เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์เอซินเทสในน้ำยางพารา

3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Synthase in *Hevea brasiliensis* Latex

สุรีย์ พีรภูติ

Suree Peeraputi

เลขหมู่ QK 898.C3 S1Y4 2539 ค.2
Bib Key 98160
19 ธ.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2539

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์เอซินเทสในน้ำยางพารา

ผู้เขียน นางสุรีย์ พีรภูติ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์)

..... กรรมการ
(ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์)

..... กรรมการ
(ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเชาว์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

หอสมุด กุนหญิงพระ อรรถกระวีสุพรรณ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
ได้รับ...
บัณฑิตวิทยาลัย 21
วันที่ 19 ธ.ค. 2543

.....
(ดร.ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริลโคเอนไซม์เอซินเทสในน้ำยางพารา

ผู้เขียน นางสุรีย์ พีรภูติ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

เอนไซม์ HMG-CoA synthase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในสัตว์ หรือสังเคราะห์ isoprene ในพืช ในการศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากน้ำยางพารา ได้ทดสอบสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์เพื่อจะหาภาวะที่เหมาะสมในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

HMG-CoA synthase มีมากที่สุดในส่วนของ ซี-ซีรั่มของน้ำยางพารา จึงได้นำส่วนของซี-ซีรั่มไปทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เอนไซม์ในซี-ซีรั่มสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 4 สัปดาห์ โดยความว่องไวลดลงประมาณร้อยละ 6 และไม่มี HMG-CoA lyase ในส่วนของซี-ซีรั่ม

การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ CM-cellulose, Gel filtration, DEAE-cellulose สามารถกำจัดโปรตีนออกเพียงบางส่วน (partially purified) และเมื่อนำ partially purified เอนไซม์ไปทำ SDS-PAGE ยังคงมีโปรตีนอื่น ๆ เหลืออยู่อีกหลายชนิด น้ำหนักโมเลกุลของ partially purified เอนไซม์ เมื่อใช้วิธี Gel filtration โครมาโตกราฟฟี่พบว่ามีค่า 58,600 ดาลตันเอนไซม์ที่สกัดจาก non SDS-PAGE gel ส่วนที่มีความว่องไวของเอนไซม์นี้เป็น monomer เพราะเมื่อถูกรีดิวซ์หรือไม่ถูกรีดิวซ์ด้วย 5 % เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล แล้วทำ SDS-PAGE ได้โปรตีนเพียงแถบเดียว น้ำหนักโมเลกุล 44,670 ดาลตัน

HMG-CoA synthase เป็นเอนไซม์ที่ไม่เสถียรในสภาวะที่เจือจางและมีเกลือ NaCl ความเข้มข้นสูงที่ 4 องศาเซลเซียส จะสูญเสียความว่องไวได้ง่าย กลีเซอรอล 30% ช่วยลดการเสียความว่องไวของเอนไซม์ได้ partially purified เอนไซม์จะถูกยับยั้งได้โดย 0.1 - 0.2 M NaCl ไดไธโอทรีทอล (10 mM) และ ไอโอโดอะเซตาไมด์ (30 mM) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งเอนไซม์ในซี-ซีรั่มและ partially purified เอนไซม์ได้เกือบหมด EDTA (0.1 mM)

ช่วยให้ความว่องไวของเอนไซม์สูงขึ้น แต่ถ้าใส่ แคทไอออน เช่น Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} ลงไปในขณะที่มี EDTAอยู่ด้วย ความว่องไวเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดยแคทไอออนเหล่านี้ SDS (3 mM) ยับยั้งการทำงานของ partially purified เอนไซม์ได้เกือบหมด acetoacetyl CoA ไม่มีผลต่อความว่องไวของ partially purified เอนไซม์ K_m ของ acetyl CoA เท่ากับ 1 mM ที่ acetoacetyl CoA ความเข้มข้น 0.05 mM

Thesis Title 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Synthase in *Hevea brasiliensis* Latex

Author Mrs. Suree Peeraputi

Major Program Biological Sciences

Academic Year 1995

Abstract

HMG-CoA synthase, an enzyme among others, plays a crucial role in the synthesis of cholesterol and isoprene in mammals and plants, respectively. In this work, effects of various chemical reagents, on the activity of the crude enzyme were investigated to probe the nature and hence the suitable conditions to purify the enzyme from the rubber latex.

Most of the enzyme is in the C-serum of the fractionated rubber latex and this fraction was used as the source of crude enzyme. No HMG-CoA lyase was found under our experimental conditions. The C-serum fraction can be kept at -70°C up to 4 weeks in which the enzyme activity decreased not more than 6%.

HMG-CoA synthase was purified by using CM-cellulose, Gel filtration and DEAE-cellulose chromatography. The partially purified enzyme contained several other proteins as shown by SDS-PAGE. The molecular weight of HMG-CoA synthase extracted from Non SDS-PAGE gel was 44,670 dalton as determined by SDS-PAGE while the molecular weight from gel filtration chromatography was 58,600 dalton. Since the patterns of SDS-PAGE of this enzyme performed with and without beta-mercaptoethanol were identical, it was concluded that the enzyme is in the monomeric form.

The activity of the crude HMG-CoA synthase decreased in dilute NaCl solution at 4°C. However, upon adding 30% glycerol, the activity was restored to its initial value. Partially purified enzyme also showed reduced activity when assayed in the presence of NaCl (0.1 and 0.2 M). DTT (10mM) and iodoacetamide (30mM) inhibited the activity of

both crude and the partially purified enzyme. EDTA (0.1 mM) increased the enzyme activity whereas cations such as Fe^{2+}, Mg^{2+} and Mn^{2+} inhibited. SDS (3 mM) totally inhibited the activity of partially purified enzyme. Acetoacetyl CoA had no effect on the activity of partially purified enzyme. K_m of acetyl CoA was 1.0 mM.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางการทำวิจัย การเขียนและการแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีตลอดมา ทำให้ผู้วิจัยได้รับความรู้อันเป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย ให้สำเร็จตามจุดประสงค์ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ดร.รพีพร โสตถิพันธุ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเชาว์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบ และให้คำแนะนำการเขียน ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาตราจารย์ ดร.สุรพงษ์ สุวจิตตานนท์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ อาจารย์ในภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้งานวิจัยดำเนินไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณเสาวรัตน์ นนทสอร คุณนวลสวาท ด่านวรนันท์ คุณปิยะนุช มัชบูลย์ เจ้าหน้าที่โสตทัศนศึกษา โรงพยาบาลหาดใหญ่ คุณเริ่มอรุณ รักเผือก และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมี ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ ขอขอบคุณอาจารย์อาภรณ์ สันตะโร คุณนพแก้ว เจริญทิพากร คุณวนิดา แซ่อึ่ง ที่ช่วยพิมพ์วิทยานิพนธ์ ให้สำเร็จลงด้วยความเรียบร้อย และขอขอบคุณ คุณสุนทร พีรภูติ เด็กชายปวีร์ พีรภูติ และน้องเจมส์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนผู้มีพระคุณและคณาจารย์ ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้แก่ผู้วิจัยจนได้มีโอกาสทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้สำเร็จ

สุรีย์ พีรภูติ

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	18
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	19
วัสดุ	19
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
3. ผลการทดลอง	42
4. วิจารณ์	80
5. สรุป	89
เอกสารอ้างอิง	91
ประวัติผู้เขียน	99

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1. HMG-CoA synthase ในส่วนของน้ำยางพารา 44
2. ผลของอุณหภูมิในการเก็บซี-ซีรั่มต่อความว่องไวของเอนไซม์ 45
3. ผลของระยะเวลาต่อความว่องไวของเอนไซม์ที่เก็บ ณ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส 46
4. ผลของ NaCl ต่อความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่ม 47
5. อิทธิพลของ NaCl ในซี-ซีรั่ม ที่เจือจางต่อความว่องไวของเอนไซม์ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน 49
6. ผลการแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์ขึ้น 51
7. ผลการแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนในซี-ซีรั่มด้วยอะซีโตนที่เย็น 56
8. ผลของ acetoacetyl CoA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ 60
9. ผลของไอโอโดอะเซตาไมด์ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ 63
10. ผลของไดไธโอทรีทอลต่อความว่องไวของเอนไซม์ 64
11. ผลของ NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ 65
12. ผลของ Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Fe^{2+} ต่อความว่องไวของเอนไซม์ 66
13 การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากตะกอนก้นหลอดของยางพาราให้บริสุทธิ์ขึ้น 79

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	ความสัมพันธ์ของ HMG-CoA กับปฏิกิริยาทั่วไปในเซลล์	4
2.	วิถีของ mevalonate ในเซลล์สัตว์	5
3.	การเปลี่ยนแปลงของ acetyl CoA ในไมโทคอนเดรียและไซโทพลาซึม	6
4.	วิถีการสร้างยาง	7
5.	น้ำยางสดภายหลังการปั่นแยกด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์	43
6.	การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่ม ให้บริสุทธิ์ โดยโครมาโตกราฟฟี่บนคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-75	52
7.	การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose	53
8.	การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟฟี่บนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 ด้วยโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น	55
9.	ความสัมพันธ์ระหว่างความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase กับปริมาณ ^{14}C-acetyl CoA	58
10.	Lineweaver-Burk plot แสดงการหาค่า K_m	59
11.	ผลของ pH ต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase	62
12.	ตำแหน่งของเอนไซม์ในอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบ ไม่มี SDS	68
13.	SDS เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ของซี-ซีรั่ม เอนไซม์ในส่วนที่ไม่จับกับ CM-cellulose เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 เอนไซม์ที่ผ่าน DEAE-cellulose เอนไซม์ที่แยกจากการสกัดเจลแบบไม่มี SDS	70
14	log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน	72
15	การชะโปรตีนและเอนไซม์จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-100	74
16	log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับค่า V_e/V_o ของโปรตีนมาตรฐาน	75

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
17	SDS โพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟเรซิสของเอนไซม์ที่ไม่ถูกรีดิวซ์ และถูกรีดิวซ์ด้วยเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล	77

ตัวย่อและสัญลักษณ์

A	=	absorbance
AACT	=	acetoacetyl CoA thiolase
ATP	=	adenosine - 5 - triphosphate
BSA	=	bovine serum albumin
cm	=	centimetre
CM-cellulose	=	carboxy methyl-cellulose
CO_2	=	carbondioxide
dpm	=	disintegration per minute
DEAE-cellulose	=	diethylaminoethyl cellulose
DTT	=	dithiothreitol
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
Fe^{2+}	=	ferrous ion
FPLC	=	fast performance liquid chromatography
g	=	centrifugal field
HMG-CoA	=	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HMGS	=	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase
K_m	=	Michaelis-Menten constant
M	=	molar
mg	=	milligram
Mg^{2+}	=	magnesium ion
Mn^{2+}	=	manganese ion
mM	=	millimolar
ml	=	millilitre

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

mmole	=	millimole
M.W.	=	molecular weight
min	=	minute
nm	=	nanometer
nmole/min	=	nanomole per minute
N	=	normal
NaOH	=	sodium hydroxide
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
pH	=	-log hydrogen ion concentration
POPOP	=	1, 4 - bis [2 - (5 - phenyloxazolyl)] benzene, 2, 2 - phenylene bis (5 - phenyloxazole)
PPO	=	2, 5 - diphenyloxazole
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	N,N,N′,N′,-tetramethyl ethylene diamine
Tris-HCl	=	Tris (hydroxy methyl aminomethane) hydrochloride
UC	=	ultracentrifuge
α	=	alpha
β	=	beta
μCi	=	microcuries
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
%	=	percent
^{o}C	=	degree Celsius

1 บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา เป็นพืชที่มีความสำคัญต่อประชากรทางภาคใต้ และต่อประเทศไทยเป็นอันมาก ยางพาราที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบันนั้น ได้เมล็ดพันธุ์มาจากประเทศบราซิล เพียงไม่กี่เมล็ด เมื่อประมาณ 80 ปีที่แล้ว มาปลูกขยายและคัดเลือกเพื่อให้ได้ยางพาราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีคุณภาพดีให้น้ำยางมาก มีความต้านทานโรคและไม่ต้องการการเอาใจใส่มากนัก ยางพันธุ์ที่จัดว่าเป็นยางชั้นหนึ่ง ที่สถาบันวิจัยยางแนะนำให้เกษตรกรทั่วไป ปลูกประจำปี พ.ศ. 2528 ได้แก่ RRIM 600, GT1, PR 255, PR 261 เพราะให้ผลผลิตสูง (วารสารยางพารา 2527) ซึ่งกว่าจะได้ข้อสรุปที่ว่า ยางพันธุ์ใดเป็นยางที่ให้ผลผลิตสูง สมควรได้รับการส่งเสริมให้แพร่หลายนั้น ต้องใช้เวลาทำการทดลองปลูก และติดตามผลเป็นระยะเวลานาน

เมื่อปี พ.ศ. 2524 ศูนย์วิจัยการยางได้รับพันธุ์ยางพาราใหม่ มาจากประเทศบราซิลจำนวนหนึ่ง เพื่อทดลองปลูกและคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะดี เหมาะสมกับที่จะทำการขยายพันธุ์ และเผยแพร่ให้เกษตรกรทั่วไป ปลูกเพื่อส่งเสริมเป็นสินค้าออกของประเทศต่อไป ยางพาราพันธุ์ใหม่จากประเทศบราซิลเหล่านี้ บางส่วนศูนย์วิจัยการยางได้ทำการปลูกและกำลังติดตามผลผลิตของต้นยางที่มาจากประเทศบราซิลเหล่านี้อยู่ หากจะทำการปลูก ทดสอบ และติดตามผลผลิตของต้นยางทั้งหมดคงต้องใช้เวลานาน

การแก้ปัญหาระยะเวลาที่ใช้เพื่อหาข้อสรุปว่า ยางพันธุ์ใดเป็นพันธุ์ดี โดยไม่ต้องใช้เวลาติดตามผลนานนับสิบ ๆ ปีนั้น ได้มีผู้พยายามใช้วิธีการต่าง ๆ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการสังเคราะห์ยางกับลักษณะอื่น ๆ ที่อาจตรวจหรือวัดได้ง่าย เช่น การศึกษาระดับของสารประกอบไธออลกับปริมาณเนื้อยาง (Suvachittanont และคณะ 1986) หรือการดูความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ HMG-CoA reductase กับปริมาณเนื้อยาง (Wititsuwannakul 1986) การดูลักษณะการกระจายของโปรตีนในยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ (วิจิตรา และ ผจญศักดิ์ 2527) รวมทั้งการรวบรวมคุณสมบัติบางประการของยางพารา (อุดส่าห์ 2527) และการจำแนกพันธุ์ยางโดยอาศัยไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟเรซิส แต่วิธีการ

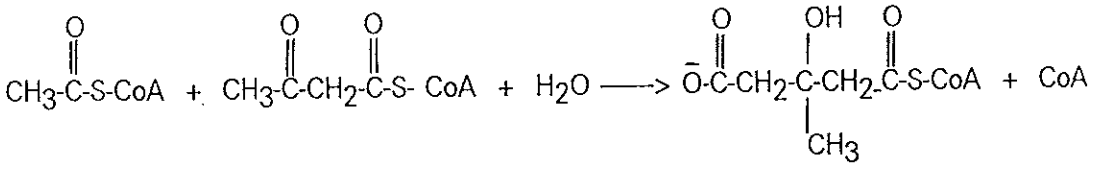
เหล่านี้ บางวิธีกำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการที่ยังหาข้อสรุปได้ไม่ชัดเจน บางวิธีแม้จะมีประโยชน์ แต่วิธีการนั้น เพียงวิธีการเดียว มิอาจใช้เป็นข้อสรุปโดยลำพังได้ จำเป็นต้องมีข้อมูลจากวิธีการอื่น ๆ มาประกอบอีก

การที่มีผู้พบว่า 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase) มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ยางพาราในต้นยาง (Lynen 1969) และเอนไซม์ HMG-CoA synthase มีความสัมพันธ์โดยตรง กับความสามารถในการผลิตยางของต้นยางพารา (Suvachittanont และ Wititsuwannakul 1995) ก็อาจนำความสัมพันธ์มาใช้เป็นตัวช่วยบ่งชี้ว่ายางพันธุ์ใดเป็นยางที่ให้ผลผลิตดีได้ด้วย เอนไซม์ HMG-CoA synthase ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในสัตว์ด้วย (Balasubramanium 1977) หากสามารถแยก และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติและธรรมชาติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จะทำให้ทราบเรื่องราวของเอนไซม์นี้ อาจนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้ เช่น นำมาใช้เตรียม antibody เพื่อใช้ในการ วิเคราะห์หาความว่องไวของเอนไซม์โดยวิธี ELISA ซึ่งอาจนำไปใช้พิจารณาว่ายางพันธุ์ใดเป็นพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสังเคราะห์ยางได้ดี ได้รวดเร็วและชัดเจนยิ่งขึ้น

การตรวจเอกสาร

1.1 HMG-CoA Synthase

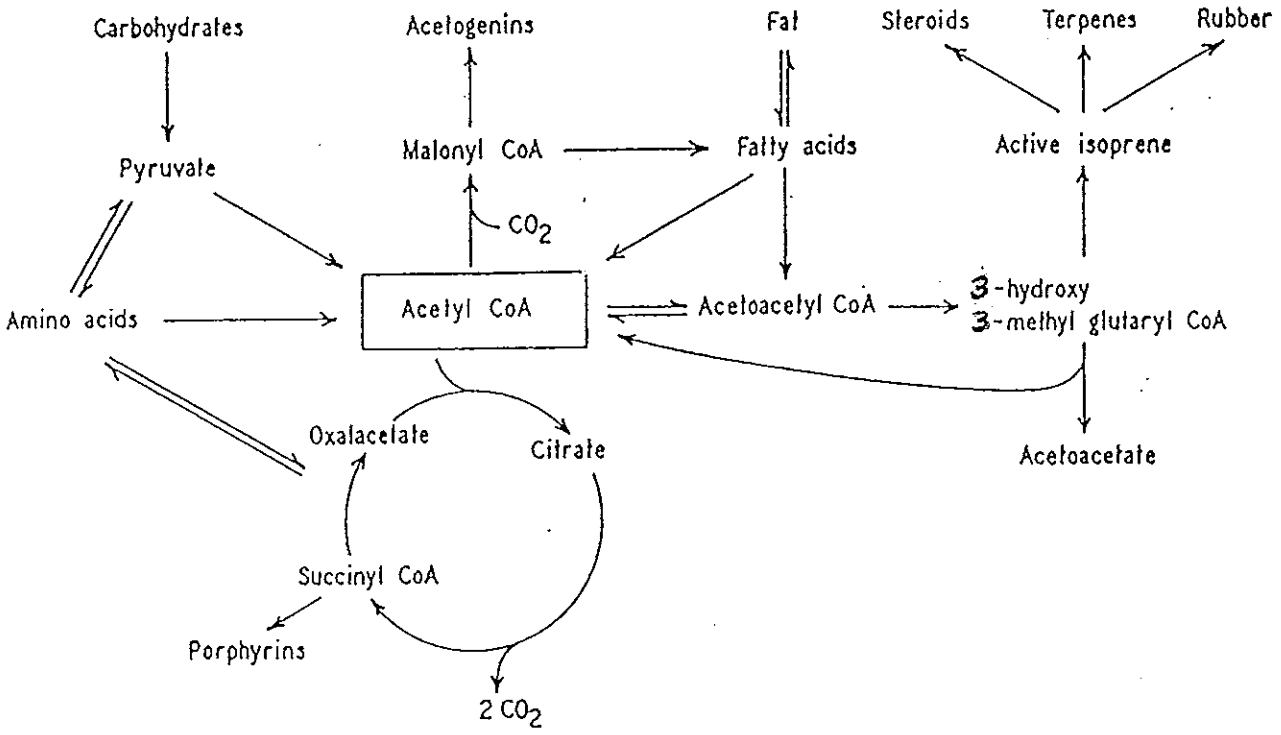
HMG-CoA synthase (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase E.C. 4.1.3.5) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาระหว่าง acetyl CoA และ acetoacetyl CoA ให้กลายเป็น 3- hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) ดังสมการ



