.7 ผลของ $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ และ EDTA

จากการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์และเอนไซม์ในซีรัม ในสารผสมปฏิกิริยาที่มี  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$  หรือ EDTA ความเข้มข้นระหว่าง 10-150 mM พบว่า  $Ca^{2+}$  มีผลยับยั้งแอกทิวิตีเล็กน้อย โดยยับยั้งมากขึ้นตามความเข้มข้นของ  $Ca^{2+}$  ที่เพิ่มขึ้น และยับยั้งได้ถึง 15.2% ที่ความเข้มข้น 150 mM ในทำนองเดียวกับ  $Mg^{2+}$  ยับยั้งแอกทิวิตีได้ถึง 42.5% ที่ความเข้มข้น 150 mM ในขณะที่ EDTA เพิ่มแอกทิวิตีของเอนไซม์ได้มากขึ้นตามเข้มข้นเช่นกันและเพิ่มถึง 37.9% ที่ความเข้มข้น 60 mM ดังแสดงผลในรูปที่ 20 ซึ่งผลการทดลองของ Dennis และ Hart (1994) พบว่า  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  และ  $Co^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 1 mM ไม่มีผลต่อค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase จากม้ามของหนู ต่างจากการทดลองของ Overdijk และคณะ (1981) พบว่า  $Fe^{2+}$  มีผลยับยั้งแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase จากสมองคนได้สูงสุด รองลงมาเป็น



รูปที่ 20 ผลของ  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ EDTA ต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase

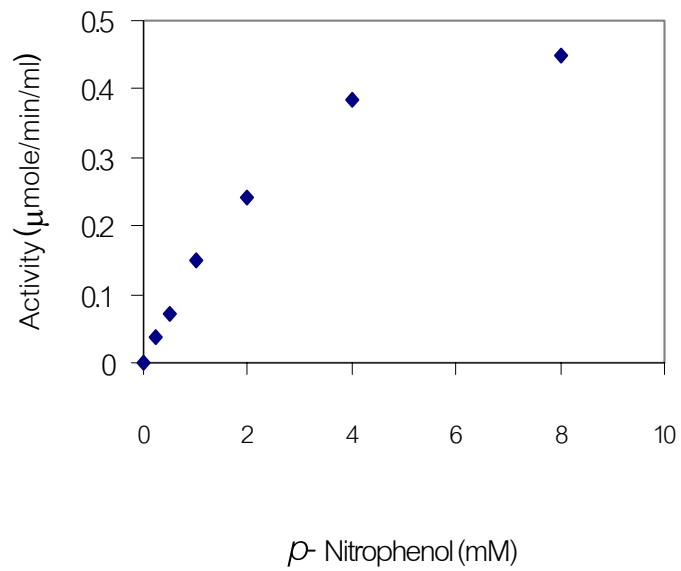
$Zn^{2+}$  และ  $Cu^{2+}$  ตามลำดับ ส่วนผลของ EDTA พบว่าต่างจากการทดลองของ Lynn (1990) เล็กน้อยซึ่งพบว่า EDTA ไม่มีผลต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase จากกุ้งมังกร

### 3.3.8 จลนศาสตร์

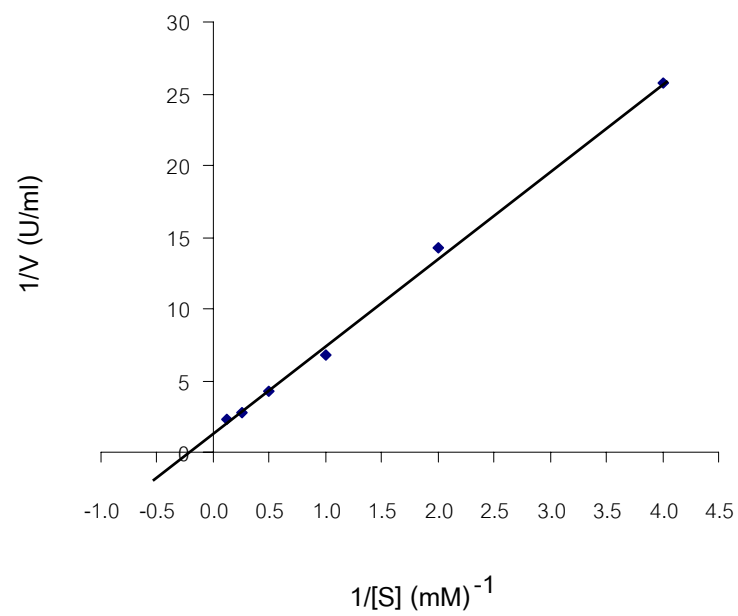
จากการศึกษาผลของสับสเตรท *p*NP-NAG ต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์โดยทำปฏิกิริยากับ *p*NP-NAG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 mM พบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์มีจลนศาสตร์แบบ hyperbola (รูปที่ 21A) และจากการหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  โดยการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า  $1/V$  และ  $1/[S]$  พบว่าเอนไซม์ NAGase มีค่า  $K_m$  สำหรับ *p*NP-NAG เท่ากับ 3.48 mM และ ค่า  $V_{max}$  เท่ากับ 5.58  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein

เอนไซม์ NAGase จากอินทิกูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* มีค่า  $K_m$  ต่อ *p*NP-NAG เท่ากับ 5 mM (Zielkowski and Spindler, 1978) และจากการทดลองของ Spindler (1976) พบเอนไซม์จากอินทิกูเมนท์ของแมลงหวี่ *D. hydei* มีค่า  $K_m$  ต่อ *p*NP-NAG เท่ากับ 5.7 mM ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ที่มีค่า  $K_m$  ต่อ *p*NP-NAG เท่ากับ 3.48 mM และมีค่าที่แตกต่างจากเอนไซม์ NAGase จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* และจากตับคนที่มีค่า  $K_m$  ต่อ *p*NP-NAG เท่ากับ 0.3 mM และ 0.13-0.2 mM ตามลำดับ (Cohon, 1986; Sasaki *et al.*, 1991)

