รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การทำบริสุทธิ์ การศึกษาคุณสมบัติ และการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษา
ชีวโมเลกุลที่มีปริมาณน้อยของ neutral cytoplasmic phosphatase จาก
น้ำยางพารา

Purification, Characterization and Applications for Detecting Biomolecules
In Small Amount of Neutral Cytoplasmic Phoaphatase from Rubber Latex
(Hevea brasiliensis)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2537-2538

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

Neutral cytoplasmic phosphatase เป็นเอนไซม์ phosphatase ชนิดหนึ่งที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะ pH เป็นกลาง ซึ่งพบอยู่ในส่วนซี-ซีรัมของน้ำยางพารา สามารถแยกเอนไซม์ดังกล่าวออกมาได้โดยการนำซี-ซีรัมมาตกตะกอนโปรตีนด้วย acetone เย็นจัด ที่ความเข้มข้น 50-65 % ตามด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนกับ DEAE cellulose และเจลฟิวเตรชันโดยใช้ Sephadex G-100 ตามลำดับ เอนไซม์ที่แยกได้พบว่า มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.2 เท่า เมื่อเทียบกับในซี-ซีรัม โดยมีแอคติวิตีจำเพาะเป็น 0.084 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และคิดเป็นปริมาณสุทธิเท่ากับ 3.5% ของเริ่มต้น สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ได้ประมาณ 46,300 ดอลตัน โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพโปรตีน (SDS-PAGE) และ 67,608 ดอลตัน จากการทำเจลฟิวเตรชัน เอนไซม์นี้มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 6.8 และมีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 57 °ซ อัตราเร็วสูงสุดในการทำปฏิกิริยา (V_{max}) กับสับสเตรทคือ *p*-nitrophenyl phosphate ของเอนไซม์ชนิดนี้เท่ากับ 0.33 นาโนโมลต่อนาที และมีค่าสัมพรรคภาพของการรวมกันกับสับสเตรทดังกล่าว (K_m) เท่ากับ 0.952 mM พบว่า Mg^{2+} สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ดี ในขณะที่ molybdenum และ vanadium เป็นตัวยับยั้งที่รุนแรง ส่วน mercaptoethanol และ EDTA ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์นี้เลย เมื่อนำ neutral cytoplasmic phosphatase ที่เตรียมได้ไปติดฉลากกับแอนติบอดี แล้วนำคอนจูเกตที่ได้ไปทดสอบการใช้งานโดยวิธี ELISA และ immunoblotting พบว่า มีประสิทธิภาพในการใช้งานต่ำกว่าคอนจูเกตของ alkaline phosphatase ที่เตรียมขึ้นด้วยวิธีเดียวกัน

Abstract

A neutral cytoplasmic phosphatase which catalyzes the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) at optimum pH of 6.8 has been partially purified from the C-serum of *Hevea brasiliensis* latex by three steps of purification *i.e.* protein precipitation by chilled acetone at the concentrations between 50 and 65%, DEAE-cellulose ion-exchange chromatography and gel filtration on Sephadex G-100 column. However, the overall procedure results in only 3.2-fold enrichment of the phosphatase activity with a yield of about 3.5%. The enzyme preparation exhibits an apparent molecular weight of 46,300 Daltons on SDS-PAGE and 67,608 Daltons by gel filtration. It is relatively thermophilic with maximal activity observed at 57 °C. A K_m value of 0.9 mM is found for *p*-nitrophenyl phosphate at 37 °C. This enzyme is activated significantly by Mg^{2+} but is not affected by high concentration of either EDTA or mercaptoethanol. Both molybdate and orthovanadate act as potent inhibitors of the enzyme activity. The conjugate prepared by labelling anti-human IgG with this enzyme works less efficiently than the alkaline phosphatase conjugate prepared under the same method, when tested with ELISA and immunoblotting techniques.