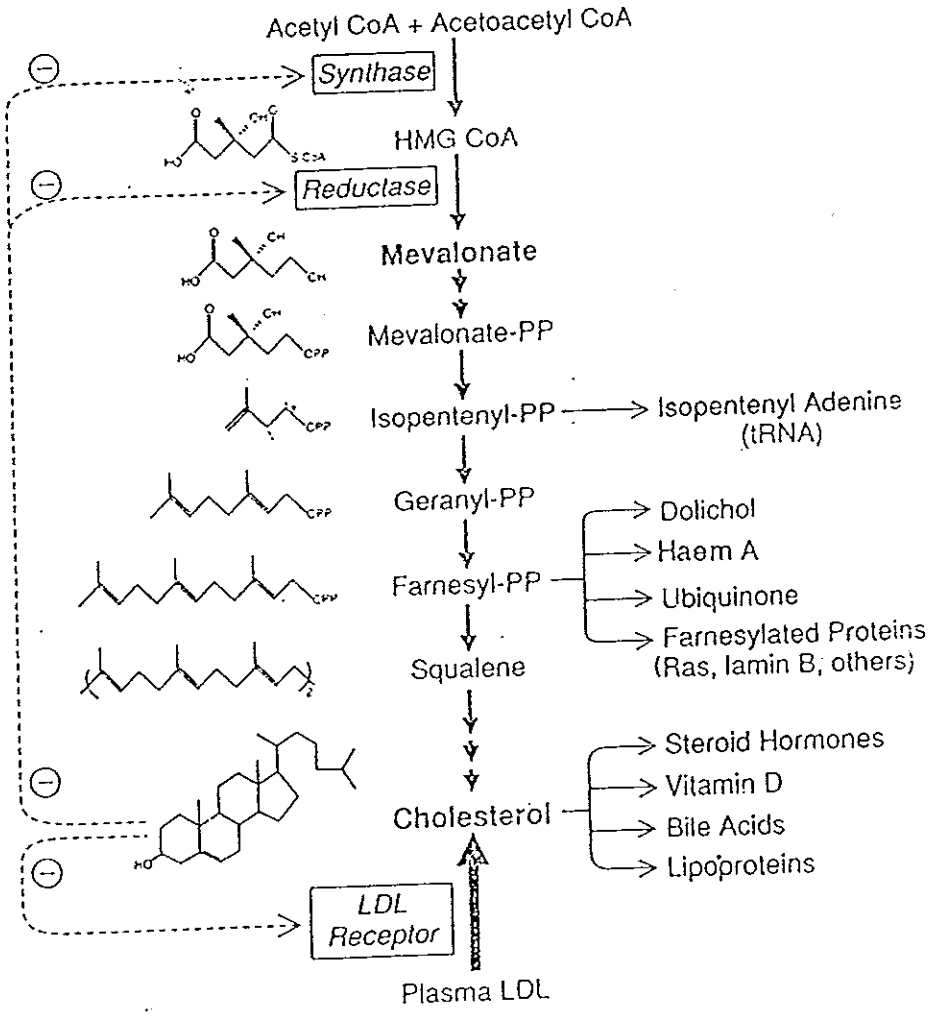
acetyl CoA acetoacetyl CoA HMG-CoA

HMG CoA ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์นี้มีความเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทั่วไปในเซลล์ดังรูปที่ 1 (Lynen 1969) HMG-CoA ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้เป็น mevalonate โดยเอนไซม์ HMG-CoA reductase mevalonate ที่เกิดจากปฏิกิริยาการรีดิวซ์ HMG-CoA นี้อาจเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตหลายชนิด เช่น โดลิโคล (dolichol) Haem A ยูบิควิโนน (ubiquinone) และคอเลสเทอรอล (cholesterol) ในสัตว์นั้นคอเลสเทอรอลเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ และไลโปโปรตีนในพลาสม่า และคอเลสเทอรอล ยังเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของสารกลุ่มสเตรอยด์ เช่น สเตรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) วิตามินดี (vitamin D) และกรดน้ำดี (bile acid) เป็นต้น (Goldstein และ Brown 1990) ดังรูปที่ 2 สำหรับมนุษย์นั้นนอกจากร่างกายจะสังเคราะห์คอเลสเทอรอลได้เองแล้ว ยังได้รับคอเลสเทอรอล จากอาหารที่รับประทานเข้าไปอีกด้วย หากมีคอเลสเทอรอล อยู่ในร่างกายเกินความต้องการมาก ๆ ก็อาจทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้น พบว่าการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลถูกควบคุมโดย HMG-CoA synthase และ HMG-CoA reductase (Mehrabian และคณะ 1986, Salam และคณะ 1989, Smith และคณะ 1988, Rosser และคณะ 1989) ดังนั้นปริมาณ HMG-CoA และ HMG-CoA synthase จึงอาจมีผลต่อระดับของคอเลสเทอรอลในเลือด นอกจาก HMG-CoA synthase จะเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอเลสเทอรอล (cholesterogenesis) เอนไซม์นี้ยังมีบทบาทในการสร้างคีโตน (ketogenesis) ในตับโดย HMG-CoA ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จะถูกสลายโดยเอนไซม์ HMG-CoA lyase ให้กลายเป็น acetoacetate และ acetyl CoA แต่ในไซโทพลาซึม (cytoplasm) HMG-CoA จะถูกเปลี่ยนเป็น mevalonate และเปลี่ยนต่อไปจนได้คอเลสเทอรอล ดังรูปที่ 3 (Clinkenbeard และคณะ 1975a)

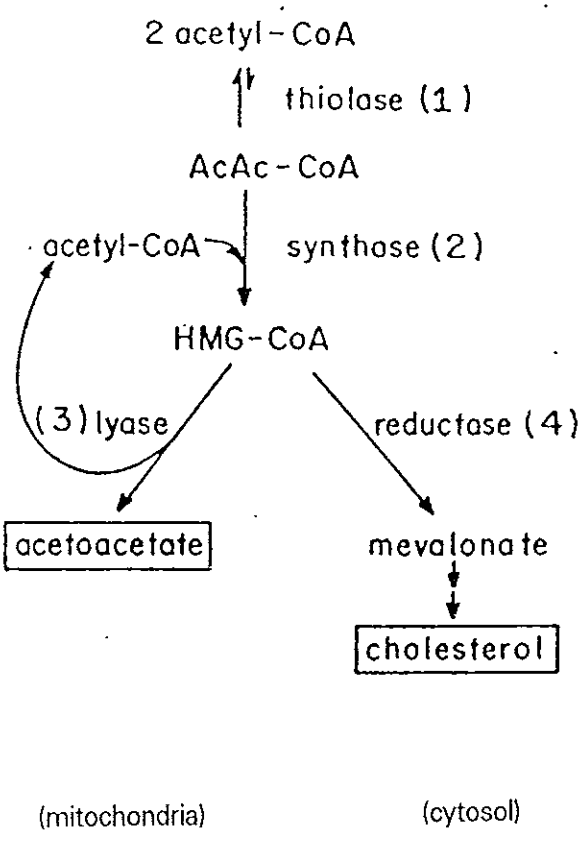
สำหรับในพืช mevalonate ที่เกิดจากปฏิกิริยารีดิวซ์ HMG-CoA จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไอโซปรีนอยด์ ซึ่งมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืช เช่น ฮอร์โมนพืช สารต่อต้านการกินของแมลง (insect antifeedant) ไฟโตทอกซิน (phytotoxin) เม็ดสีที่ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสง (acessory pigment) สารป้องกันการทำลายโดยแสงอัลตราไวโอเลตจาก แสงแดด (phytoprotectant) นอกจากนี้ยังใช้ในการสร้างโมเลกุลยาง เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 4 (Lynen 1969 , Chin และคณะ 1982)



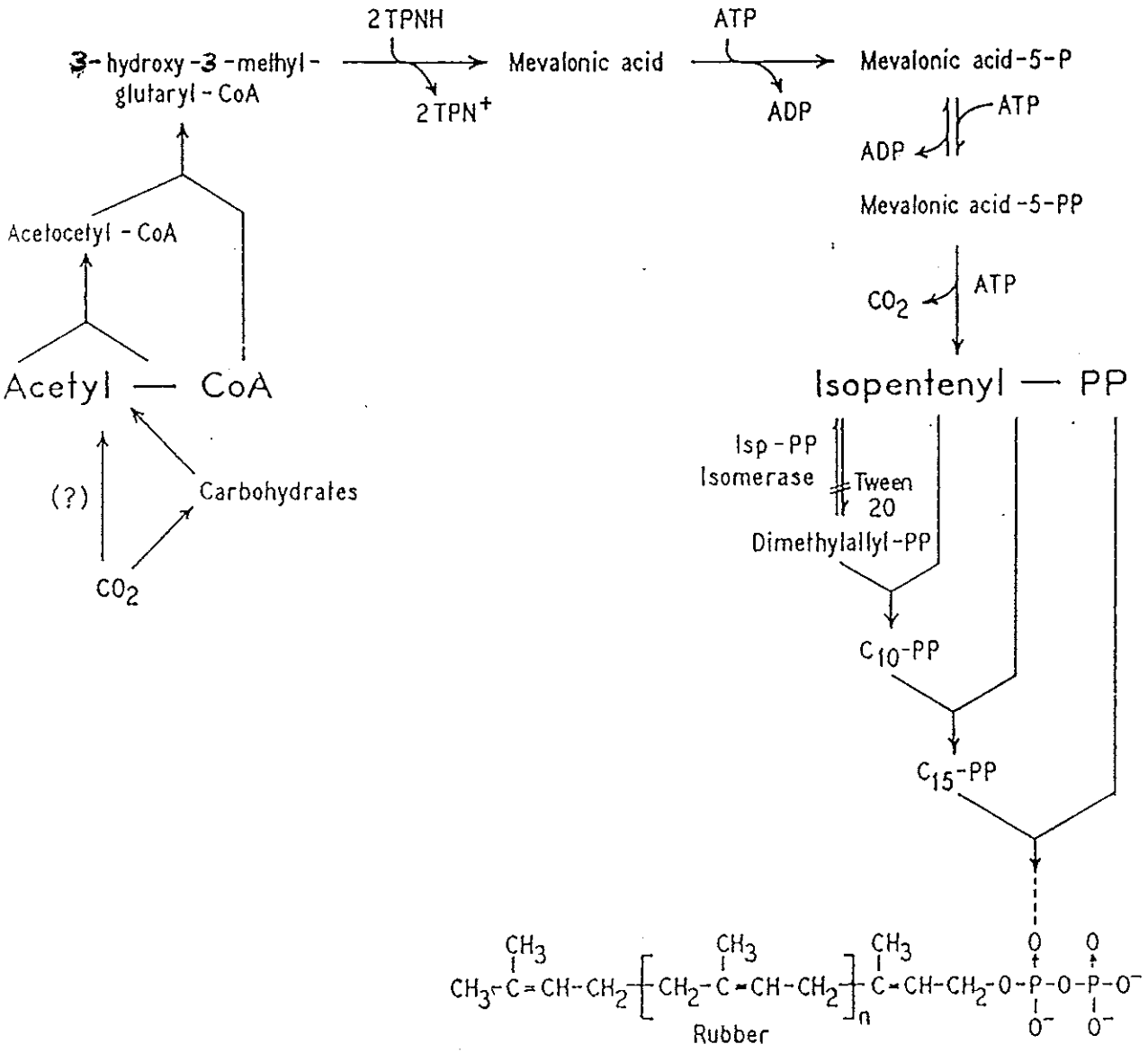
รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ของ HMG-CoA กับปฏิกิริยาทั่วไปในเซลล์ (Lynen 1969)



รูปที่ 2 วิถีของ mevalonate ในเซลล์สัตว์ (Goldstein และ Brown 1990)



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงของ acetyl CoA ในไมโทคอนเดรียและไซโทพลาซึม (Clikenbeard และคณะ 1975a)



รูปที่ 4 วิถีการสร้างยาง (Lynen 1969)

การวิเคราะห์หาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทำได้ 2 วิธี คือ spectrophotometric assay และ radiochemical assay สำหรับ spectrophotometric assay นั้น วิเคราะห์โดยการวัดปริมาณ acetoacetyl CoA ที่ถูกใช้ไปโดยวัดจากการดูดกลืนแสง ที่ ลดลง ที่ 300 nm ซึ่งแปรผันโดยตรงกับปริมาณ acetoacetyl CoA ในกรณีของ ซี-ซีรั่ม ของน้ำยางพาราใช้วิธี spectrophotometry แล้วพบว่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ 300 nm ไม่อาจใช้ในการติดตามปฏิกิริยาได้ เพราะซี-ซีรั่ม ดูดกลืนแสงที่ 300 nm ได้มาก การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง (Suvachittanont และ Wititsuwannakul 1995) ส่วนวิธี radiochemical assay วิเคราะห์โดยวัดปริมาณ ^{14}C-HMG-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาโดยตรงและกำจัด^{14}C ที่มีอยู่ในรูปของ acetyl CoA โดยการเผาให้ร้อนถึง 95 องศาเซลเซียส ใน 6 M HCl ^{14}C-acetyl CoA และสารอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นจะระเหยไป เหลือแต่ ^{14}C-HMG-CoA ซึ่งไม่ระเหย (Miziorko 1985)

1.2 แหล่งที่พบเอนไซม์ HMG-CoA synthase (Source of enzyme HMG-CoA synthase)

เอนไซม์ HMG-CoA synthase พบในสัตว์ พืช และยีสต์ (Kornblatt และRudney 1971, Middleton และ Tubbs 1975, Servous 1986, Stewart และ Rudney 1966) สำหรับในสัตว์นั้น พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals) และในสัตว์ปีก (avian) สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่พบเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้แก่ หนู แฮมสเตอร์ (hamster) และวัว โดยพบในตับ (Bucher และคณะ 1960, Clinkenbeard และคณะ 1973,1975a, Lowe และ Tubbs 1985) สมอง ต่อมหมวกไต (adrenal grand) Smith และคณะ 1988, Rosser และคณะ 1989, Shah 1982) ลำไส้หนู (rat intestine) (Li และคณะ 1988) และในเซลล์รังไข่ของแฮมสเตอร์ (hamster ovary cell) (Schnitzer และ Sinensky 1987) ส่วนในสัตว์ปีก พบเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับไก่ (Clinkenbeard และคณะ 1975) ในพืชได้มีการศึกษาพบ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารา (Lynen 1969) ใบของผักขม (spinach) ถั่วเหลือง (bean) และถั่วลันเตา (pea) (Alam และคณะ 1991) และยังพบในต้นอ่อนของแรดิช (Bach และคณะ 1991) ลำต้นของ *Catharanthus roseus* L. (Vander Heijden และคณะ 1994)

1.3 ตำแหน่งที่พบเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในเซลล์สัตว์

เอนไซม์ HMG-CoA synthase พบในไซโทพลาซึม และไมโทคอนเดรีย โดย Bucher และคณะ (1960) พบเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับหนู ในส่วนของไมโทคอนเดรีย ต่อมาปี ค.ศ. 1973 Clinkenbeard และคณะ พบว่ามีเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งใน ไมโทคอนเดรียและในไซโทพลาซึมของตับหนู และ HMG-CoA synthase ในตับหนูและตับไก่ ร้อยละ 80 จะอยู่ในส่วนของไมโทคอนเดรีย และที่เหลือประมาณร้อยละ 20 จะอยู่ใน ไซโทพลาซึม (Clinkenbeard และคณะ 1975a) และยังพบว่า HMG-CoA synthase ใน ไมโทคอนเดรีย ส่วนใหญ่อยู่ในแมทริกซ์ (matrix) และเยื่อชั้นใน (inner membrane) ส่วนที่เยื่อ ชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (outer membrane) และช่องว่างระหว่าง คริสตา (intercristal) มี อยู่เพียงเล็กน้อย HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึมนั้น ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของไซโทซอล (cytosol) ไม่พบ HMG-CoA synthase ในไมโครโซม (microsome)

เมื่อแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากไมโทคอนเดรียและไซโทพลาซึมของตับไก่ให้ บริสุทธิ์ขึ้น โดยอาศัยวิธีต่าง ๆ ทางชีวเคมี เช่น การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ โครมาโตกราฟฟี่ (chromatography) แบบต่าง ๆ และอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) พบว่า อาจแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึมออกได้เป็น 4 ชนิด คือ HMG-CoA synthase I, HMG-CoA synthase II, HMG-CoA synthase III, HMG-CoA synthase IV, ส่วน HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียมีเพียงชนิดเดียว (Clinkenbeard และคณะ 1975b)

1.4 สมบัติของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

Clinkenbeard และ คณะ (1975b,c) ศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ใน ไมโทคอนเดรียและไซโทพลาซึมของตับไก่ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียมีน้ำหนัก โมเลกุล (molecular weight) อยู่ระหว่าง 96,000-105,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 52,000 ดาลตัน มีค่า K_m สำหรับ acetyl CoA เท่ากับ 1,000 μM และค่า K_m สำหรับ acetoacetyl CoA น้อยกว่า 5 μM มีค่า pI (Isoelectric point) เท่ากับ 7.2 และแมกนีเซียมไอออน ความเข้มข้น 20 mM ทำให้ค่าความว่องไวของ เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียลดลงประมาณร้อยละ 80 แต่กระตุ้น

HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึม ประมาณร้อยละ 50 เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึมของตับไก่มี 4 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 90,000-100,000 ดาลตัน และประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 52,000-58,000 ดาลตัน เช่นเดียวกับเอนไซม์จากไมโทคอนเดรีย แต่ค่า K_m สำหรับ acetyl CoA อยู่ระหว่าง 290-310 μM และค่า K_m สำหรับ acetoacetyl CoA น้อยกว่า 2 μM และมี pI ระหว่าง 5.2-6.6 และพบว่าแมกนีเซียมไอออน ทำให้เอนไซม์ HMG-CoA synthase I มีความว่องไวลดลง แต่สำหรับ HMG-CoA synthase II และ III กลับมีความว่องไวเพิ่มขึ้น HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึมของตับไก่มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาอยู่ระหว่าง 9.2-9.4 นอกจากนี้ยังพบ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึมของเซลล์สมองไก่ แต่ไม่พบเอนไซม์นี้ในไมโทคอนเดรีย

ในปี ค.ศ. 1987 Schnitzer และคณะ ได้ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากไซโทพลาซึมของตับหนูและเซลล์รังไข่ของแฮมสเตอร์ (chinese hamster ovary cells, CHO-K1) เปรียบเทียบกันพบว่าไซโทพลาซึมของตับหนู มีเอนไซม์ที่คล้ายกับเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียปนอยู่ด้วยเพราะถูกยับยั้งโดยแมกนีเซียมไอออน และไม่เสถียร สำหรับเอนไซม์จากเซลล์รังไข่ของแฮมสเตอร์จะมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ในไซโทพลาซึม ของตับหนู แต่ไม่มีส่วนที่คล้ายกับเอนไซม์ในไมโทคอนเดรีย

1.5 สารยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA synthase

Beta-lactone เทอม F-244 ซึ่งแยกได้จาก *Scopulariopsis sp.* (3,5,7-trimethyl-12-hydroxy-13-hydroxymethyl-2,4-tetradecadiendioic acid-12-14-lactone) เป็นยาที่มีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับหนู (Tomoda และคณะ 1987) นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษา เรื่องราวของตัวยับยั้งเอนไซม์อีกหลายคณะ เช่น Greenspan และคณะ (1987) พบว่า L-659,699 เป็น beta lactone ที่แยกได้จาก *Fusarium sp.* มีโครงสร้างเป็น (E,E)-11-[3-(hydroxymethyl)-4-oxo-2-oxytanyl]-3,5,7-trimethyl-2,4-undecadienenoic acid มีความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase Omura และคณะ (1987) พบว่ายาปฏิชีวนะ 1233A มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างจำเพาะเจาะจงกับความว่องไวของเอนไซม์

HMG-CoA synthase นอกจากนี้ Nagashima และคณะ (1993) ได้ศึกษาการยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในตับหนูโดยยา 1233A พบว่ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้เช่นเดียวกัน

สารที่สามารถทำปฏิกิริยา alkylation กับหมู่ sulfhydryl ของกรดอะมิโน cysteine ของเอนไซม์ เช่น 3-chloropropionyl CoA และ succinyl CoA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ Miziorko และ Behnke (1985a,b) ได้ศึกษาการเรียงตัวของกรดอะมิโนบริเวณ active site ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียของตับไก่ พบว่าหมู่ sulfhydryl จาก cysteine บริเวณ active site ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase มีการเรียงตัวของกรดอะมิโน เป็น Glu-Ser-Gly-Asn-Thr-Asp-Val-Glu-Gly-Ile-Asp-Thr-(Thr)-Asn-Ala-Cys-Tyr-Gly-Gln-Thr-(Ala) และ 3-chloropropionyl-CoA ยับยั้งการทำงานที่ active site ของ HMG-CoA synthase แบบ irreversible โดยทำให้เกิด alkylation ของหมู่ sulfhydryl ที่ active site

Lowe และ Tubbs (1985) พบว่า succinyl-CoA (3-carboxypropionyl-CoA) ลดความว่องไว (inactivate) ของ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียของตับวัว โดยจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะ thioester กับ cysteine ที่ active site ซึ่งปกติ cysteine จะทำปฏิกิริยากับ acetyl CoA succinyl CoA จะจับกับ HMG-CoA synthase ด้วยค่าคงที่ในการจับ 340 μM และเกิด succinylation ด้วยอัตราเร็วคงที่ 0.57 ต่อนาที succinyl enzyme สลายตัวโดยมี half-life ประมาณ 40 นาที (K = 0.017 ต่อนาที) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 7.0 ในขณะที่มี acetyl CoA และ succinyl CoA อยู่ การลดความว่องไวของ HMG-CoA synthase โดย succinyl CoA สัมพันธ์กับการเกิด ketogenesis Quant และคณะ (1989) พบว่า glucagon และ mannoheptulose เพิ่มความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียของตับวัวและหนู ในขณะที่ลดปริมาณ succinyl CoA ในตับวัวและหนูด้วย

1.6 ปัจจัยที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

นอกจากสารยับยั้งเอนไซม์แล้วยังพบว่า คอเลสเทอรอลในอาหารสามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA synthase แบบย้อนกลับ (feed back inhibition) ในตับไก่และในตับหนู ตับของไก่ซึ่งได้รับอาหารควบคุมที่ไม่มีคอเลสเทอรอลมีความว่องไวของ HMG-CoA synthase

ในไซโทพลาซึมสูงกว่าเอนไซม์จากไก่ที่ได้รับอาหารซึ่งมีคอเลสเทอรอลอยู่ด้วยกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับอาหารที่ไม่มีคอเลสเทอรอล จะมีความว่องไวของเอนไซม์สูงกว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอล เป็นเวลา 1, 2 และ 7 วัน ประมาณ 1.9, 4.3 และ 6.5 เท่า ตามลำดับ ในตับหนูได้ผลการทดลองเช่นเดียวกับในตับไก่ (Clinkenbeard และคณะ 1975b)