A



B



รูปที่ 21 จลนศาสตร์ของเอนไซม์ NAGase แบบ Hyperbola (A) และแบบ Lineweaver-Burk (B)

### 3.4 การศึกษาบทบาทเบื้องต้นทางชีวภาพของเอนไซม์ NAGase

#### 3.4.1 บทบาทที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่

จากการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมและในสารสกัดจากตัวรังไข่และกล้ามเนื้อของกึ่งเพศเมียที่มีพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะที่ 1-4 ดังแสดงผลในตารางที่ 2 พบแอคติวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด โดยพบในระดับสูงที่สุด รองลงมาได้แก่รังไข่ สำหรับในกล้ามเนื้อและซีรัมมีค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ระดับแอคติวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ในตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด ไม่ได้แปรเปลี่ยนตามพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ระยะต่าง ๆ ดังนั้นการที่พบแอคติวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ในระดับสูงที่สุดแสดงถึงบทบาทของเอนไซม์นี้ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของกึ่งเช่นเดียวกับของสัตว์ทะเลอื่น ๆ อาทิเช่นเอนไซม์ NAGase ที่พบในระดับของกึ่งขาวและกึ่งลายเสือ (Le Chevalier and Van Wormhoudt, 1998; Koga *et al.*, 1996) หรือในทางเดินอาหารของกึ่งนอร์ทเทิร์น (Esaiassen *et al.*, 1992), *P. indicus* (Omondi and Stark, 1995) หรือของแมงกะพรุน (Nagai *et al.*, 1997)

สำหรับเอนไซม์ NAGase ของกึ่งแซบวียที่ศึกษาไม่น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ของรังไข่ เพราะปริมาณของเอนไซม์ที่แสดงแอคติวิตีในรังไข่ระยะต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจจะมีไว้เพื่อใช้ในการป้องกันไข่ เช่นเดียวกับเอนไซม์ NAGase ที่พบในคอร์ติคอลลากรานูลของไข่หอยเม่นซึ่งเมื่อเกิดการผสมพันธุ์จะถูกหลั่งออกมาจากกรานูลเพื่อไปจับกับ hyaline layer ของไข่และทำหน้าที่ป้องกันไข่ (Wessel *et al.*, 1987)

สำหรับการพบแอคติวิตีของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อยังไม่สามารถคาดเดาบทบาทได้แน่ชัด ในทำนองเดียวกับการพบเอนไซม์นี้ในซีรัมหรือฮีโมโกลินของกึ่งซึ่งไม่ได้อยู่ในระยะการลอกคราบ จึงไม่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ แต่ยังไม่สามารถบอกบทบาทของเอนไซม์ NAGase ในฮีโมโกลินของกึ่งในภาวะปกติทั้งที่ไม่มีอาการลอกคราบและไม่ได้ติดเชื้อก่อโรคได้





### 3.4.2 บทบาทที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อก่อโรคกุ้ง

จากการวัดระดับเอนไซม์ NAGase ในซีรัมหรือฮีโมลิมพ์ของกุ้งที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อ *V. harveyi* เทียบกับกุ้งที่ไม่ติดโรค เพื่อศึกษาบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของกุ้ง พบแอกทีวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อ *V. harveyi* สูงกว่ากุ้งที่ไม่ติดเชื้อก่อโรค 1.55 เท่า อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ( $p=0.001$ ) ดังแสดงผลในตารางที่ 3 ในขณะที่แอกทีวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ในซีรัมของกุ้งชุดควบคุมที่ไม่มีการติดเชื้อหลังการทดลองและก่อนการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน (1.05 เท่า) ผลการทดลองนี้แสดงถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแซบวัย ในทำนองเดียวกับการที่เอนไซม์ NAGase มีแอกทีวิตีสูงในฮีโมลิมพ์ของหอยทากน้ำจืด ปลาเรนโบว์เทราท์ และปลาเทอรียอบท ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรค โดยเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรคทำให้แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถทำงานได้ (Zelck *et al.*, 1996; Lindsay, 1986; Manson *et al.*, 1992) และสอดคล้องกับการทดลองของ Moroni และ Cuccuru (2001) ที่พบว่าในน้ำนมของแกะปกติมีระดับของเอนไซม์ NAGase ปริมาณต่ำแต่เมื่อมีการติดเชื้อที่ต่อมน้ำนมระดับของเอนไซม์มีปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหรือการที่พบเอนไซม์ NAGase มีแอกทีวิตีสูงในผู้ป่วยที่ไตถูกทำลายมากและมีการติดเชื้อ (Kang *et al.*, 2001)

ตารางที่ 3 แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งที่ฉีดเชื้อ  
*Vibrio harveyi*

Injection	Before injection		After injection		Fold
	Activity (nmol/min/ mg protein)	Infection	Activity (nmol/min/ mg protein)	Infection	
Control (0.9% NaCl)	17.26±0.70	-	*18.12±0.62	-	1.05
<i>Vibrio harveyi</i> ( $8.8 \times 10^4$ )	15.20±0.23	-	*23.56±0.30	+	1.55

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากกุ้งตัวอย่าง การทดลองละ 2-4 ตัว

\* เป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ( $p=0.001$ )

Infection = แสดงผลการติดเชื้อ *V. harveyi* ในตับ เมื่อ + = ติดเชื้อ; - = ไม่ติดเชื้อ

โดยฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* ตัวละ  $8.8 \times 10^4$  เซลล์