นอกจากคอเลสเทอรอลแล้ว ยังพบว่า oleic acid และน้ำมันมะกอกในอาหารหนู ทำให้ความว่องไวจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึมของเซลล์ตับหนู มีค่าสูงขึ้น (Salam และคณะ 1988) และยังมีผู้พบว่าอาหารที่มียา cholestyramine และ mevinolin ผสมอยู่ ความว่องไวของ HMG-CoA synthase และ HMG-CoA reductase ในตับหนูเพิ่มขึ้น 6 และ 92 เท่า ตามลำดับ (Li และคณะ 1988) Kose และคณะ (1993) พบว่า contraceptive steroids มีผลต่อเมตาบอลิสมของคอเลสเทอรอล ในหนูตัวเมีย โดย ethinyl estradiol / norethisterone acetate และ ethinyl estradiol / levonorgestrel ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase และ AcAc-CoA thiolase (acetoacetyl CoA thiolase) มีค่าสูงขึ้น และทำให้ปริมาณคอเลสเทอรอลสูงขึ้นด้วย แต่กลุ่มที่ให้ยาระยะเวลายาวนานค่าความว่องไวของเอนไซม์กลับลดลง หรือไม่เปลี่ยนแปลง

1.7 การศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ระดับโมเลกุล

ปัจจุบัน มีการศึกษาเอนไซม์ HMG-CoA synthase ถึงระดับยีน (gene) แต่ส่วนใหญ่ศึกษาจากเซลล์สัตว์ โดยเริ่มจาก Gil และคณะ (1986) แยกและหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้งสาย cDNA ของ cytoplasmic HMG-CoA synthase ซึ่งมีขนาด 3.3 kilobase จากเซลล์รังไข่ของแฮมสเตอร์ (chinese hamster) cDNA นี้ได้จาก UT-1 cells ซึ่งผลิต mRNA สำหรับเอนไซม์ HMG-CoA synthase และ HMG-CoA reductase cDNA ของ HMG-CoA synthase มีรหัสตรงกับปลายอะมิโนของเอนไซม์ HMG-CoA synthase การให้อาหารคอเลสเทอรอลแก่แฮมสเตอร์ ทำให้ mRNA สำหรับ HMG-CoA synthase และ HMG-CoA reductase ในตับของแฮมสเตอร์ ลดลงมากกว่าร้อยละ 85 แสดงให้เห็นว่า mRNA สำหรับ cytoplasmic HMG-CoA synthase และ HMG-CoA reductase ถูกควบคุมโดยสารคอเลสเทอรอล (Gil และคณะ 1986) เช่นเดียวกับความว่องไวของเอนไซม์ ในกรณีของตับไก่และตับหนู (Clinkenbeard และคณะ 1975b)

Leonard และคณะ (1986) ได้ศึกษายีนสำหรับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ของมนุษย์ โดยสร้างเซลล์ลูกผสมระหว่างเซลล์ของมนุษย์ และเซลล์ของแฮมสเตอร์ (Mev-1) ที่มีความผิดปกติ (defective) ในการแสดงออกของ HMG-CoA synthase และตรวจสอบลูกผสมนี้ได้โดยอาศัยความแตกต่างของ HMG-CoA synthase ของเซลล์มนุษย์และเซลล์จากแฮมสเตอร์ที่ถูกยับยั้งด้วยแมกนีเซียมไอออน ได้ต่างกัน จากข้อมูลทาง cytogenetic พบว่า HMG-CoA synthase อยู่ที่ chromosome คู่ที่ 5 ของมนุษย์ เช่นเดียวกับยีนที่ควบคุมเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์คอเลสเทอรอล

Smith และคณะ (1988) ได้ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ HMG-CoA synthase ใน cultured เซลล์ โดยการถ่ายทอดยีนและการใช้ mutagen เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่มีบทบาทเป็น promoter ในกรณีของ HMG-CoA synthase ในหนู Ayte และคณะ (1990a) พบว่า เอนไซม์ในส่วนของไมโทคอนเดรียและไซโทพลาสซึม จะมียีนควบคุมต่างกัน Casals และคณะ (1992) ได้ศึกษาบทบาทของ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียในการควบคุมกระบวนการ ketogenesis พบว่า mRNA สำหรับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลงตาม cAMP, insulin และ dexamethasone ใน ค.ศ.1993 Royo และคณะ ได้ทำการทดลองพบว่ายีนสำหรับ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรีย นอกจากแสดงออกที่เซลล์ตับแล้ว ยังมีการแสดงออกที่อัณฑะ (testis) และรังไข่ (ovary) ด้วย Thumelin และคณะ(1993) ก็พบว่ายีนสำหรับ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียมีการแสดงออกที่ตับหนู ลำไส้ และไต แต่ไม่พบใน สมอง หัวใจ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อ adipose ของหนู

ในช่วงเวลาที่ผ่านมามีผลงานเกี่ยวกับยีน และการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียและไซโทพลาสซึมของสัตว์ เช่น หนู (Ayte และคณะ 1990b) ทั้งส่วนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ และในส่วนที่เป็น noncoding region (Ayte และคณะ 1993) Gil-Gomez และคณะ (1993) ได้ศึกษายีนของ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียของหนู ซึ่งมีองค์ประกอบที่ควบคุมเอนไซม์ ในการตอบสนองต่อฮอร์โมน Martinez-Gonzalez และคณะ (1993) ได้ศึกษายีนและการแสดงออกของยีนสำหรับ HMG-CoA synthase ในแมลงสาบในระยะต่าง ๆ ของการพัฒนา ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของแมลงสาบด้วย

จากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในหนู แฮมสเตอร์ และไก่ เปรียบเทียบกับ HMG-CoA synthase ในแมลงสาบพบว่าเอนไซม์นี้มีลักษณะที่ไม่เปลี่ยนแปลง อยู่ทางด้านปลายอะมิโน (NH_2 terminal) ซึ่งเป็นบริเวณเร่ง (catalytic site) (Gil และคณะ 1986, Ayte และคณะ 1990b, Miziorko และ Behnke 1985b, Kattarcooley และคณะ 1990) แสดงว่าลักษณะโครงสร้างของยีน HMG-CoA synthase มีส่วนที่คงเดิมอยู่มาก แม้ว่าจะเป็นสัตว์ต่างชนิดกัน

1.8 HMG-CoA synthase ในพืช

เรื่องราวเกี่ยวกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในพืชนั้น มีน้อยมาก Lynen (1969) ได้รายงานว่าพบเอนไซม์ HMG-CoA synthase มีปริมาณสูงอยู่ในน้ำยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และ Alam และคณะ (1991) ได้ศึกษาในใบของพืชจำพวกผักขม ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา พบว่ามีเอนไซม์ HMG-CoA synthase อยู่ 32.2, 6.2 และ 3.7 Units/gm ตามลำดับและเมื่อนำใบพืชไปสกัด เพื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่าความว่องไวของเอนไซม์นี้สูญหายไประหว่างขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ถึงร้อยละ 60 ถึงร้อยละ 80 Bach และคณะ (1991) ได้ศึกษาเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา acetyl CoA ให้กลายเป็น HMG-CoA จากต้นอ่อนของแรดิช (*Raphanus sativus* L.) และเชื่อว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง มี 2 ตัวคือ acetoacetyl CoA thiolase (AACT E.C. 2.1.3.9) และ HMG-CoA synthase (HMGS E.C. 4.1.3.5) และ AACT / HMGS เป็นเอนไซม์ที่จับกัน เป็น complex เมื่อเร่งปฏิกิริยาจะไม่มี acetoacetyl CoA ปล่อยออกมาจาก AACT ก่อนที่จะไปจับกับ active site ของ HMGS และไม่สามารถที่จะแยก AACT และ HMGS ออกจากกันได้ การเร่งปฏิกิริยาโดย AACT / HMGS ไม่ต้องการ acetoacetyl CoA มาช่วยในการทำให้เกิด HMG-CoA และได้ศึกษาเรื่องราวของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ HMG-CoA ในต้นอ่อนของแรดิชมาตลอด

Bach และคณะ (1991) ได้ทำการแยกเอนไซม์นี้จากการแยกผนังเยื่อหุ้ม (membrane) ของต้นอ่อนของแรดิช โดยใช้เจลฟิลเตรชั่น โครมาโตกราฟฟี่ (gel filtration chromatography) และตามด้วย anion exchange chromatography (Fractogel EMD TMAE 650, Merck) โดยระบบ FPLC (fast performance liquid chromatography) ผลการทดลองได้เอนไซม์ AACT / HMGS มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น (purification factor) 240 เท่า และใช้เจลฟิลเตรชั่น

โครมาโตกราฟฟี่ หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ AACT / HMGS ได้ค่าประมาณ 54 kD ซึ่งตรงกับน้ำหนักโมเลกุล ที่เคยได้ทำไว้ก่อน Bach และคณะ (1990) ซึ่งได้ศึกษาเอนไซม์จากต้นอ่อนของแรดิช ไว้ก่อนโดยใช้วิธีเจลฟิลเตรชั่น โครมาโตกราฟฟี่เหมือนกัน และพบว่าความว่องไวของเอนไซม์ AACT/ HMGS ถูกกระตุ้นให้สูงขึ้นได้โดยใช้ Fe^{2+} ซึ่ง chelated ด้วย ethylenediamine tetraacetate, citrate หรือ adenosine-5-triphosphate (ATP) ต่อมา Weber และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาโดยทำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ HMG-CoA ให้บริสุทธิ์ จากต้นอ่อนของแรดิช เขาพบว่าเอนไซม์ acetoacetyl CoA thiolase (AACT) และ HMG-CoA synthase (HMGS) อยู่ในสารละลายที่ได้จากผนังเยื่อหุ้มของแรดิช มีความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสองมีค่าสูง และการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโนเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นสูง ทำให้เอนไซม์สูญเสียความว่องไวไปมาก

Bach และคณะ (1994) ได้พยายามทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยปรับเปลี่ยนวิธีการ เช่น ใช้อะซีโตนที่เย็น มาตกตะกอนโปรตีน แทนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งได้ผลดีขึ้น จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ไปทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ทันทีโดยใช้ anion exchange chromatography (Fractogel EMD TMAE 650) กำจัด HMG-CoA lyase ซึ่ง AACT / HMGS ไม่จับกับคอลัมน์ แต่จับกับ dye affinity material AF orange และชะออกด้วยเกลือ 0-1 M KCl ซึ่งไม่ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์หายไป และแยกสารอื่น ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ๆ และพวกเกลือ KCl ที่ติดมากับเอนไซม์ในขั้นตอนชะ affinity chromatography โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟฟี่ เอนไซม์นี้ เมื่อนำไปทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แบบ SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) แล้วย้อมสี silver (silver staining) พบว่า AACT/HMGS มีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวและมีน้ำหนักโมเลกุล 55.5±2 kD Bach และคณะ 1990 พบว่าความว่องไวเอนไซม์ AACT/HMGS ยังคงถูกกระตุ้นให้สูงขึ้นได้โดยมี Fe^{2+}-chelates (EDTA) citrate, ATP และมี quinone cofactors, pyrroloquinoline quinone (PQQ) อยู่ด้วยแต่ความว่องไวเอนไซม์ AACT / HMGS นี้จะถูกยับยั้งโดย phenyl hydrazine แม้ว่าจะมี Fe^{2+} -EDTA และ PQQ อยู่ด้วยก็ตาม และพบว่า pH optimum ของเอนไซม์อยู่ที่ 8.0 (Bach และคณะ 1994)

1.9 HMG-CoA synthase ในยางพารา

Lynen (1969) ได้รายงานว่า มีเอนไซม์ HMG-CoA synthase และ HMG-CoA reductase ในน้ำยางพารา *(Hevea brasiliensis)* แต่อย่างไรก็ตามความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในยางยังมีน้อยมาก ขณะที่ความรู้เรื่องเกี่ยวกับเอนไซม์ HMG-CoA reductase ได้มีการศึกษามากกว่าและมีรายงานเกี่ยวธรรมชาติของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ในยางพาราจนถึงระดับยีน (Wititsuwannakul และคณะ 1988, Sipat 1982, Wititsuwannakul และคณะ1990, Chye และคณะ 1992) เช่นได้มีการแยกเอนไซม์จากตะกอนก้นหลอดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และพบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 44,000 ดาลตัน และความว่องไวของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลา (Wititsuwannakul และคณะ 1990) ส่วน Chye และคณะ (1992) ได้ศึกษาเรื่องราวเกี่ยวกับโครงสร้างของยีนและการแสดงออกของยีน HMG-CoA reductase ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพาราจากต้นยางพันธุ์ RRIM 600 สูงกว่าความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA reductase หลายเท่า (Lynen 1969, Wititsuwannakul และคณะ 1988) Lynen (1969) พบว่าในน้ำยางพารา มี HMG-CoA synthase 232 nmole/min/ml latex และ HMG-CoA reductase 0.078 nmole/min/ml latex

Suvachittanont และ Wititsuwannakul (1995) พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่ม (C-serum) มีค่าสูงกว่าความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในใบยาง อาจเป็นการแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ยางของต้นยางเกิดขึ้นที่เซลล์สร้างยาง (laticifers) หรือที่ท่อน้ำยาง (latex vessels) มากกว่าที่ใบของต้นยาง ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ทั้งในน้ำยางและในใบยางเปลี่ยนตามช่วงเวลาของวัน และความว่องไวของเอนไซม์ในน้ำยาง ในส่วนของซี-ซีรั่ม มีความสัมพันธ์กับ dried rubber content โดยมีสหสัมพันธ์ 0.81 แสดงว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางน่าจะมีบทบาทโดยตรงในการควบคุมการสังเคราะห์ยางโดยผ่านการเกิด HMG-CoA เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความว่องไวจำเพาะ (specific activities) ของ HMG-CoA synthaseและ dried rubber content มีค่าสหสัมพันธ์เป็น -0.37 (negative correlation coefficient) แสดงให้เห็นว่าค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ลดลงเมื่อ dried rubber content หรือยางซึ่งเป็นผลผลิต

สุดท้ายของการสังเคราะห์ยางมีค่าเพิ่มขึ้น (Suvachittanont และ Wititsuwannakul 1995) แม้ว่าจะยังไม่มีผู้ทำให้เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในยางให้บริสุทธิ์ได้มาก่อน แต่ Kush และคณะ (1990) ได้พยายามศึกษาการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในน้ำยางพารา รวมทั้งยีนของ HMG-CoA synthase โดยอาศัย probe ของ HMG-CoA synthase จากแฮมสเตอร์มาศึกษาถึงการแสดงออกของยีน HMG-CoA synthase ในยางพารา และพบว่ามีการแสดงออกของยีนในน้ำยางพารามากกว่าที่ใบ

เนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการทำให้เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพาราบริสุทธิ์มาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงจะศึกษารายละเอียดของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารา โดยนำน้ำยางพารา มาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (ultracentrifuge) หรือ UC ซึ่งสามารถแยกน้ำยางพาราออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ เนื้อยาง (rubber particles), ฟรีวิสลิ่ง (Frey-Wyssling particles) ซี-ซีรั่ม (C-serum) และตะกอนก้นหลอด (bottom fraction) นำแต่ละส่วนที่แยกได้ไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase พบว่าในส่วนของซี-ซีรั่ม มีความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase สูงสุด จึงได้นำส่วนของซี-ซีรั่มไปแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase ให้บริสุทธิ์ขึ้นเพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

วัตถุประสงค์

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะเรียนรู้เกี่ยวกับเรื่องราวของเอนไซม์นี้ให้มากขึ้น โดยศึกษา

1. เอนไซม์ HMG-CoA synthase จากส่วนต่าง ๆ ที่ปั่นแยกได้ในน้ำยางพารา เช่น ซี-ซีรั่ม, ฟรีวิสลิ่ง, และตะกอนก้นหลอด ส่วนใดจะมีความว่องไวของเอนไซม์สูงที่สุด

2. ปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในส่วนที่มีความว่องไวมากที่สุด (ซี-ซีรั่ม) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ที่จะนำไปใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

3. การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากน้ำยางพาราให้บริสุทธิ์ โดยวิธีมาตรฐานทางชีวเคมี เช่น ตกตะกอนด้วยอะซีโตน แยกโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่ เช่น โครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุ เจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟฟี่และโดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

4. สมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากน้ำยางพาราที่ผ่านขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์ เช่น ขนาดน้ำหนักโมเลกุล ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น อุณหภูมิ pH ฯลฯ เพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

วัสดุที่ใช้ได้จากการซื้อหาในท้องถิ่น ดังนี้

1. น้ำยางสด กรีดจากต้นยางพารา ที่หมู่บ้านทุ่งลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
2. ถ้วยพลาสติก หรือถุงพลาสติกสะอาดสำหรับรองรับน้ำยางสดแต่ละต้น
3. น้ำแข็ง สำหรับแช่น้ำยางสดไม่ให้แข็งตัว พร้อมกระติกน้ำแข็ง
4. มีดกรีดยางโดยเฉพาะเรียกว่ามีดเจบอง
5. ท่อโลหะขนาดเล็ก สำหรับตอกติดกับต้นยางให้น้ำยางไหลลงภาชนะ
6. ผ้าก๊อซ สำหรับกรองน้ำยางสด

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด analytical grade

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
acetoacetyl CoA	851.6	Sigma
acetyl CoA	809.6	Sigma
acrylamide gel	71.1	Merck
ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	132.14	Analyticals corloerba
ammonium persulfate $(NH_4)_2S_2O_8$	228.7	Merck
alpha lactalbumin	14,400	Sigma
beta-galactosidase	116,000	Sigma
bromophenol blue R		Sigma
blue dextran	$2x10^6$	Sigma

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
bovine serum albumin (BSA)	67,000	Pharmacia
carbonic anhydrase	30,000	Pharmacia
chymotrypsinogen A	25,000	Sigma
^{14}C-acetyl CoA	809.6	New England
^{14}C-HMG-CoA		New England
Coomassie brilliant blue R 250		Sigma
cupric sulphate $CuSO_4$	249.68	Sigma
CM-cellulose 23		Whatman
DEAE-cellulose anion exchanger		Whatman
deoxycholic acid	392.6	Merck
dimethyl POPOP		Sigma
dipotassium hydrogen orthophosphate anhydrous K_2HPO_4	174.18	Merck
dithiothreitol	154.2	Sigma
disodium hydrogen phosphate dihydrate $Na_2HPO_4.2H_2O$	177.99	Ajax chemical
ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	292.2	Fluka
ferrous sulfate $FeSO_4.7H_2O$	278	Merck
Folin phenol reagent		Sigma
glacial acetic acid CH_3COOH	60.05	Merck
glycine	75.07	Merck
glycerol $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$	92.09	Merck
hydrochloric acid HCl	36.46	Merck
iodoacetamide	185	Sigma

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
2-mercaptoethanol	78.13	Merck
methanol CH_3OH	32.04	BDH
manganese chloride $MnCl_2$	197.91	Merck
magnesium chloride $MgCl_2$	203.31	Merck
N,N′- Methylene bis acrylamide	154.2	Merck
N,N, N′, N′- tetramethylene diamine (TEMED)	116.2	Sigma
ovalbumin	43,000	Pharmacia
phosphorylase b	94,000	Sigma
potassium dichromate $K_2Cr_2O_7$	294	Sigma
PPO (2,5 - diphenyloxazole)	221.3	Sigma
potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4	136.1	Merck
sodium acetate $CH_3COONa.3H_2O$	136.08	Analyticals corloerba
sodium chloride	58.44	Merck
sodium dodecylsulfate	288.4	Merck
sodium hydroxide NaOH	40	Merck
sodium dihydrogen orthophosphate $NaH_2PO_4.2H_2O$	156.01	Ajax chemical
soybean trypsin inhibitor	20,100	Pharmacia
sephacryl S-200		Pharmacia
sephadex G-75		Pharmacia
sephadex G-100		Pharmacia
Tris (hydroxy methyl aminomethane) hydrochloride	121.14	Fluka
Triton X-114		Sigma
xylene		Hopkin Williams

อุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ มีดังนี้

1. เครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ (ultracentrifuge) UC L8-70 M Beckman, (U.S.A.)
2. เครื่องเซนตริฟิวจ์ J2-21 Beckman, (U.S.A.)
3. เครื่องเซนตริฟิวจ์ TJ-6 Beckman, (U.S.A.)
4. เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ model H-3, Kokusan, (Japan)
5. เครื่องชั่ง Satorius model 2474, (Germany)
6. เครื่องชั่ง Mettler PJ 3000, (Germany)
7. เครื่องเก็บสารตัวอย่าง Fraction collector model 2110, Biorad, (U.S.A.)
8. Microtube pump MP-3 EYELA, (Japan)
9. Shimadzu UV-VIS recording spectrophotometer model UV 160 A, (Japan)
10. Power supply model 1000/500 Biorad, (U.S.A.)
11. เครื่อง Run gel Electrophoresis ATTA Co operation, (Japan)
12. pH meter model SA 230 (Orion research), (England)
13. Stir plate Nuova II (Thermolyne), (England)
14. ตู้อบ Napco model 630, (England)
15. ตู้แช่แข็ง Science Temp lo-cold Freeze Adrian, (U.S.A.)
16. ตู้แช่แข็ง Sanyo, (Japan)
17. Water bath (U.S.A.)
18. Mixer model K-550-GE (U.S.A.)
19. Liquid Scintillation Counter model LS 5000 TD Beckman (U.S.A.)

วิธีการ

2.1 การเก็บน้ำยางพารา

น้ำยางพาราพันธุ์ RRIM 600 เก็บจากสวนยาง ในหมู่บ้านทุ่งลุง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ซึ่งมีอายุประมาณ 20 ปี กรีดแบบเกลียวครึ่งรอบต้น กรีดวันเว้นวัน เวลาประมาณ 06:00 นาฬิกา โดยชาวบ้านเจ้าของสวนยาง การเก็บน้ำยางจะนำถ้วยพลาสติกซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลาไปรองรับน้ำยางใช้เวลาเก็บน้ำยางประมาณ 30 นาที รวบรวมน้ำยางที่ได้ใส่ขวดพลาสติกซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็ง นำกลับห้องทดลอง

2.2 การปั่นแยกน้ำยางพารา

นำน้ำยางพาราที่เก็บได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอดปั่น และนำไปปั่นด้วยเครื่องอุลตราเซนตริฟิวจ์ (Beckman L8-70 M ultracentrifuge) ใช้แรงเหวี่ยง 80,000 *g* เวลา 45 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 4 ชั้น ตามลักษณะความหนาแน่นของสารประกอบในน้ำยาง ชั้นบนสุดเป็นยางสีขาว (rubber fraction) ตามด้วยชั้นแถบสีเหลือง เรียกว่า "ฟรีวิสลิ่ง" (Frey-Wyssling particles) ชั้นของเหลวใส เรียกว่า "ซี-ซีรั่ม" (C-serum) และชั้นล่างสุด เป็นสารข้นสีเหลืองอ่อน หรือชั้นของตะกอนก้นหลอด (bottom fraction) ดังรูปที่ 5

2.3 การเก็บส่วนของชั้นซี-ซีรั่ม และชั้นของตะกอนก้นหลอด

ใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะผ่านเนื้อยาง ดูดเอาชั้นซี-ซีรั่มออกจากน้ำยางพาราที่ปั่นแยกชั้นแล้วในข้อ 2.2 กรองผ่านผ้าขาวบางแล้วนำไปใส่หลอด หมุนเหวี่ยงซ้ำด้วยแรงเหวี่ยงสูง (Model J2-21 Beckman) 15,000 *g* เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใส ๆ ใส่หลอดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไปและชั้นฟรีวิสลิ่งใช้ปาสเตอร์ไปเปต ดูดเบา ๆ แยกออกจากส่วนของยางนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเช่นกัน

การเก็บส่วนของตะกอนก้นหลอด ทำหลังจากแยกเอาส่วนของเนื้อยาง ฟรีวิสลิ่งและซี-ซีรั่มออก แล้วใช้ช้อนตักสารตักเอาตะกอนก้นหลอดที่มีสีเหลืองอ่อนมารวมกันและเติม 0.1 M

Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นด้วยแรง 3,400 *g* (Beckman Model TJ-6 centrifuge) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนใสทิ้งเพื่อล้างส่วนที่อาจเจือปนจาก ซี-ซีรั่มออก นำส่วนที่เป็นตะกอนหรือสารก้นหลอดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสเพื่อศึกษาต่อไป

2.4 การหาความว่องไวของเอนไซม์

การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยอาศัยปฏิกิริยา

acetyl CoA + acetoacetyl CoA + H_2O $\longrightarrow$ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA + CoA

อาจทำได้ 2 วิธี ดังนี้ การวัดโดยอาศัยการดูดกลืนแสง (spectrophotometric assay) วิธีนี้วัดการดูดกลืนแสงที่ ลดลงที่ 300 นาโนเมตร ของ acetoacetyl CoA ที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยา การดูดกลืนแสงที่ลดลงนี้จะแปรผันตามปริมาณของ acetoacetyl CoA ที่ถูกใช้ไปในการสังเคราะห์ HMG-CoA ในปฏิกิริยา สารที่ใช้ทำปฏิกิริยาในวิธีนี้ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM acetyl CoA, 0.05 mM acetoacetyl CoA และ HMG-CoA synthase (3-30 mUnit) มี ปริมาตรรวมทั้งหมด 1 มิลลิลิตร โดยขั้นต้นอุ่นสารละลายทั้งหมดที่ยังไม่เติม 0.5 mM acetyl CoA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม 0.5 mM acetyl CoA นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร (Miziorko 1985)

ในการศึกษานี้ ใช้วิธีที่อาศัยสารกัมมันตรังสี (radiochemical assay) โดยวัดปริมาณของ ^{14}C-HMG-CoA ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาโดยตรงสารที่ใช้ประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2, 0.1 mM EDTA, 0.05 mM acetoacetyl CoA และสารละลายตัวอย่างที่มีเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม ^{14}C-acetyl CoA (54.9 mCi/mmole) ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5 mM ปริมาตรรวมทั้งหมด 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วแบ่งสารในปฏิกิริยานี้ 40 ไมโครลิตร ใส่ในขวดแก้วที่บรรจุ 6 M HCl 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปใส่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัด ^{14}C-acetyl CoA ที่หลงเหลือในปฏิกิริยาให้หมดไป เหลือแต่ ^{14}C-HMG-CoA ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาข้างต้น (Miziorko 1985) นำไปหาปริมาณ ^{14}C-HMG-CoA โดยใช้เครื่องวัด

กัมมันตภาพรังสี (Liquid Scintillation Counter ; Beckman) ต่อไปการวัดปริมาณ ^{14}C-HMG-CoA ทำได้โดยเติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เพื่อละลาย ^{14}C-HMG-CoA ที่แห้งติดอยู่กับขวดแก้ว เติมสารละลายที่ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี (liquid scintillation cocktail) 5 มิลลิลิตร สารละลายนี้ประกอบด้วย xylene ร้อยละ 75, Triton X-114 ร้อยละ 25, PPO ร้อยละ 0.3 และ dimethyl POPOP ร้อยละ 0.02 (Anderson และ McClure 1973) แล้วนำไปวัดค่า^{14}C-HMG-CoA ในเครื่องวัดสารกัมมันตรังสี

ในการหาความว่องไวของสารตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง ต้องทำการทดลอง โดยมีหลอดที่มีเอนไซม์ที่ต้มแล้ว เป็นตัวควบคุม และทำตามขั้นตอนของปกติทุกอย่าง จากนั้นนำค่าที่วัดได้จากเครื่องวัดสารกัมมันตรังสีของหลอดที่มีเอนไซม์ต้ม ไปหักลบออกจากค่าที่ได้จากหลอดที่มีเอนไซม์โดยไม่ต้ม ผลต่างนี้จะเป็นค่าของ ^{14}C-HMG-CoA ในปฏิกิริยา

การคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

ในการศึกษาความว่องไวของHMG-CoA synthase โดยอาศัยปฏิกิริยา

acetyl CoA + acetoacetyl CoA + H_2O $\longrightarrow$ 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA + CoA

และใช้สาร ^{14}C-acetyl CoA เพื่อสังเคราะห์เป็น ^{14}C-HMG-CoA นั้นจะเห็นว่า ^{14}C-acetyl CoA 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็น ^{14}C-HMG-CoA ได้ 1 โมเลกุลเช่นกัน ในปฏิกิริยานี้ได้ใช้ ^{14}C-acetyl CoA 54.9 mCi/mmole 5 ไมโครลิตร ผสมกับ acetyl CoA ที่มิใช่สารกัมมันตรังสี ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ดังนั้น radiospecificity ของ ^{14}C-acetyl CoA ในสารละลายนี้คือ 80 μCi/mmole เพื่อความถูกต้องในการคำนวณหา radiospecificity ของ ^{14}C-acetyl CoA ในสารละลายที่ใช้ในการทดลอง จึงได้ทำการวัดปริมาณสารกัมมันตรังสีของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา 40 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ^{14}C-acetyl CoA และ^{14}C-HMG-CoA ที่เกิดขึ้นโดยไม่มีการทำให้ ^{14}C-acetyl CoA สลาย ตัว เป็น CO_2 เพื่อหาว่า acetyl CoA 5 x10^{-5} mmole จะมี radioactivity กี่ dpm ประกอบการคำนวณหาความว่องไวของเอนไซม์ต่อไป การหา radiospecificity นี้ทำได้โดยนำสารละลายที่ทำปฏิกิริยา 40 ไมโครลิตร ใส่ในขวดแล้วเติม 0.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น และสารละลายที่ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี 5 มิลลิลิตร นำไปวัดกัมมันตภาพรังสี ปกติมักจะได้ค่าเฉลี่ย 3256 dpm

ในกรณีของสารตัวอย่างก็เช่นกัน นำสารละลายที่ทำปฏิกิริยา 40 ไมโครลิตร ใส่ในขวดที่มี 6 M HCl 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเผาในตู้อบ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เพื่อให้ ^{14}C-acetyl CoA ที่เหลือจากปฏิกิริยาให้สลายเป็น CO_2 ต่อจากนั้นเติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เพื่อละลายผลิตภัณฑ์ ^{14}C-HMG-CoA ที่แห้งติดขวด แล้วเติมสารละลายที่ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี 5 มิลลิลิตร นำไปวัดกัมมันตภาพรังสี หากตัวอย่างเป็นซี-ซีรั่ม มักจะได้ค่าประมาณ 1349 dpm

นอกจากนี้ยังจะต้องมีหลอดควบคุม เพื่อให้การทดลองถูกต้องโดยทำการทดลองเหมือนสารตัวอย่าง แต่ใช้เอนไซม์ที่ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที มาทำปฏิกิริยา ส่วนใหญ่มักจะวัดค่ากัมมันตภาพรังสีได้ประมาณ 173 dpm ในกรณีของซี-ซีรั่ม ในการคำนวณจะต้องนำค่ากัมมันตภาพรังสีจากหลอดควบคุมไปหักออกจากค่าที่ได้ จากการใช้สารละลายตัวอย่าง คือ 1349-173 เท่ากับ 1176 dpm

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u>

สารละลายในปฏิกิริยาที่มี ^{14}C-acetyl CoA 40 µl อ่านได้ = 3256 dpm

สารละลายในปฏิกิริยาที่มี ^{14}C-acetyl CoA 100 µl อ่านได้ = 3256 x 100/40 dpm

= 8140 dpm

ในสารละลายที่ทำปฏิกิริยา 100 µl มี acetyl CoA = 0.5 mM จะเกิด HMG-CoA = 0.5 mM ด้วย ดังปฏิกิริยา

^{14}C-acetyl CoA + acetoacetyl CoA + $H_2O \rightarrow$ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA + CoA

0.5 mM acetyl CoA มีเนื้อสาร = 0.5 mmole/l

= 0.5 µmole/ml

นั่นคือ 1000 µl มีเนื้อสาร HMG-CoA = 0.5 µmole

100 µl มีเนื้อสาร HMG-CoA = 0.5 x 100/1000 µmole

= 0.05 µmole

อนึ่ง ในการคำนวณนี้ถ้าจะให้ได้ค่าถูกต้อง 100 % จะต้องนำปริมาณของ ^{14}C-acetyl CoA ที่อยู่ในปฏิกิริยารวมกับ acetyl CoA ธรรมดาโดยอาศัยข้อมูลของ ^{14}C-acetyl CoA (54.9 mCi/ mmole) ที่ใช้ซึ่งมีปริมาณสาร 0.364 µmole/ml ที่ใช้ในการ เตรียมสารละลาย ^{14}C-acetyl CoA โดยใช้ 5 µl ของ ^{14}C-acetyl CoA 0.364 µmole/ml ผสมกับ 5.0 mM acetyl CoA 250 µl

ในสารละลาย 255 µl นี้จะมี acetyl CoA อยู่ = 1250 + 1.82 nmole

ในสารละลาย 1 µl นี้จะมี acetyl CoA อยู่ = 1251.82/255 nmole

ในสารละลาย 100 µl นี้จะมี acetyl CoA อยู่ = 490.91 nmole/ 100 µl

จะเห็นได้ว่าปริมาณ acetyl CoA ที่มาจาก ^{14}C-acetyl CoA นั้น มิได้ทำให้ความเข้มข้นของ acetyl CoA ในสารละลายเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (500 nmole/ 100 µl กับ 490.91 nmole/ 100 µl) การศึกษานี้ต่างจากการศึกษาของผู้อื่น ซึ่งใช้ ^{14}C-acetyl CoA โดยตรงในการ ทดลอง ส่วนการศึกษานี้ได้ทำให้สารกัมมันตรังสีลดลงไปประมาณ 50 เท่าก่อนใช้ สารละลายที่วัดค่ากัมมันตภาพรังสีได้ 8140 dpm มาจาก ^{14}C-acetyl CoA ที่อาจเปลี่ยนเป็น ^{14}C-HMG-CoA ได้เท่ากับ 0.05 µmole หรือ 1 dpm มี ^{14}C ที่มาจาก ^{14}C-acetyl CoA ที่อาจเปลี่ยนเป็น ^{14}C-HMG-CoA ได้

$= 0.05 \times 1/8140$ µmole

$= 0.05 \times 10^3/8140$ nmole

$= 6.14 \times 10^{-3}$ nmole

นั่นคือ หากวัดค่ากัมมันตรังสีที่ได้จากการทดลองนี้ 1 dpmแสดงว่าปฏิกิริยาเกิด HMG-CoA 6.14×10^{-3} nmole จากตัวอย่างที่วัดค่ากัมมันตภาพรังสีได้ 1176 dpm จากสารละลาย 40 µl

สารละลาย 40 µl วัดได้ = 1176 dpm

สารละลาย 100 µl วัดได้ = 1176 x 100/40 dpm

= 2940 dpm

เมื่อนำมาคำนวณเป็น ^{14}C-HMG-CoA หน่วยเป็น nmole

1 dpm เทียบได้กับ HMG-CoA = 6.14×10^{-3} nmole

2940 dpm เทียบได้กับ HMG-CoA = $6.14 \times 10^{-3} \times 2940$ nmole

= 18.05 nmole

HMG-CoA ที่เกิดขึ้นนี้ เกิดขึ้นภายในเวลา 2 นาที

ดังนั้น สารตัวอย่าง จึงมีความว่องไว = 18.05/2 = 9.025 nmole/min

ปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ = 10 µl

หากสารตัวอย่างนี้คือ ซี-ซีรั่ม ที่มีปริมาณโปรตีน = 13 mg/ml = 0.13 mg/ 10 µl

ดังนั้นความว่องไวจำเพาะ (specific activity) ของ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่ม

= 9.025/0.13 = 69.42 nmole/min/mg protein

2.5 การหาความว่องไวของเอนไซม์ในน้ำยางพาราที่แยกเป็นส่วนๆ

นำส่วนของน้ำยางพาราที่แยกเป็นส่วนของซี-ซีรั่ม ฟรีวิสลิ่ง และตะกอนก้นหลอด ไปหาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase เพื่อศึกษาดูว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase มีความว่องไวสูงสุดอยู่ที่ส่วนใดของน้ำยาง

การหาความว่องไวของเอนไซม์ ในส่วนของซี-ซีรั่ม นำสารละลายที่ประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2, 0.1 mM EDTA, 0.05 mM acetoacetyl CoA และซี-ซีรั่ม 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม 0.5 mM ^{14}C-acetyl CoA ผสมให้เข้ากันดีนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนผสมในปฏิกิริยาปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใส่ในขวดแก้วที่บรรจุ 6 M HCl 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี นำไปใส่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปหาสารกัมมันตรังสีต่อไป

สำหรับการหาความว่องไวของเอนไซม์ ในส่วนของตะกอนก้นหลอด ที่แยกได้ในข้อ 3.มาเติมสารละลาย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ในอัตราส่วน 1:1 และเติม deoxycholic acid ร้อยละ 0.4 ลงไปในอัตราส่วน 7:1 เพื่อช่วยให้ตะกอนละลายได้ดีขึ้น แล้วบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด (homogenizer) ปั่นด้วยแรง 3,400 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส ไปหาความว่องไวของเอนไซม์ต่อไป

สำหรับการหาความว่องไวของเอนไซม์ ในส่วนของฟรีวิสลิ่งนั้น ทำเช่นเดียวกับในส่วนของตะกอนก้นหลอด

2.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิ ในการเก็บซี-ซีรั่ม ต่อความว่องไวของเอนไซม์

นำส่วนของซี-ซีรั่ม ที่ปั่นแยกได้จากน้ำยางพาราแบ่งเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 นำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ทันที หลอดที่ 2 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ ส่วนหลอดที่ 3 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปหาความว่องไวของเอนไซม์

2.7 การศึกษาผลของระยะเวลาต่อความว่องไวของเอนไซม์ ที่เก็บในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

นำส่วนของซี-ซีรั่ม ที่ปั่นแยกได้ แบ่งเก็บเป็นหลายๆ หลอด นำส่วนหนึ่งไปหาความว่องไวของเอนไซม์ทันทีที่ปั่นแยกได้ ส่วนหลอดที่เหลือนำไปเก็บในตู้เก็บสารอุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียส แล้วนำออกมาหาความว่องไวของเอนไซม์ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ตามลำดับ

2.8 การทดสอบผลของสารต่างๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ ในซี-ซีรั่ม

2.8.1 ผลของเกลือต่อความว่องไวของเอนไซม์ ในซี-ซีรั่ม

การศึกษาผลของเกลือต่อความว่องไวของเอนไซม์ ทำได้โดยเตรียมซี-ซีรั่ม ในรูปแบบต่าง ๆ กัน 4 แบบ คือ

1. ซี-ซีรั่มที่ไม่เจือจาง
2. ซี-ซีรั่มที่เจือจาง 1:3 โดยใช้ 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมกับซี-ซีรั่ม 1 มิลลิลิตร
3. ซี-ซีรั่มที่เจือจางด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ที่มีเกลือ 0.2 M NaCl ในอัตราส่วน 1:3 เช่นเดียวกับข้อ 2 โดยนำซี-ซีรั่ม 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และเติมด้วย 0.4 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร
4. ซี-ซีรั่มที่มีเกลือ 0.2 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 และกลีเซอรอลอยู่ร้อยละ 30 (ซี-ซีรั่ม 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และตามด้วย 0.4 M NaCl ในกลีเซอรอลร้อยละ 60 ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร) ซึ่งถูกเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:3 ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ที่มีเกลือ 0.2 M NaCl

นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ทั้ง 4 แบบนี้ มาแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ชุดที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ เพื่อศึกษาผลของการทำให้ซี-ซีรั่มเจือจาง และผลของเกลือต่อความว่องไวของเอนไซม์ ในช่วงเวลาที่ต่างกัน คือ 2 ชั่วโมง

30 นาที และ 24 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังศึกษา ผลของการทำให้สารตัวอย่างเจือจางลง 1:3 และ 1:6 รวมทั้งศึกษา ผลของเกลือ ในกรณีที่ความเข้มข้นของซี-ซีรั่ม เจือจางลงเป็น 1:6 โดยเตรียม ซี-ซีรั่ม ในรูปแบบต่าง ๆ 5 รูปแบบ คือ

1. ซี-ซีรั่มที่ไม่ได้ทำให้เจือจาง
2. ซี-ซีรั่มถูกทำให้เจือจางด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ในอัตราส่วน 1:3
3. ซี-ซีรั่มที่ถูกเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:6 (ใช้ซี-ซีรั่ม ความเข้มข้น 1:3 จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 จำนวน 200 ไมโครลิตร)
4. ซี-ซีรั่มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 ที่มี 0.2 M NaCl อยู่ด้วย (ใช้ซี-ซีรั่มความเข้มข้น 1:3 จำนวน 200 ไมโคร ลิตร ผสมกับ 0.4 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 จำนวน 200 ไมโครลิตร)
5. ซี-ซีรั่มที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 1:6 ที่มี 0.2 M NaCl และกลีเซอรอลร้อยละ 30 (ใช้ซี-ซีรั่มความเข้มข้น 1:3 จำนวน 200 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.4 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ที่มีกลีเซอรอลร้อยละ 60 จำนวน 200 ไมโครลิตร)

นำตัวอย่างที่เตรียมทั้ง 5 แบบนี้ แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ชุดที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของการทำให้ซี-ซีรั่มเจือจาง และอิทธิพลของเกลือใน ซี-ซีรั่มที่เจือจางต่อความว่องไวของเอนไซม์ ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

2.8.2 ผลของไอโอโดอะเซตาไมด์ (iodoacetamide) ต่อความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่ม

การทดลองศึกษาผลของไอโอโดอะเซตาไมด์ 30 mM ต่อความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่มโดยเตรียมไอโอโดอะเซตาไมด์ให้มีความเข้มข้น 120 mM ทำการทดลอง 2 ชุด ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุม คือ ไม่ใส่สารไอโอโดอะเซตาไมด์ และชุด ที่ 2 ซึ่งส่วนผสมของสารที่ใช้ทำปฏิกิริยาเหมือนกับชุดที่ 1 เพียงแต่เติมไอโอโดอะเซตาไมด์ ให้มีความเข้มข้นเป็น 30 mM แล้วหาความว่องไวของเอนไซม์เช่นเดียวกับข้อ 2.4

2.8.3 **ผลของไดไธโอทรีทอล (dithiothreitol; DTT) ต่อความว่องไวของเอนไซม์ ในซี-ซีรั่ม**

ในการศึกษาผลของไดไธโอทรีทอล 10 mM ต่อความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่ม โดยทำการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุมไม่ใส่ไดไธโอทรีทอล ชุดที่ 2 ใส่ไดไธโอทรีทอลให้มีความเข้มข้นเป็น 10 mM แล้วศึกษาวิธีการหาความว่องไวของเอนไซม์ ในการทดลองที่มี และไม่มีไดไธโอทรีทอล 10 mM อยู่ด้วย เปรียบเทียบกันโดยใช้วิธีในข้อ 2.4

2.9 การแยกเอนไซม์จาก ซี-ซีรั่ม ให้บริสุทธิ์

การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase ออกจากส่วนของซี-ซีรั่มโดยอาศัยวิธีการทางชีวเคมีรูปแบบต่าง ๆ ส่วนใหญ่จะอาศัยเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟี่ ในการศึกษานี้ ได้ศึกษาโดยการใช้ซี-ซีรั่ม จากน้ำยางพาราในข้อ 2.3 ผ่านลงในคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ เช่น คอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ G-75 แล้วผ่านลงใน DE-52 หรือนำซี-ซีรั่ม ผ่านลงในคอลัมน์ DE-52 ก่อนแล้วผ่านลงในเซฟาเด็กซ์ G-75 หรือนำ ซี-ซีรั่ม ผ่านลงในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-25 ก่อน หรือใช้การตกตะกอนโปรตีน โดยการปรับ pH แล้วนำส่วนใสผ่านลงในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-100 แล้วผ่านต่อคอลัมน์ CM-cellulose

2.9.1 การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

2.9.1.1 การเตรียม CM-cellulose cation exchanger ทำได้โดยแช่ CM-cellulose 10 กรัม ใน 0.5 M HCl 300 มิลลิลิตร เป็นเวลาประมาณหนึ่งชั่วโมง เทส่วนใสทิ้งล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH มีค่า เป็นกลาง เติม 0.5 M NaOH แช่ไว้ประมาณหนึ่งชั่วโมง เทส่วนใสทิ้งล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH มีค่าเป็นกลาง เติม 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 แช่ไว้ประมาณ 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 7.5 จนได้ pH 7.5

2.9.1.2 นำ CM-cellulose ที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 3 cm. x 9 cm. นำซี-ซีรั่ม 18 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองที่มี CM-cellulose แล้ว คนเบา ๆ ให้ C-serum ได้สัมผัสกับ CM–cellulose ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำไปปั่นด้วยแรง 710 *g* ในเซ็นตริฟิวจ์ (Beckman Model J2-21) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 อาศาเซลเซียส เก็บส่วนใสและนำไปเติมกลีเซอรอล (glycerol) ให้มีความเข้มข้นของ

กลีเซอรอล เป็นร้อยละ 30 แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยเซ็นตริฟิวจ์ ผ่าน centriflo membrane cone CF-25 ซึ่งสามารถแยกสารน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 25,000 ดาลตัน ออกด้วยแรง 600 *g* (Beckman Model TJ-6 centrifuge) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำจนกระทั่งได้ความเข้มข้นตามต้องการนำไปหาปริมาณโปรตีน และความว่องไวของเอนไซม์

2.9.2 การแยกเอนไซม์โดยใช้เจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

นำเอนไซม์ที่ได้ในข้อ 2.9.1 ผ่านคอลัมน์ขนาด1.3 cm. x 16 cm.ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ G-75 ที่แช่ให้พองแล้วขนาด และล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ปริมาตรไม่น้อยกว่า 3 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้แยกเอนไซม์ต่อไป

เมื่อใส่เอนไซม์จากข้อ 2.9.1 ลงในคอลัมน์แล้ว จึงชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 2 มิลลิลิตร ติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก ตรวจหาความว่องไวของเอนไซม์ในหลอดที่เก็บไว้ทุกๆ 3 หลอด และเติมกลีเซอรอล ในหลอดที่มีความว่องไวของเอนไซม์ ให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 30 นำหลอดที่มี ความว่องไวของเอนไซม์สูงมารวมกัน นำไปทำให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นโดยผ่าน centriflo membrane cone CF-25 และปั่นด้วยแรง 600 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จนได้ปริมาตร หรือความเข้มข้นตามต้องการ แบ่งไปหาความว่องไวของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน เอนไซม์ที่แยกได้ในขั้นตอนนี้จะถูกนำไปใช้เป็นเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน (partially purified enzyme)

2.9.3 การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose

การเตรียมคอลัมน์ DEAE-cellulose ทำโดยนำ DEAE-cellulose ที่ผ่านการแช่ใน 0.5 M NaOH, 0.5 M HCl ล้างด้วยน้ำจนเป็นกลาง และแช่ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ใส่ลงในคอลัมน์ขนาด 1.2 ซม. x 8 ซม. ล้างคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ปริมาตรประมาณ 10 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายที่แยกได้จากข้อ 2.9.2 ใส่ลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose ชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ด้วยอัตราการไหล 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1.2 มิลลิลิตร

ติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาแล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 0.1 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 และเติมกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 30 ในหลอดที่เก็บสารทุกหลอดและติดตามการแยกโปรตีน โดยนำแต่ละหลอดไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งบัฟเฟอร์ที่ผ่านคอลัมน์มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ จึงชะคอลัมน์ ด้วยบัฟเฟอร์ใหม่ คือ 0.2 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 และติดตามการแยกโปรตีน โดยนำแต่ละหลอดไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งบัฟเฟอร์ที่ผ่านคอลัมน์ มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร มีค่าเข้าใกล้ศูนย์ นำสารละลายที่เก็บได้จากคอลัมน์ ไปหาความว่องไวของเอนไซม์ทุก ๆ 3 หลอด รวมสารละลายที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงของแต่ละหลอดเข้าด้วยกัน

2.10 การตกตะกอนเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม ด้วยอะซีโตนที่เย็น

นอกจากจะแยกเอนไซม์โดยวิธีในข้อ 2.9 แล้ว ในบางกรณีได้ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย อะซีโตนก่อนนำไปทำการแยกต่อไป ตามข้อ 2.10.1

2.10.1 เติมอะซีโตนแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีซี-ซีรั่ม 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (Beckman model J2-21) ด้วยแรง 10,000 *g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยอะซีโตนที่เย็น 3 ครั้งนำตะกอนที่ได้มาละลายใน 50 mM โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน centriflo membrane cone CF-25 จนปริมาตรลดจาก 11 มิลลิลิตร เหลือ 3 มิลลิลิตร

2.10.2 นำสารละลายโปรตีนที่แยกได้ในข้อ 2.10.1 จำนวน 2.4 มิลลิลิตร ไปทำให้บริสุทธิ์ขโดยใส่ลงในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-75 ขนาด 1.3 ซม. x 30 ซม. ชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ด้วยอัตราเร็ว 17 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บ หลอดละ 1.7 มิลลิลิตร แล้วติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก ตรวจหาความว่องไวของเอนไซม์ในหลอดที่เก็บไว้ทุก ๆ 3 หลอด นำหลอดที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงมารวมกันได้ 14 มิลลิลิตร แบ่งไป 13 มิลลิลิตร

ทำให้มีความเข้มข้นขึ้นโดยผ่าน centriflo membrane cone CF-25 เหลือ 3.4 มิลลิลิตร หา ปริมาณโปรตีน และความว่องไวของเอนไซม์

2.10.3 นำสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้ในข้อ 2.10.2 จำนวน 2.8 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ sephacryl S-200 ขนาด 1.3 ซม. x 16 ซม. ชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ด้วยอัตราความเร็ว 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บหลอดละ 1.2 มิลลิลิตร แล้วติดตามการแยกโปรตีน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก ตรวจหาความว่องไวของเอนไซม์ในหลอดที่เก็บไว้ทุก ๆ 3 หลอด นำหลอดที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงมารวมกันได้ 6.6 มิลลิลิตร

2.11 การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ที่แยกได้

2.11.1 ผลของ acetyl CoA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ในการศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ที่ผ่านขั้นตอนการแยกได้จากขั้นตอนผ่านคอลัมน์ CM-cellulose และผ่านต่อในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 แล้ว ใช้เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วนแล้วนี้ 10 ไมโครลิตร เท่ากัน แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของ ^{14}C-acetyl CoA ที่ใช้ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 และ 1.5 mM ตามลำดับ หาความว่องไวของเอนไซม์ที่มี ^{14}C-acetyl CoA ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยวิธีในข้อ 2.4

2.11.2 ผลของ acetoacetylCoA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ที่ผ่านการแยกโปรตีนอื่นๆ ออกเพียงบางส่วนจากขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน CM-cellulose และ เซฟาเด็กซ์ G-75 โดยใช้เอนไซม์ 10 ไมโครลิตรเท่ากัน แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของ acetoacetyl CoA ที่ใช้ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่างๆ กันคือ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 mM ตามลำดับ หาความว่องไวของเอนไซม์ ที่มี acetoacetyl CoA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใช้ acetyl CoA 0.5 mM โดยวิธีในข้อ 2.4

2.11.3 ผลของ pH ต่างๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

การทดลองนี้ ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์เช่นเดียวกับในข้อ 2.4 โดยใช้

เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน และเอนไซม์จากซี-ซีรั่ม 10 ไมโครลิตร เท่ากัน แต่เปลี่ยนแปลง pH ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง โดยมี pH ดังนี้ คือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 7.0, 7.5, 8.0, 8.2, 8.5 และ 9.0 โดยที่ pH 5.0 และ 5.5 ใช้อะซีเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) ที่ pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) และที่ pH 8.2, 8.5, และ 9.0 ใช้ Tris-HCl บัฟเฟอร์ เพื่อเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์บ้างแล้ว และเอนไซม์ที่ยังอยู่ในซี-ซีรั่ม ว่าจะมีความว่องไวสูงสุดที่ pH ใด

2.11.4 ผลของ EDTA ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ใช้เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน 10 ไมโครลิตร ศึกษาหาความว่องไวของเอนไซม์ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ ที่มี EDTA ผสมอยู่ด้วย 0.1 mM EDTA และ Tris-HCl บัฟเฟอร์ ที่ไม่มี EDTA ผสมอยู่ โดยทำการ ทดลองตามรายละเอียดในข้อ 2.4

2.11.5 ผลของไอโอโดอะเซตาไมด์ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

การศึกษาหาความว่องไวของเอนไซม์ ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน โดยใช้เอนไซม์จำนวน 10 ไมโครลิตรเท่ากัน ทำการทดลองโดยใช้วิธีข้อ 2.4 และมีไอโอโดอะเซตาไมด์ ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 30, 60, และ 100 mM ตามลำดับ เปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ ในกรณีที่ ศึกษาโดยมีไอโอโดอะเซตาไมด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ กันกับไม่มีไอโอโดอะเซตาไมด์อยู่

2.11.6 ผลของไดไธโอทรีทอล ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน โดยใช้เอนไซม์จำนวน 10 ไมโครลิตรในปฏิกิริยาที่มีไดไธโอทรีทอล ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 2, 4, 10, 20, 40 และ 60 mM ตามลำดับ และเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ โดยวิธีในข้อ 2.4

2.11.7 ผลของเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน 10 ไมโครลิตร ในสภาวะที่มี NaCl ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 M ตามลำดับ เปรียบเทียบ ความว่องไวของเอนไซม์นั้น ตามวิธีในข้อ 2.4

2.11.8 ผลของไอออนต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน โดยใช้

เอนไซม์ 10 ไมโครลิตร ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของไอออนต่าง ๆ เป็น 0 และ 10 mM ไอออนที่ใช้มี Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Fe^{2+} อยู่ด้วย สำหรับ Fe^{2+} นั้นศึกษาโดยใช้ Fe^{2+} ที่ละลายในน้ำกลั่น และที่ละลายใน 0.01 M HCl โดยวิธีในข้อ 2.4

2.11.9 ผลของ SDS ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน โดยใช้เอนไซม์ จำนวน 10 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาที่มี SDS ความเข้มข้น 0 และ 3 mM โดยวิธีในข้อ 2.4

2.12 การตรวจหา HMG-CoA lyase ในเอนไซม์ที่แยกได้

ในการศึกษาHMG-CoA synthase นั้นหากเอนไซม์ที่เตรียมได้มี เอนไซม์ HMG-CoA lyase ปนอยู่ด้วย เอนไซม์นี้จะสลาย HMG-CoA ให้กลายเป็น acetoacetate และ acetyl CoA ดังปฏิกิริยา

$$\text{HMG-CoA} \xrightarrow{\text{HMG-CoA lyase}} \text{acetoacetate} + \text{acetyl CoA}$$

ซึ่งจะทำให้การศึกษาหาความว่องไวของHMG-CoA synthase ไม่ถูกต้อง จำเป็นต้องทำลาย HMG-CoA lyase เสียก่อนโดยการไดอะไลส์ (dialyse) ตัวอย่างที่มีเอนไซม์ อย่างไรก็ตามหากเอนไซม์ ที่ศึกษาไม่มี HMG-CoA lyase อยู่ด้วย ก็ไม่จำเป็นต้องมีการไดอะไลส์สารตัวอย่างที่มีเอนไซม์ก่อนการวิเคราะห์หาความว่องไวของ HMG-CoA synthase ในการศึกษาว่าสารตัวอย่างมี HMG-CoA lyase อยู่ด้วยหรือไม่ ทำได้โดยติดตามการสลาย ของ^{14}C-HMG-CoA ในขณะที่มีสารตัวอย่างอยู่ด้วย การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA lyase โดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนเพียงบางส่วน จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับ ^{14}C-HMG-CoA (10 mM) จำนวน 5 ไมโครลิตร แทน ^{14}C-acetyl CoA และอุ่นที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที ตามลำดับติดตามดูปริมาณ ^{14}C-HMG-CoA ที่มีอยู่ในปฏิกิริยาโดยการแบ่งสารละลายเติมลงไปใน 6 M HCl 0.1 มิลลิลิตร อบให้แห้งแล้วเติมน้ำ และสารละลายที่ใช้สำหรับวัดสารกัมมันตรังสี หากปริมาณ ^{14}C-HMG-CoA ในสารละลายที่ทำปฏิกิริยาลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าสารตัวอย่างมี HMG-CoA lyase อยู่ด้วย

2.13 การศึกษาว่าเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม ที่แยกได้ในขั้นตอนต่าง ๆ มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นหรือไม่ โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็คโทรโฟเรซิส (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

ในการศึกษาว่าเอนไซม์ในซี-ซีรั่มที่แยกได้ตามขั้นตอนต่างๆ กัน ว่ามีความบริสุทธิ์สูงขึ้นหรือไม่นั้นอาจทำได้โดยนำตัวอย่างไปทำการแยกโดยใช้ โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ซึ่งทำได้ 2 วิธี คือ การทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในสภาพธรรมชาติ (non SDS gel electrophoresis) และการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยมี SDS อยู่ด้วย (SDS gel electrophoresis)

2.13.1 การทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในสภาพธรรมชาติ

การศึกษาเอนไซม์ที่แยกได้ในโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ทำได้โดยนำเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกไปบางส่วน โดยใช้ CM-cellulose จับโปรตีนบางส่วน และเอนไซม์ในส่วนที่ไม่จับกับ CM-cellulose นี้ ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ G-75 และนำส่วนที่มีเอนไซม์นี้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย centriflo membrane cone CF-25 ก่อนไปทำอิเล็กโทรโฟเรซิส เพื่อติดตามดูว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ถึงขั้นนี้ ยังมีโปรตีนอื่น ๆ ปนอยู่อีกหรือไม่ และเอนไซม์นี้จะมีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเป็นอย่างไรโดยติดตามดูความว่องไวของเอนไซม์ว่าอยู่ในตำแหน่งใดของเจล โดยนำเอนไซม์ที่เตรียมได้ข้างต้นประมาณ 100 ไมโครกรัม ไปทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยดัดแปลงวิธีของ Davis (1968) ซึ่งใช้โพลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้นร้อยละ 3.5 ใน 0.125 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน (stacking gel) และโพลีอะคริลาไมด์ เจล ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ใน 0.375 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.8 เป็นเจลสำหรับแยกสาร (separation gel) สำหรับบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส คือ 0.025 M Tris-0.192 M glycine pH 8.3 ควบคุมกระแสไฟฟ้าให้คงที่ 3 มิลลิแอมแปร์ต่อ 1 ช่องซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที และนำแผ่นเจลที่ได้ไปตัดตามช่องที่มีตัวอย่าง และตัดซอยให้เป็นแถบขนานกันตลอดโดยให้มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร และนำแต่ละชิ้นเจลที่ตัดได้ไปบดให้ละเอียด โดยใช้ 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ประมาณ 50 ไมโครลิตร นำสารละลายส่วนใสที่สกัดได้ไปหาความว่องไวของเอนไซม์ ตามวิธีการ ข้อ 2.4 เมื่อหาตำแหน่งของเจลที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงสุดได้แล้ว นำสารละลายที่ได้จากการสกัดเจลในตำแหน่งนั้น ไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยมี SDS อยู่ด้วย เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลต่อไป

2.13.2 การทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยมี SDS อยู่ด้วย

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ ซี-ซีรั่ม, เอนไซม์ที่อยู่ในส่วนที่ไม่จับกับ CM–cellulose,เอนไซม์ที่แยกโดยเซฟาเด็กซ์ G-75 และชะด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2, เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโดย DEAE-cellulose ที่ชะด้วย 0.1 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 และ 0.2 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ปริมาณ 50 ไมโครกรัม และเอนไซม์ที่แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส เพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว 6 ตัว คือ ฟอสโฟรีเลสบี (phosphorylase b; M.W. 94,000 ดาลตัน) โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin; MW 67,000 ดาลตัน) อัลบูมินจากไข่ (ovalbumin, MW 43,000 ดาลตัน) คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (carbonic anhydrase; MW 30,000 ดาลตัน) ทริพซินอินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor; MW 20,000 ดาลตัน) และแอลฟา-แลคตาบูมิน (α-lactalbumin; M.W.14,000 ดาลตัน) นำตัวอย่างต้มในสารละลายของ เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล (beta-mercaptoethanol) ร้อยละ 5, SDS ร้อยละ 1 โบรโมฟีนอลบลู ร้อยละ 0.005 และกลีเซอรอล ร้อยละ 5 ใน 0.063 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 6.8 ในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที โดยใช้อัตราส่วนสารตัวอย่างต่อสารละลายผสมนี้ เท่ากับ 1:1 ก่อนใส่ลงในแผ่นเจล (slab gel) ขนาด 6 x 9 x 0.1 เซนติเมตร ซึ่งประกอบด้วยเจลชั้นบน และเจลแยกสาร ใช้โพลีอะคริลาไมด์เจล ร้อยละ 3.5 ซึ่งมี SDS อยู่ร้อยละ 0.1 ใน 0.125 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 6.8 เป็นเจลชั้นบน ส่วนเจลชั้นล่างสำหรับแยกสารเป็นเจลที่มีความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ เจล แตกต่างกัน (gradient) ระหว่างร้อยละ 7 และร้อยละ 15 ใน SDS ร้อยละ 0.1 ใน 0.375 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.8 บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟเรซิส คือ 0.025 M Tris-HCl 0.192 M ไกลซีน pH 8.3 และมี SDS อยู่ร้อยละ 0.1 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli และ Favre (1973) ควบคุมกระแสไฟฟ้า ให้คงที่ 3 มิลลิแอมแปร์ต่อ 1 ช่อง จนกระทั่งสีของโบรโมฟีนอลบลู เคลื่อนที่ไปเกือบสุดเจล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วย้อมแผ่นเจลเพื่อดูว่าโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่างต่าง ๆ ด้วยสีคูมาซีบลู (Coomasie billiant blue R) ร้อยละ 0.2 ในสารละลายของเมทานอล (methanol) : กรดน้ำส้มล้วน (glacial acetic acid) : น้ำใน อัตราส่วน 5 : 1 : 5 ทิ้งไว้ค้างคืน แล้วล้างสีที่ไม่ได้จับกับโปรตีนออก ด้วยสารละลายผสมของเมทานอล : กรดน้ำส้มล้วน : น้ำ ในอัตราส่วน 5 : 7 : 88 จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน เก็บเจลไว้ในสารละลายกรดน้ำส้ม ความเข้มข้นร้อยละ 7.5

2.14 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

2.14.1 โพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แบบมี SDS (SDS-PAGE)

นำเอนไซม์ที่สกัดได้จากการแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบธรรมดา ณ ตำแหน่งเจลที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงหลาย ๆ ช่อง โดยใช้ 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอที่จะนำไปศึกษา โดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส แบบมี SDS วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.13.2 วัดระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ของโปรตีนที่แยกได้โปรตีนมาตรฐานและ โบรโมฟีนอลบลู เมื่อเขียนกราฟระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) ของโปรตีนมาตรฐาน หรืออัตราส่วนของระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน ต่อระยะทางต่อการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู ในการศึกษานี้โปรตีนจะเคลื่อนที่ได้มากน้อย ขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลสูงจะเคลื่อนที่ได้น้อย จึงคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้จากกราฟระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน (Weber and Osborn, 1969)

2.14.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้ โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น โครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography)

ในการทดลองใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย เซฟาเด็กซ์ G-100 ขนาด 1.4 X 40 เซนติเมตร นำเอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนอื่นออกไปบางส่วนแล้ว โดยใช้ CM-cellulose จับโปรตีนบางส่วนและนำเอนไซม์ในส่วนที่ไม่จับกับ CM-cellulose นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นต่อไป โดยการผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ G-75 และทำส่วนที่มีเอนไซม์นี้ให้เข้มข้นขึ้นด้วย centriflo membrane cone CF-25 นำเอนไซม์นี้ใส่ลงในคอลัมน์แล้วชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ใน อัตราเร็ว 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารที่ชะออกมาเป็นส่วน ๆ ในหลอดทดลองหลอดละ 1.2 มิลลิลิตร โดยอาศัยเครื่องเก็บสารแยกส่วนโดยอัตโนมัติ วัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พร้อมทั้งหาความว่องไวของเอนไซม์ ในหลอดที่มีโปรตีน โดยวิธีในข้อ 2.4 แล้ววัดปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะเอนไซม์ตัวนี้ออกมา ปริมาตรชะ (elution volume, V_e) นำโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลจำนวน 4 ตัว บรรจุในคอลัมน์ทีละตัว แล้วชะด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 เพื่อให้ได้ปริมาตรชะของโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ใช้บลูเด็กซ์แตรน (blue dextran, MW 2,000,000 ดาลตัน) หาปริมาตรภายนอกเม็ดเจล

หรือปริมาตรวอยด์ (void volume, V_o) ของคอลัมน์ โดยชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของบลูเด็กซ์แตรน ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในการทดลองนี้ใช้คอลัมน์เดียวกันตลอด แต่นำสารผ่านคอลัมน์ทีละชนิด โปรตีนมาตรฐาน 4 ตัว ที่ใช้ในการทดลองนี้คือเบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase, MW 116,000 ดาลตัน) โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, MW 67,000 ดาลตัน) อัลบูมินจากไข่ (ovalbumin, MW 43,000 ดาลตัน) และ ไคโมทริพซิโนเจน เอ (chymotrypsinogen A, MW 25,000 ดาลตัน) เขียนกราฟระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า V_e/V_o ของโปรตีนมาตรฐาน แล้วหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ จากกราฟมาตรฐานนี้ได้ โดยดัดแปลงวิธีการของ Whitaker (1950) ; Fish และคณะ (1969)

2.15 การศึกษาหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ จากซี-ซีรั่ม

ในการศึกษาว่าเอนไซม์ที่ได้จากการแยกโปรตีนอื่นๆ ออกไปแล้วโดยผ่าน CM-cellulose, เซฟาเด็กซ์ G-75 และอิเล็กโทรโฟเรซิสว่าเป็นโปรตีนที่มีหน่วยย่อยเพียง 1 หน่วยโมโนเมอร์ (monomer) หรือประกอบด้วยหน่วยย่อยมากกว่า 1 หน่วย ที่เรียกว่าโพลีเมอร์ (polymer) และถ้ามีหน่วยย่อยมากกว่า 1 หน่วยแล้ว หน่วยย่อยเหล่านั้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันหรือไม่โดยศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ใน SDS โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส โดยใช้เอนไซม์ ที่สกัดจาก non SDS-PAGE gel 40 ไมโครกรัม เท่ากัน ในสภาวะต่าง ๆ กัน คือ

ก. ผสมเอนไซม์ที่เตรียมได้กับ SDS ร้อยละ 1.0 และโบรโมฟีนอลบลูร้อยละ 0.005 ใน 0.063 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 6.8 แล้วต้ม 2 นาที

ข. รีดิวซ์เอนไซม์ที่ใช้ในข้อ ก. ด้วย เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอลร้อยละ 5 ใน SDS ร้อยละ 1.0, โบรโมฟีนอลบลูร้อยละ 0.005 ใน 0.063 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 6.8 ต้ม 2 นาที เพื่อทำให้เอนไซม์ที่อาจอยู่เป็นโพลีเมอร์ถูกรีดิวซ์ และแยกเป็นหน่วยย่อยก่อน จึงนำไปศึกษาโดย SDS อิเล็กโทรโฟเรซิส

2.16 การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนที่ได้ในขั้นตอนต่าง ๆ ทำได้โดยใช้สารตัวอย่างโปรตีนในความ

เข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติมสารละลายฟอลิน-ฟีนอล (Folin-phenol reagent) ลงไป 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของโปรตีนได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้โบวีน ซีรัม อัลบูมิน เป็นโปรตีนมาตรฐานเปรียบเทียบ ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

2.17. การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากตะกอนก้นหลอดของน้ำยางพารา ให้บริสุทธิ์ขึ้น

2.17.1 การทำให้เอนไซม์ในตะกอนก้นหลอดเป็นสารละลาย

นำตะกอนก้นหลอดของน้ำยางพารา ที่ปั่นแยกเก็บไว้ จากน้ำยางพาราจำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมกับบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 , 0.2 mM EDTA และ Brij W-1 ร้อยละ 2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด (homogenized) ด้วยเครื่องบด (homogenizer) ชนิดแก้วขนาดเล็ก นำไปปั่นแยกเอาโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายออกไป โดยปั่นในเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูง (Beckman-J-21) ด้วยแรง 15,000 *g* เป็นเวลา 40 นาที แยกสารที่เป็นตะกอนทิ้งไปนำส่วนใสที่ได้ซึ่งมีสารละลายเอนไซม์อยู่ ไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยการเซนตริฟิวจ์ผ่าน centriflo membrane cone CF-25 เพื่อลดปริมาตรสารละลายเอนไซม์จาก 5 มิลลิลิตร เป็น 3 มิลลิลิตร ทุกขั้นตอนต้องอยู่ที่อุณหภูมิเย็น 4 องศาเซลเซียส

2.17.2 การแยกเอนไซม์จากตะกอนก้นหลอด ให้บริสุทธิ์ขึ้น

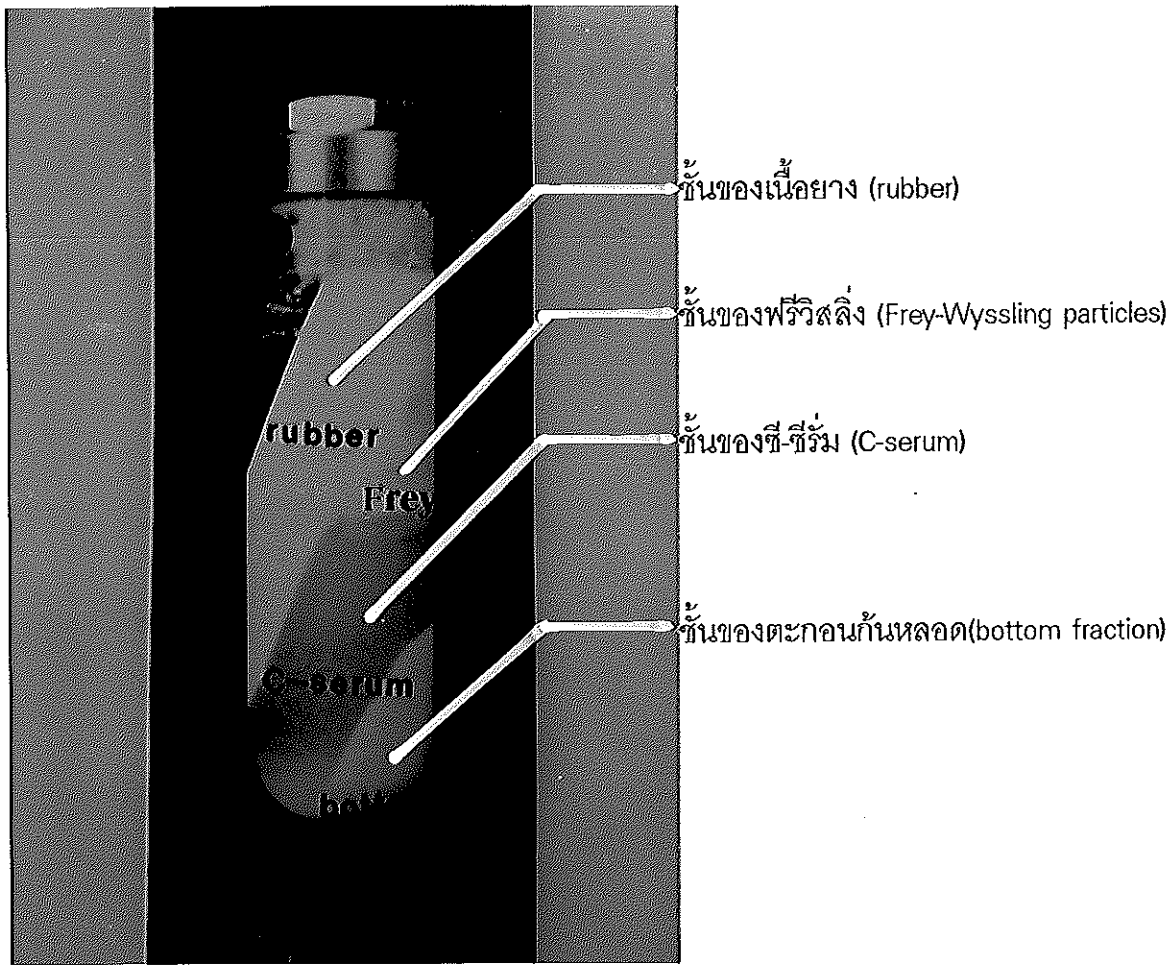
นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ในข้อ 2.17.1 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย เซฟาเด็กซ์ G-75 ขนาด 1.3 x 17 เซนติเมตร อย่างช้า ๆ แล้วชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ด้วยอัตราเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ชะออกมาเป็นส่วน ๆ ในหลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร โดยอาศัยเครื่องเก็บสารแยกส่วนโดยอัตโนมัติ แล้วติดตามการแยกโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีโปรตีนถูกชะออกมาอีก ตรวจหาความว่องไวของเอนไซม์ในหลอดที่เก็บไว้ ในทุกๆ 3 หลอด โดยวิธีในข้อ 2.4 นำหลอดที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงมารวมกัน

3. ผลการทดลอง

3.1. ความว่องไวของเอนไซม์ในน้ำยางพาราที่แยกเป็นส่วนๆ

เมื่อนำน้ำยางมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ (ultracentrifuge) หรือ UC ที่ 80,000 *g* เป็นเวลา 45 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส น้ำยางพาราแยกออกเป็น 4 ส่วน คือ เนื้อยาง (rubber) ฟรีวิสลิ่ง (Frey-Wyssling particles) ซี-ซีรั่ม (C-serum) และส่วนตะกอนก้นหลอด (bottom fraction) ดังรูปที่ 5 จากรูปเห็นได้ว่าส่วนของฟรีวิสลิ่ง มีปริมาตรน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ ที่แยกได้

เมื่อนำน้ำยางสด และซี-ซีรั่ม ที่แยกได้ใหม่ๆ มาหาความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ พบว่ามีค่าความว่องไวเท่ากับ 550 nmole/min/ml latex และ 70 nmole/min/mg protein (844 nmole/min/ml C-serum) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำยางที่แยกออกเป็นส่วนๆ เฉพาะส่วนของซี-ซีรั่ม ตะกอนก้นหลอด และส่วนของฟรีวิสลิ่ง ไปหาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase พบว่ามีเอนไซม์มากที่สุดในส่วนของซี-ซีรั่ม และ รองลงมาเป็นตะกอนก้นหลอดและมีน้อยมากในส่วนของฟรีวิสลิ่ง แม้ว่าในน้ำยางพารา จะมีส่วนของยางอยู่สูง แต่การวิเคราะห์หาเอนไซม์ในส่วนของยางนั้น ไม่อาจทำได้เนื่องจากสมบัติของยางไม่อำนวยให้ทำการศึกษาได้ ตารางที่ 1 แสดงปริมาณของ เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่กระจายอยู่ในซี-ซีรั่ม ตะกอนก้นหลอดและฟรีวิสลิ่งที่แยกได้จากน้ำยางพาราจำนวน 100 ml



รูปที่ 5 น้ำยางสดภายหลังการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์

ตารางที่ 1 HMG-CoA synthase ในส่วนของน้ำยางพารา

แหล่งสารตัวอย่าง	ปริมาตรที่แยกได้จากน้ำยาง 100 ml(ml)	ความว่องไวทั้งหมด (μmole/min)	ความว่องไวจำเพาะ (nmole/min/mg protien)
ซี-ซีรั่ม	31.3 ± 2.9	35.8 ± 5.7	91.7 ± 3.6
ตะกอนก้นหลอด	8.9 ± 0.9	7.2 ± 2.7	51.1 ± 21.9
ฟรีวิสลิ่ง	1 ± 0.3	2.5 ± 0.4	33.0 ± 3.0

3.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิต่อความว่องไวของเอนไซม์ในการเก็บซี-ซีรั่ม

ซี-ซีรั่มที่ปั่นแยกได้จากน้ำยางพาราและแบ่งเป็น 3 หลอด หลอดที่ 1 นำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ทันที หลอดที่ 2 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ ส่วนหลอดที่ 3 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม ที่เก็บไว้ ณ. อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จะลดลงจากเดิมประมาณร้อยละ 32.8 ส่วนความว่องไวของเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม ที่เก็บ ณ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ไม่เปลี่ยนแปลง ดังจะเห็นได้จาก ตารางที่ 2 ซึ่งแสดงว่าการเก็บซี-ซีรั่ม ไว้ที่ - 70 องศาเซลเซียสช่วยรักษาความว่องไวของเอนไซม์ได้

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิในการเก็บ ซี-ซีรั่ม ต่อความว่องไวของเอนไซม์
(ใช้โปรตีน 125 ไมโครกรัม ในแต่ละการทดลอง)

ซี-ซีรั่มที่เก็บต่างกัน HMG-CoA synthase	ความว่องไวของเอนไซม์ (nmole/min)	ความว่องไวที่ลดลง (ร้อยละ)
ซี-ซีรั่ม ที่แยกได้ใหม่ๆ	5.8 ± 0.09	0.0
ซี-ซีรั่ม เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส, 2 วัน	3.9 ± 0.15	32.8
ซี-ซีรั่ม เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส, 2 วัน	5.8 ± 0.12	0.0

3.3 ผลของระยะเวลาที่เก็บ ซี-ซีรั่ม ณ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสต่อความว่องไวของเอนไซม์

เมื่อนำซี-ซีรั่ม ที่ปั่นแยกไปแบ่งเก็บเป็นหลอดๆ หลายหลอด นำหลอดที่หนึ่ง ไปหาความว่องไวของเอนไซม์ทันทีที่ปั่นแยกได้ ส่วนหลอดที่เหลือ นำไปเก็บที่ตู้เก็บสารอุณหภูมิต่ำ -70 องศาเซลเซียสแล้วนำออกมาหาความว่องไวของเอนไซม์ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ตามลำดับ พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่ม ที่เก็บ ณ. อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 6 และ 8 สัปดาห์นั้น ความว่องไวของเอนไซม์ลดลงจากเดิม ตามระยะเวลาที่เก็บ จากตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาซี-ซีรั่ม ไว้ที่อุณหภูมิต่ำถึง -70 องศาเซลเซียส ความว่องไวของเอนไซม์จะลดลงไม่มากนักหากเก็บไว้ไม่เกิน 4 สัปดาห์ แต่จะลดลงถึงร้อยละ 32.7 ใน 8 สัปดาห์

ตารางที่ 3 ผลของระยะเวลาต่อความว่องไวของเอนไซม์ที่เก็บ ณ. อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
(ใช้โปรตีน 125 ไมโครกรัม ในแต่ละการทดลอง)

ระยะเวลาที่เก็บไว้ ณ. -70 องศาเซลเซียส (สัปดาห์)	ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (nmole/min)	ความว่องไวที่ลดลง (ร้อยละ)
0	5.2 ± 0.08	0.0
1	5.1 ± 0.15	1.9
2	5.0 ± 0.06	3.9
3	4.9 ± 0.12	5.8
4	4.9 ± 0.11	5.8
6	4.1 ± 0.10	21.2
8	3.5 ± 0.27	32.7

3.4. ผลของสารต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม

3.4.1 เกลือกับความว่องไวของเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม

จากการศึกษาผลของเกลือต่อความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่ม โดยเตรียม ซี-ซีรั่ม ในรูปแบบต่างๆ 4 แบบ คือ ซี-ซีรั่มที่ไม่เจือจาง ซี-ซีรั่มที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ลงเป็น 3 เท่า ซี-ซีรั่มที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ที่มีเกลือ NaCl 0.2 M ในอัตราส่วน 1:3 และ ซี-ซีรั่มที่ถูกเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl ที่มีเกลือ NaCl 0.2 M และกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:3 แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ทำโดยชุดที่ 1 ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที และชุดที่ 2 ตั้งไว้ 24 ชั่วโมงแล้วนำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ พบว่าชุดที่ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

ความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่มที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:3 มีความว่องไวของเอนไซม์ลดลงจาก 5.5 nmole/min เป็น 2.9 nmole/min แสดงว่าการทำให้ ซี-ซีรั่ม เจือจางจะทำให้มีความว่องไวของเอนไซม์ลดลง แต่การลดลงนั้นไม่ได้เป็นไปตามอัตราส่วนของปริมาณ ซี-ซีรั่ม และความว่องไวของเอนไซม์ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 0.2 M NaCl ในอัตราส่วน 1 : 3 และที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 0.2 M NaCl และกลีเซอรอล 30 % ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที และนาน 24 ชั่วโมง ได้ผลไม่ต่างกันนัก แต่การเจือจางในสภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl 0.2 M และมีเกลือ หรือมีเกลือ NaCl ร่วมกับ 30 % กลีเซอรอล มีแนวโน้มที่แสดงว่ากลีเซอรอล ช่วยรักษาความว่องไวของเอนไซม์ได้ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของ NaCl ต่อความว่องไวของเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม
(ใช้โปรตีน 125 ไมโครกรัม สำหรับซี-ซีรั่มที่ไม่เจือจาง)

	ความว่องไวของเอนไซม์ ภายหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
	2 ชั่วโมง 30 นาที (nmole/min)	24 ชั่วโมง (nmole/min)
ซี-ซีรั่ม	5.5 ± 0.12	5.1 ± 0.17
ซี-ซีรั่ม ที่เจือจาง 1:3	2.9 ± 0.06	2.7 ± 0.28
ซี-ซีรั่ม ที่เจือจาง 1:3 มี 0.2 M NaCl	2.9 ± 0.28	2.6 ± 0.12
ซี-ซีรั่ม ที่เจือจาง 1:3 มี 0.2 M NaCl + 30% กลีเซอรอล	3.3 ± 0.28	3.3 ± 0.35

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการทำให้สารตัวอย่าง เจือจางลง 1:3 และ 1:6 เพื่อศึกษาผลของเกลือ ในกรณีที่ความเข้มข้นของ ซี-ซีรั่ม เจือจางลงเป็น 1:6 อีก โดยเตรียมซี-ซีรั่มในรูปแบบต่างๆ 5 รูปแบบ ดังตารางที่ 5 โดยชุดที่ 1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ชุดที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปหาความว่องไวของเอนไซม์ พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ของซี-ซีรั่มที่ไม่เจือจาง ซี-ซีรั่มเจือจาง 1:3 และ ซี-ซีรั่มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 มีค่าความว่องไวของเอนไซม์ลดลงเป็น 6.5, 3.6 และ 2.5 nmole/min ตามลำดับ และการลดลงนี้มิได้เป็นอัตราส่วนตามอัตราส่วนของการทำให้เจือจาง สำหรับชุดที่ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ส่วนชุดที่ตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความว่องไวของเอนไซม์ลดลงในลักษณะเดียวกัน คือ 6.1, 2.6 และ 1.7 nmole/min ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าซี-ซีรั่ม ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 และมี 0.2 M NaCl อยู่ด้วย เมื่อทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ความว่องไวของเอนไซม์ไม่แตกต่างจาก ซี-ซีรั่มที่เจือจางในอัตราส่วน 1:6 โดยไม่มีเกลืออยู่ด้วย (2.5 nmole/min และ 2.5 nmole/min) แต่ถ้าทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานถึง 24 ชั่วโมง ปรากฏว่าความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่มที่เจือจาง 1:6 และมีเกลือ 0.2 M NaCl มีความว่องไวของเอนไซม์ลดลงจาก 2.5 nmole/min เป็น 0.3 nmole/min แสดงว่าความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่มที่เจือจาง 1:6 จะลดลงได้ถึงร้อยละ 88 หากมีเกลือ NaCl 0.2 M อยู่ด้วยนานถึง 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่า อิทธิพลของเกลือต่อความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่มที่เจือจางนั้นชัดเจนมากถ้าตั้งทิ้งไว้นาน แต่หากซี-ซีรั่มเจือจางในอัตราส่วน 1:6 มีเกลือ 0.2 M NaCl และ 30% กลีเซอรอลอยู่ด้วย พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาทีและ 24 ชั่วโมงนั้นไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าความว่องไวของเอนไซม์ที่มีเกลือและกลีเซอรอลอยู่ด้วย จะสูงกว่าความว่องไวเอนไซม์ที่มีเกลืออย่างเดียว แสดงว่ากลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ มีผลลดอิทธิพลของเกลือ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ได้ หรือช่วยรักษาสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ให้คงอยู่ได้ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อิทธิพลของ NaCl ใน ซี-ซีรั่ม ที่เจือจางต่อความว่องไวของเอนไซม์ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน
(ใช้โปรตีน 125 ไมโครกรัม สำหรับซี-ซีรั่มที่ไม่เจือจาง)

	ความว่องไวของเอนไซม์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
	45 นาที (nmole/min)	24 ชั่วโมง (nmole/min)
ซี-ซีรั่ม ที่ไม่เจือจาง	6.5 ± 0.15	6.1 ± 0.21
ซี-ซีรั่ม ที่เจือจาง 1:3	3.6 ± 0.13	2.6 ± 0.15
ซี-ซีรั่ม ที่เจือจาง 1:6	2.5 ± 0.15	1.7 ± 0.05
ซี-ซีรั่ม ที่เจือจาง 1:6 มี 0.2 M NaCl	2.5 ± 0.12	0.3 ± 0.06
ซี-ซีรั่ม ที่เจือจาง 1:6 มี 0.2 M NaCi + 30% กลีเซอรอล	3.1 ± 0.07	3.1 ± 0.17

3.4.2 ผลของ ไอโอโดอะเซตาไมด์ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม

ในการศึกษาผลของไอโอโดอะเซตาไมด์ 30 mM ต่อความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่ม ไอโอโดอะเซตาไมด์ ความเข้มข้น 30 mM ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ลดลงมาก คือ จาก 5.8 ± 0.19 nmole/min เป็น 0.20 ±19 nmole/min จากการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงว่า ไอโอโดอะเซตาไมด์ สามารถลดความว่องไวของเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่มเป็นอย่างมาก ในช่วงความเข้มข้นต่ำ ถึง 30 mM

3.4.3 ผลของ ไดไธโอทรีทอล (DTT) ต่อความว่องไวของเอนไซม์ใน ซี-ซีรั่ม

ในการศึกษาผลของไดไธโอทรีทอล พบว่าไดไธโอทรีทอล 10 mM ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ ลดลงจาก 5.8 ± 0.19 nmole/min เป็น 1.6 ± 0.21 nmole/min จากการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงว่า ไดไธโอทรีทอล ลดความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่ม ลงได้มากกว่าร้อยละ 50

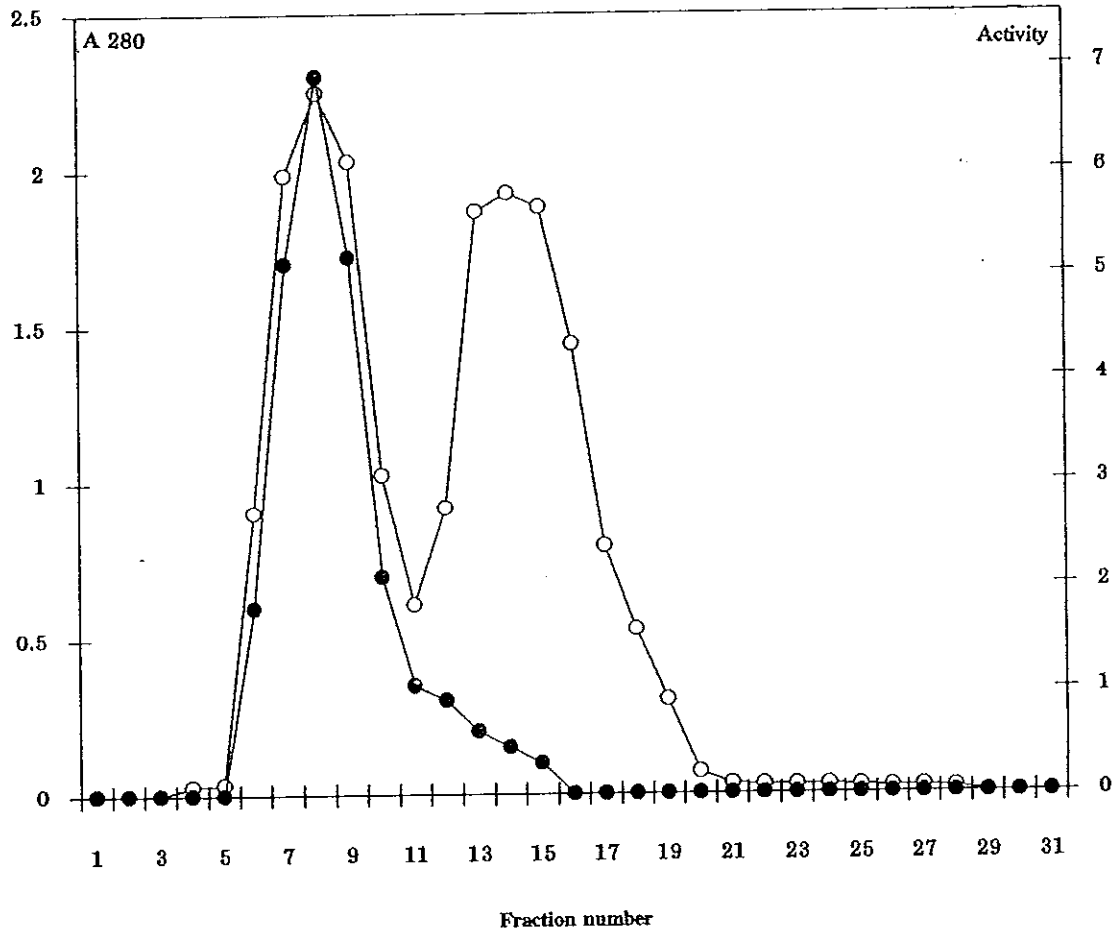
3.5 ผลการแยกเอนไซม์จากซี-ซีรั่ม ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี่

ในการแยกเอนไซม์จากซี-ซีรั่มโดยใช้ CM-cellulose พบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase จะไม่จับกับ CM-cellulose จึงแยกออกจากโปรตีนอื่น ๆ ที่จับกับ CM-cellulose ได้ทำให้ความว่องไวจำเพาะสูงขึ้นจากความว่องไวจำเพาะของซี-ซีรั่ม ซึ่งมีค่า 71 nmole/min/mg protein เป็น 144.4 nmole/min/mg protein มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 2.03 เท่า และมีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 67.4 ดังตารางที่ 6 และเมื่อนำส่วนของเอนไซม์ที่ไม่จับกับ CM-cellulose นี้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน centriflo membrane cone CF-25 ซึ่งสามารถแยกโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 25,000 ดาลตัน ออกไปและพบว่าความว่องไวจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 241.8 nmole/min/mgprotein มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 3.41 เท่า และมีเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 59.4 จากนั้นเมื่อนำเอนไซม์ที่เข้มข้นแล้วไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์G-75 พบว่าเอนไซม์ที่มีความว่องไวสูงส่วนใหญ่ อยู่ในพีคแรก ดังรูปที่ 6 และมีความว่องไวจำเพาะเท่ากับ 317.4 nmole/min/mg protein มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 4.5 เท่า และมีเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 47 เมื่อนำเอนไซม์ที่แยกได้โดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน centriflo membrane cone CF-25 อีกครั้ง พบว่าความว่องไวจำเพาะเป็น 395.7 nmole/min/mg protein มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็น 5.6 เท่า และมีเอนไซม์ที่เหลืออยู่ร้อยละ 40 เอนไซม์ที่ผ่านจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75

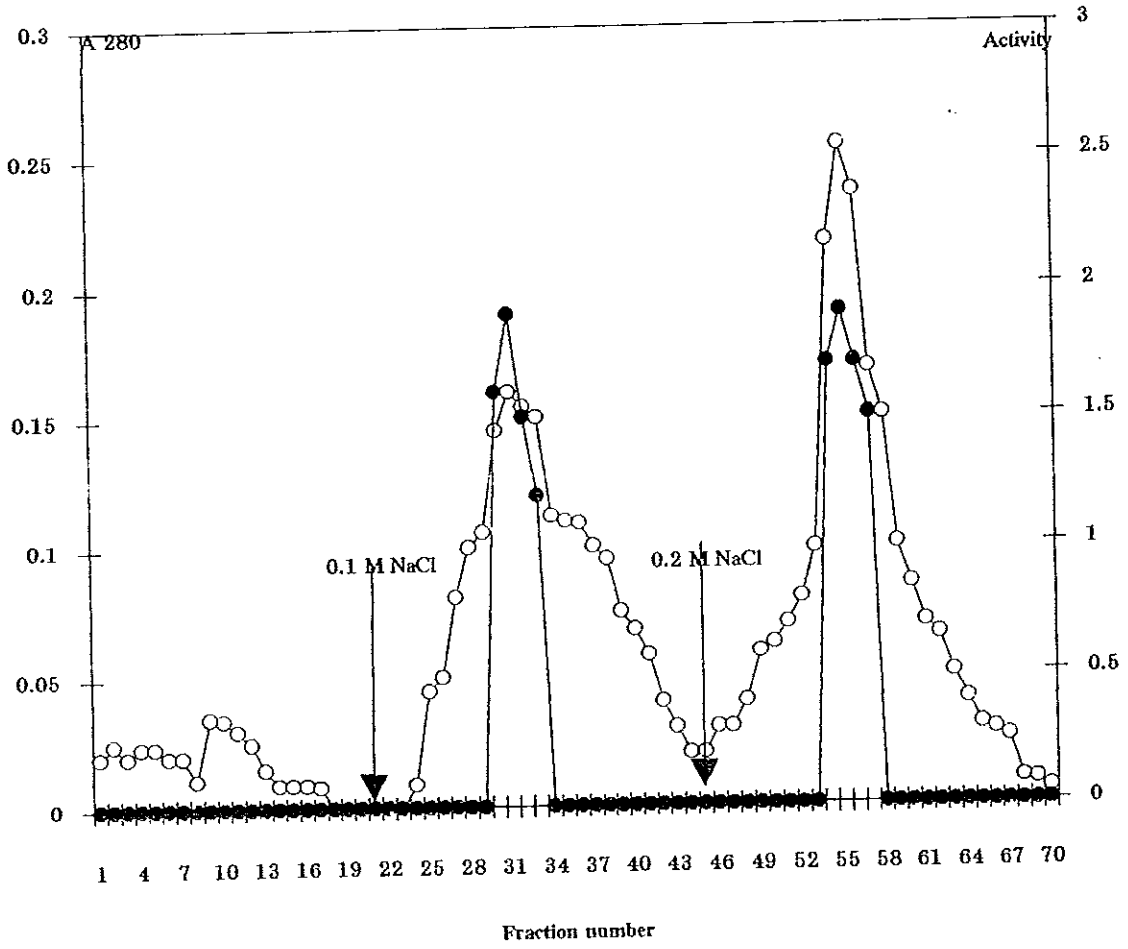
และทำให้เข้มข้นแล้วนี้ เมื่อผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose (DE-52) และชะคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaCl ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 8.2 และ 0.2 M NaCl ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl ตามลำดับดังรูปที่ 7 พบว่ามีเอนไซม์ HMG-CoA synthase ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaCl ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl เอนไซม์ส่วนนี้มีความว่องไวจำเพาะเป็น 485.6 nmole/min/mg protein และมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็น 6.84 เท่า มีเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 8.5 และเมื่อชะคอลัมน์ DEAE-cellulose ด้วย 0.2 M NaCl ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl มีเอนไซม์ที่ถูกชะออกมาอีก มีความว่องไวจำเพาะ 378.3 nmole/min/mg protein มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 5.3 เท่า และมีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 13.3 ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์ขึ้น

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ความว่องไว (nmole/min)	โปรตีน (mg)	ความว่องไวจำเพาะ (nmole/min/mg protein)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ปริมาณสุทธิ (ร้อยละ)
ซี-ซีรั่ม	15,350	216.0	71.0	-	100
CM-cellulose	10,340	71.6	144.4	2.03	67.4
Centriflo membrane cone CF-25	9,120	37.7	241.8	3.41	59.4
Sephadex G-75	7,200	22.7	317.4	4.50	47.0
Centriflo membrane cone CF-25	6,130	15.5	395.7	5.60	40.0
DEAE-cellulose (eluted with 0.1 M NaCl)	1,310	2.7	485.6	6.84	8.5
DEAE-cellulose (eluted with 0.2 M NaCl)	2,040	5.4	378.3	5.30	13.3



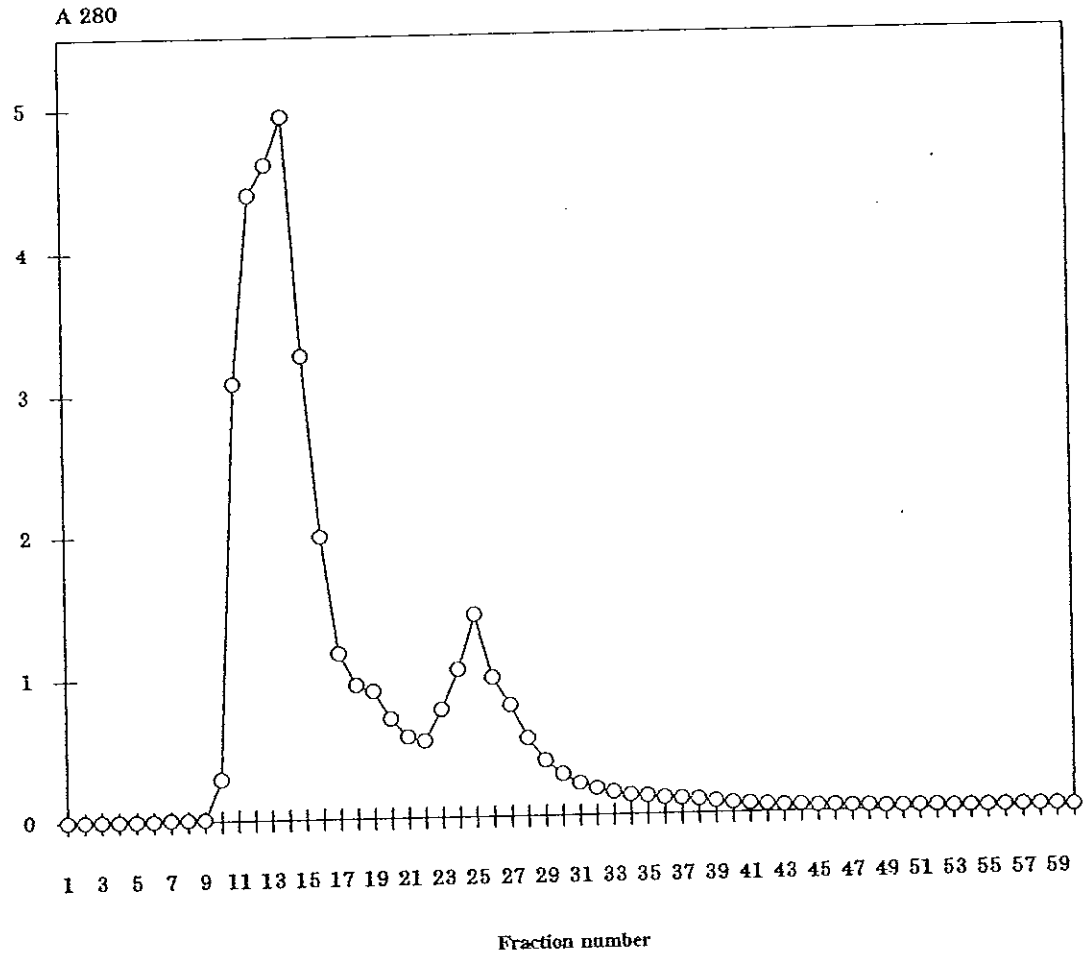
รูปที่ 6 การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์ โดยโครมาโตกราฟฟี่บนคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-75 ขนาด 1.3 X 16 cm โดยนำโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วย CM-cellulose แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน centriflo membrane cone CF-25 จากนั้นนำไปแยกด้วย เซฟาเด็กซ์ G-75 ซะโปรตีนในคอลัมน์ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ด้วยอัตราเร็ว 18 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารหลอดละ 2 มิลลิลิตร พบเอนไซม์ส่วนใหญ่ในพีคแรก (o—o) แสดงปริมาณโปรตีนที่ A_{280} nm (●—●) แสดงความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (nmole/min)



รูปที่ 7 การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose ซึ่งมีขนาด 1.2 X 8 cm ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8.2 (o—o) แสดงปริมาณโปรตีนที่ A_{280} nm ซึ่งในพีค 1 ชะออกด้วย 0.1 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl pH 8.2 พีค 2 ชะออกด้วย 0.2 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl pH 8.2 (●—●) แสดงความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (nmole/min)

3.6 ผลการแยกเอนไซม์จาก ซี-ซีรั่ม ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการตกตะกอนโปรตีนในซี-ซีรั่มด้วยอะซีโตนที่เย็น

การทำให้เอนไซม์จากซี-ซีรั่ม บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้อะซีโตนแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน อะซีโตน : ซี-ซีรั่มเท่ากับ 3 : 2 มาตกตะกอนโปรตีนออกจากซี-ซีรั่ม พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ และโปรตีนลดลงเล็กน้อยจาก 17,190 nmole/min เหลือ 14,530 nmole/min และโปรตีนลดจาก 195 มิลลิกรัม เป็น 165.6 มิลลิกรัม จะเห็นได้ว่าการใช้อะซีโตนช่วยในการตกตะกอน ไม่ทำให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์สูงขึ้น และเมื่อนำตะกอนของโปรตีนที่ได้ ไปละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM แล้วนั้น ไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยผ่าน centriflo membrane cone CF-25 พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ลดลงมากเป็น 8,320 nmole/min และมีโปรตีนเหลือ 90 มิลลิกรัม มีความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ HMG-CoA synthase เป็น 92.4 nmole/min/mg protein มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็น 1.05 เท่า และมีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 48.37 จากนั้นนำเอนไซม์ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นแล้ว ไปผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-75 พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในพีคแรก ดังรูปที่ 8 และมีความว่องไวทั้งหมดเป็น 5,790 nmole/min และโปรตีนทั้งหมดเป็น 35 มิลลิกรัม มีความว่องไวจำเพาะเป็น 165.4 nmole/min/mg protein มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็น 1.88 เท่า และมีเอนไซม์อยู่ร้อยละ 33.67 เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้จาก เซฟาเด็กซ์ G-75 ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ sephacryl S-200 พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในพีคแรกและมีความว่องไวลดลงไปมาก มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็น 2.09 เท่า และมีเอนไซม์อยู่เพียงร้อยละ 5.7 ของตอนเริ่มต้น โดยสรุปจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงวิธีการแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จาก ซี-ซีรั่ม ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีนี้ ให้ผลไม่ดีกว่าการใช้ CM-cellulose ก่อนการแยกผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย เซฟาเด็กซ์ G-75 ทั้งในแง่ของความบริสุทธิ์ และปริมาณเอนไซม์ที่คงอยู่ ดังตารางที่ 6 และ 7 ตามลำดับ



รูปที่ 8 การทำเอนไซม์ HMG CoA-synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่บนคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-75 ขนาด 1.3 X 30 cm โดยนำโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซีโตนเย็น ละลายด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่าน centriflo membrane cone CF-25 จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 ชะโปรตีนในคอลัมน์ ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ด้วยอัตราเร็ว 17 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บหลอดละ 1.7 มิลลิลิตร พบเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในพีคแรก (o—o) แสดงปริมาณโปรตีน ที่ A_{280} nm

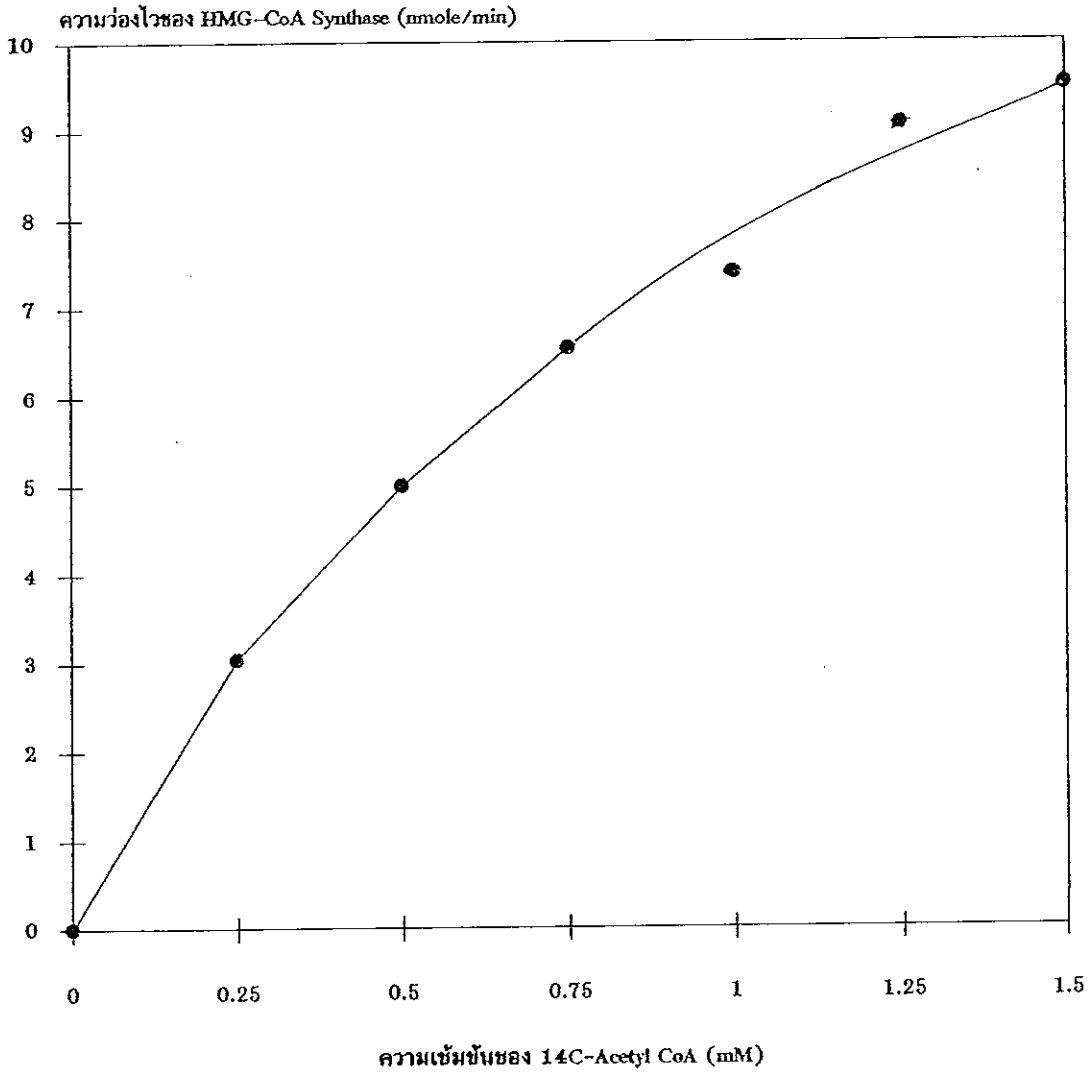
ตารางที่ 7 ผลการแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จาก ซี-ซีรั่ม ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการตกตะกอนโปรตีนใน ซี-ซีรั่ม ด้วย อะซีโตนที่เย็น

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ความว่องไว (nmole/min)	โปรตีน (mg)	ความว่องไวจำเพาะ (nmole/min/mg protein)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ปริมาณสุทธิ (ร้อยละ)
ซี-ซีรั่ม	17,190	195.0	88.2	-	100
Resuspended acetone precipitate	14,630	165.6	87.7	0.99	84.5
Centriflo membrane cone CF-25	8,320	90.0	92.4	1.05	48.4
Sephadex G-75	5,790	35.0	165.4	1.88	33.7
Sephacryl S-200	970	5.28	183.7	2.09	5.70

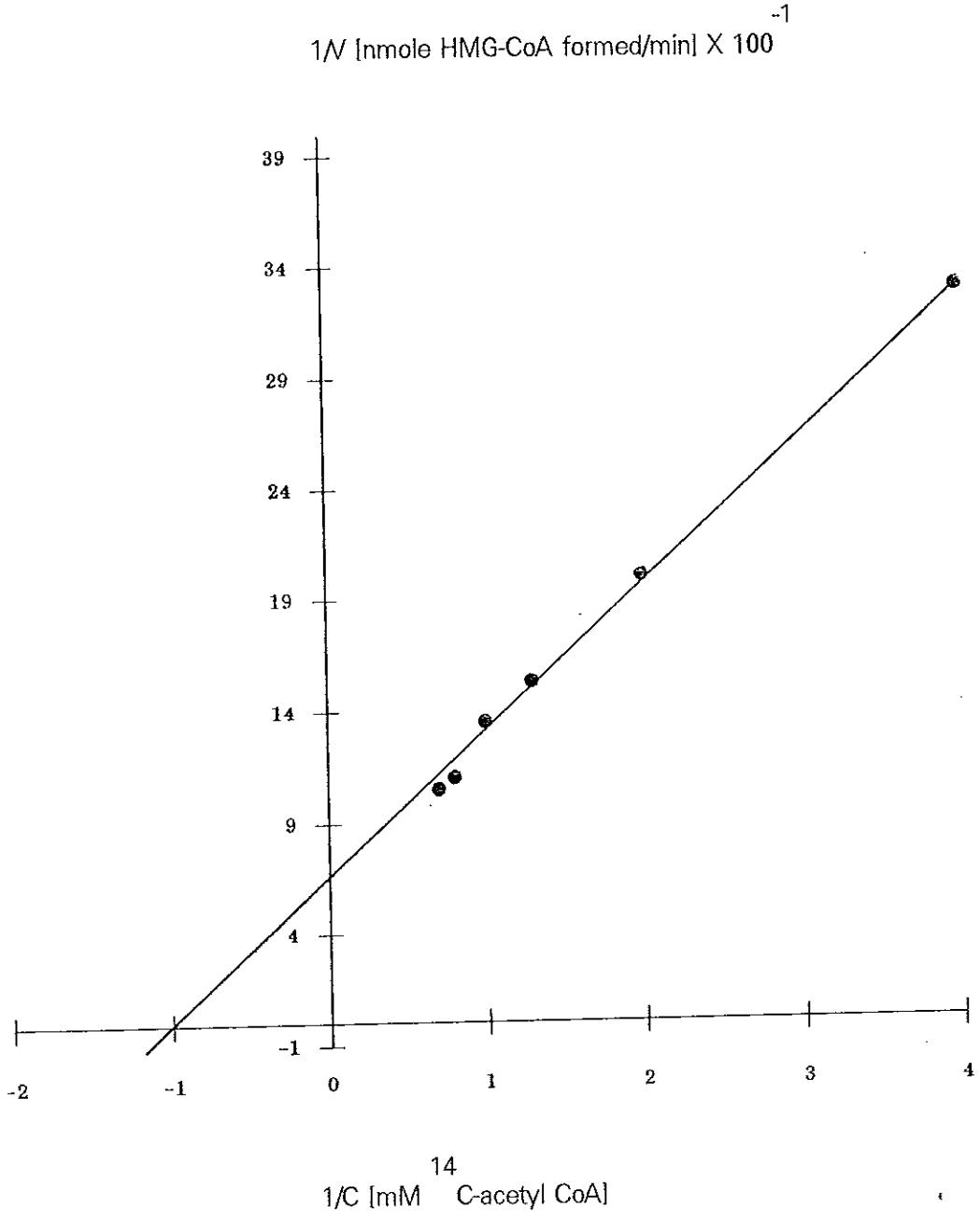
3.7. ปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ที่แยกได้

3.7.1 ความเข้มข้นของ acetyl CoA ต่อความว่องไวของเอนไซม์

เมื่อนำเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบ้างแล้ว โดยผ่านขั้นตอนการแยกได้จากขั้นตอนผ่าน CM-cellulose และผ่านต่อในเซฟาเด็กซ์ G-75 แล้ว นำมาศึกษาหาความว่องไวของเอนไซม์ โดยมี ^{14}C-acetyl CoA ปริมาณต่างๆ กัน คือ 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 และ 1.5 mM พบว่าเมื่อ ^{14}C-acetyl CoA ในปริมาณที่มากขึ้น ความว่องไวของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้น ดังตารางที่ 9 เมื่อนำความว่องไวของเอนไซม์กับปริมาณของ ^{14}C-acetyl CoA ที่ใช้ พบว่าที่ความเข้มข้นของ ^{14}C-acetyl CoA เป็น 0.25, 0.5 และ 0.75 mM ความว่องไวของเอนไซม์จะมีค่าเกือบเป็นเส้นตรง และจะเริ่มเบี่ยงเบนลงที่ความเข้มข้นของ ^{14}C-acetyl CoA เป็น 1, 1.25 และ 1.5 mM ดังรูปที่ 9 และเมื่อนำข้อมูลไปเขียนกราฟแบบ Lineweaver - Burk Plot จะได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 10 จากกราฟพบว่า HMG-CoA synthase ที่แยกได้นี้ มีค่า K_m ของ acetyl CoA เท่ากับ 1 mM



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase กับปริมาณ ^{14}C-acetyl CoA (ใช้โปรตีน 20 ไมโครกรัมในแต่ละการทดลอง)



รูปที่ 10 Lineweaver- Burk Plot แสดงการหาค่า K_m

3.7.2 ความเข้มข้นของ acetoacetyl CoA ต่อความว่องไวของเอนไซม์

การศึกษาผลของ acetoacetyl CoA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์โดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนอื่นๆ ออกเพียงบางส่วนจากขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน CM-cellulose และ เซฟาเด็กซ์ G-75 เช่นเดียวกับข้อ 7.1 มาหาความว่องไวของเอนไซม์ โดยมี acetoacetyl CoA เข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25 mM ตามลำดับ พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าจะใช้ความเข้มข้นของ acetoacetyl CoA มากน้อยเพียงใด ดังตารางที่ 8 แสดงว่าความเข้มข้นของ acetoacetyl CoA ไม่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ อาจกล่าวได้ว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้แม้ว่าไม่มีการเติม acetoacetyl CoA ลงในปฏิกิริยา

ตารางที่ 8 ผลของ acetoacetyl CoA ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ (ใช้โปรตีน 20 ไมโครกรัม ในแต่ละการทดลอง)

ความเข้มข้นของ acetoacetyl CoA (mM)	ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (nmole/min)
0	5.3 ± 0.29
0.025	5.4 ± 0.14
0.050	5.4 ± 0.04
0.100	5.3 ± 0.54
0.150	5.3 ± 0.61
0.200	5.3 ± 0.56
0.250	5.4 ± 0.05

3.7.3 ผลของ pH ต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

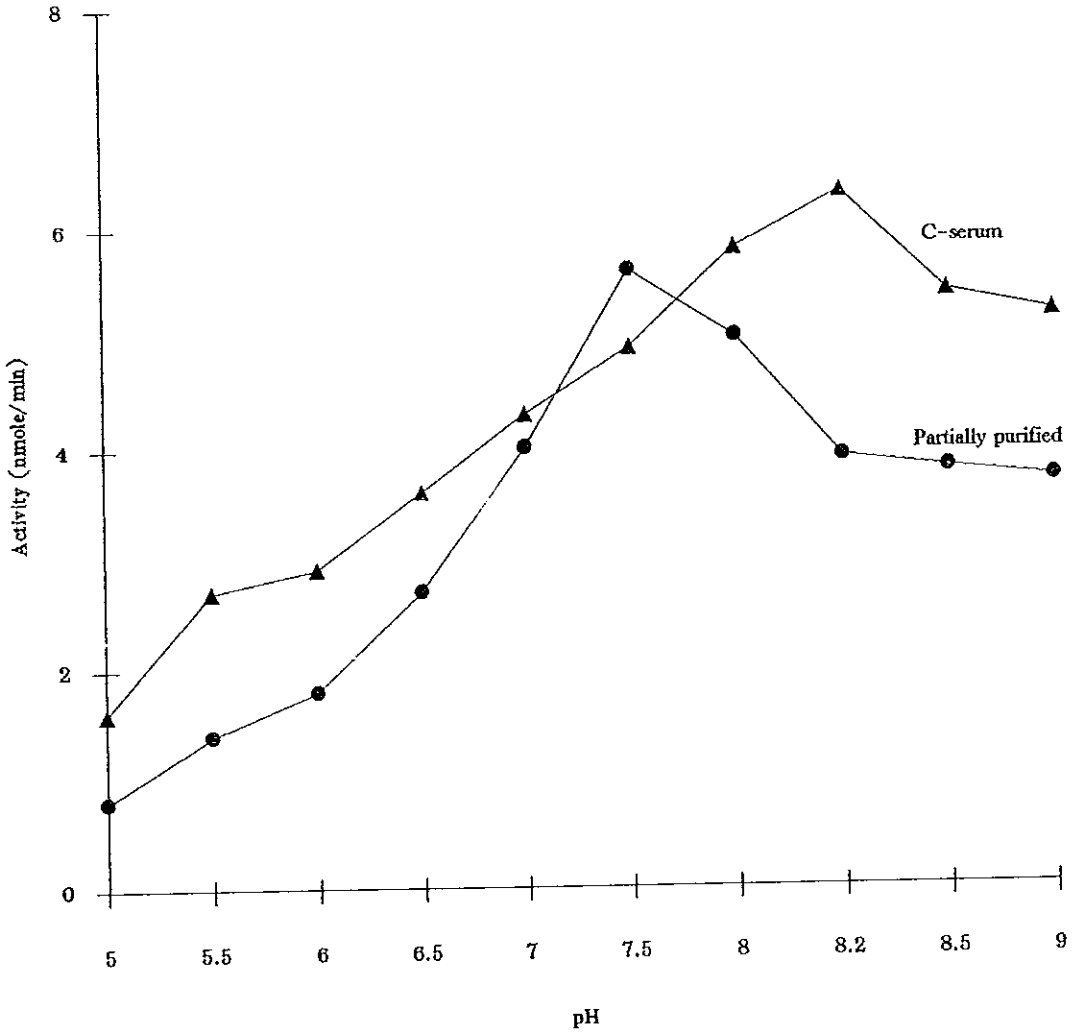
ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบ้างแล้ว และเอนไซม์ที่ยังอยู่ใน ซี-ซีรั่ม ว่าจะมีความว่องไวสูงสุดที่ pH ใด โดยทำการทดลองในช่วง pH 5 - 9 พบว่าเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์บ้างแล้ว มีความว่องไวสูงสุดที่ pH 7.5 คือ 5.6 $\pm$ 0.12 nmole/min ในขณะที่เอนไซม์ในซี-ซีรั่ม ที่มีความว่องไวสูงสุดที่ pH 8.2 คือ 6.3 $\pm$ 0.31 nmole/min ดังรูปที่ 11

3.7.4 ผลของ EDTA ต่อความว่องไวของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน เช่นเดียวกับข้อ 3.7.1 เมื่อหาความว่องไวของเอนไซม์ในสภาวะที่มี EDTA 0.1 mM ผสมอยู่ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ และไม่มี EDTA ผสมอยู่ พบว่า ในหลอดทดลองที่มี EDTA ผสมอยู่ในบัฟเฟอร์ จะมีความว่องไวของเอนไซม์สูงกว่าในหลอดที่ไม่มี EDTA โดยมีค่า 3.9 $\pm$ 0.19 nmole/min และ 1.5 $\pm$ 0.14 nmole/min จากการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่า EDTA สามารถเพิ่มความว่องไวของเอนไซม์ขึ้นถึง 2.6 เท่า

3.7.5 ผลของไอโอโดอะเซตาไมด์ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ในการทดลองหาความว่องไวของเอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วนที่มีไอโอโดอะเซตาไมด์ ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10, 30, 60 และ100 mM อยู่ในปฏิกิริยานั้นตามลำดับ พบว่าในหลอดที่ไม่มีไอโอโดอะเซตาไมด์ อยู่เอนไซม์สามารถนำเอา ^{14}C-acetyl CoA ไปสังเคราะห์เป็น ^{14}C-HMG-CoA ได้ 2.5 nmole/min ส่วนหลอดที่มีไอโอโดอะเซตาไมด์อยู่เพียง 2 mM ก็มีผลยับยั้งเอนไซม์ทำให้นำ ^{14}C-acetyl CoA ไปสังเคราะห์เป็น ^{14}C-HMG-CoA ได้เพียง 0.4 nmole/min ดังตารางที่ 9



รูปที่ 11 ผลของ pH ต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (ในการทดลองแต่ละครั้ง ใช้โปรตีน 125 ไมโครกรัมสำหรับซี-ซีรั่มและ 20 ไมโครกรัมสำหรับ partially purified เอนไซม์)

ตารางที่ 9 ผลของไอโอโดอะเซตาไมด์ ต่อความว่องไวของเอนไซม์
(ใช้โปรตีน 20 ไมโครกรัม ในแต่ละการทดลอง)

ความเข้มข้นของไอโอโดอะเซตาไมด์ (mM)	ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (nmole/min)
0	2.5 ± 0.03
2	0.4 ± 0.02
5	0.4 ± 0.03
10	0.4 ± 0.02
30	0.4 ± 0.02
60	0.4 ± 0.07
100	0.4 ± 0.04

3.7.6 ผลของไดไธโอทรีทอล ต่อความว่องไวของเอนไซม์

การศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน พบว่า เมื่อมีไดไธโอทรีทอลผสมอยู่เพียง 10 mM ความว่องไวของเอนไซม์จะลดลงประมาณร้อยละ 84 ดังตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าไดไธโอทรีทอลเป็นตัวยับยั้งที่รุนแรงมาก

ตารางที่ 10 ผลของไดไธโอทรีทอล ต่อความว่องไวของเอนไซม์
(ใช้โปรตีน 20 ไมโครกรัม ในแต่ละการทดลอง)

ความเข้มข้นของไดไธโอทรีทอล (mM)	ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (nmole/min)
0	2.5 ± 0.03
2	0.8 ± 0.02
4	0.8 ± 0.02
10	0.4 ± 0.02
20	0.4 ± 0.04
40	0.4 ± 0.02
60	0.4 ± 0.01

3.7.7 ผลของเกลือที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ในการศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ ใช้เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน ในสภาวะที่มี NaCl ความเข้นข้นต่างๆ กัน คือ 0, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 M ตามลำดับ พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ลดลงตามความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลของ NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์ (ใช้โปรตีน 20 ไมโครกรัม ในแต่ละการทดลอง)

ความเข้มข้นของ NaCl (M)	ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase (nmole/min)
0	3.5 ± 0.2
0.05	3.2 ± 0.1
0.1	2.6 ± 0.2
0.15	2.2 ± 0.2
0.2	1.9 ± 0.2

3.7.8 ผลของไอออนต่าง ๆ ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ในการทดลองใช้เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน มาศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของไอออนต่าง ๆ พบว่า 10 mM ของ Mg^{2+} และ Mn^{2+} ในรูปของ $MgCl_2$ และ $MnCl_2$ รวมทั้ง Fe^{2+} ในรูปของ $FeSO_4$ สามารถลดความว่องไวของเอนไซม์ (ตารางที่ 12) โดย Fe^{2+} ที่ละลายในน้ำกลั่น และ Fe^{2+} ที่ละลายใน (0.01 M) HCl ความเข้มข้น 10 mM ต่างลดความว่องไวของเอนไซม์เหลือ 1.0 และ 1.1 nmole/min ตามลำดับ ที่ pH 7.5 ส่วนที่ pH 8.2 Fe^{2+} ในน้ำกลั่นและ Fe^{2+} ที่ละลายใน 0.01 M HCl ความเข้มข้น 10 mM ต่างก็ลดความว่องไวของเอนไซม์ดังตารางที่ 12 แสดงว่าไอออนเหล่านี้ ล้วนมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่แยกโปรตีนอื่น ออกไปบ้างแล้ว ทั้งนั้น แต่ Fe^{2+} จะลดความว่องไวของเอนไซม์ได้มากกว่า Mg^{2+} และ Mn^{2+}

ตารางที่ 12 ผลของ Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Fe^{2+} ต่อความว่องไวของเอนไซม์ (ใช้โปรตีน 20 ไมโครกรัม ในแต่ละการทดลอง)

ความเข้มข้นของไอออน	ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase	
	pH 7.5 (nmole/min)	pH 8.2 (nmole/min)
0	4.4 ± 0.5	3.9 ± 0.2
10 mM Mg^{2+}	-	2.4 ± 0.3
10 mM Mn^{2+}	-	2.1 ± 0.1
10 mM Fe^{2+} ใน H_2O	1.01 ± 0.1	0.9 ± 0.2
10 mM Fe^{2+} ใน 0.01 M HCl	1.11 ± 0.1	0.8 ± 0.1

3.7.9 ผลของ SDS ต่อความว่องไวของเอนไซม์

ในการทดลองใช้เอนไซม์ ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน เมื่อหาความว่องไวของเอนไซม์โดยมี SDS อยู่ในปฏิกิริยา 0 และ 3 mM พบว่า SDS ลดความว่องไวของเอนไซม์ จาก 3.9 ± 0.2 nmole/min เป็น 0.4 ± 0.1 nmole/min จากการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อมี SDS 3 mM อยู่ด้วย แสดงว่า SDS 3 mM ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จนเกือบหมด

3.8. HMG-CoA lyase ในเอนไซม์ที่แยกได้

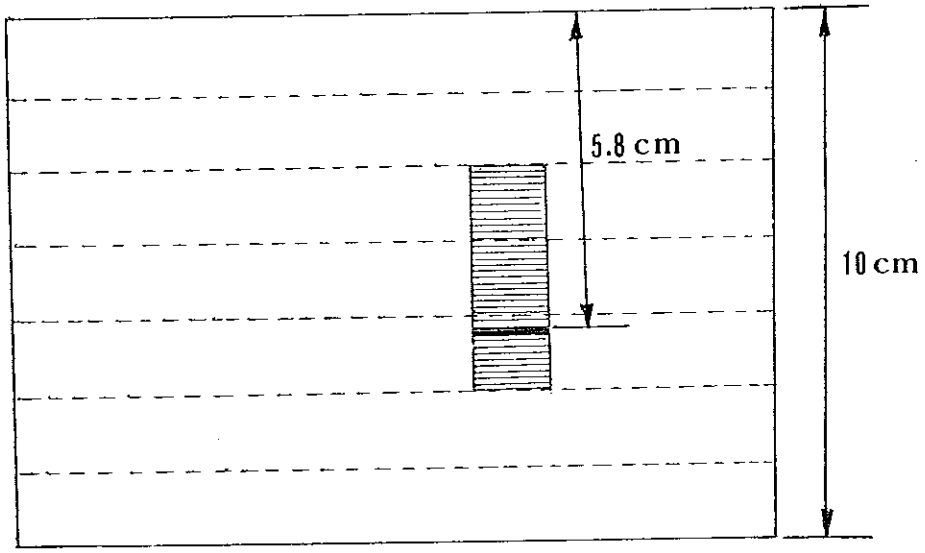
ในการศึกษาเรื่องของ HMG-CoA synthase นั้น หากเอนไซม์มี HMG-CoA lyase อาจทำให้ผลการศึกษาไม่ถูกต้อง จึงจำเป็นต้องศึกษาว่าสารตัวอย่างมี HMG-CoA lyase อยู่ด้วยหรือไม่ โดยติดตามผลของสารตัวอย่างต่อการสลายของ ^{14}C-HMG-CoA ด้วย โดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนออกเพียงบางส่วน ผสมกับ ^{14}C-HMG-CoA อุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน และติดตามดูปริมาณ ^{14}C-HMG-CoA ว่าลดลงตามเวลาหรือไม่พบว่า ปริมาณสาร ^{14}C-HMG-CoA ในปฏิกิริยาไม่ลดลงตามเวลา และไม่ว่าจะใช้เวลา

ในการทำปฏิกิริยาเท่าใดในช่วง 0-10 นาที ปริมาณ ^{14}C-HMG-CoA ก็ยังคงอยู่ในระดับ 129.8 ± 6.4, 129.8 ± 6.2, 130.1 ± 8.3 129.3 ± 6.5, 128.9 ± 7.2, 128.8 ± 9.5 nmole/min ค่อนข้างคงที่ ตามลำดับ แสดงว่า partially purified เอนไซม์ไม่มี HMG-CoA lyase ปน

3.9. การศึกษาเอนไซม์ที่แยกได้ในขั้นตอนต่าง ๆ ว่ามีความบริสุทธิ์สูงขึ้นหรือไม่ โดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส

3.9.1 การทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในสภาพธรรมชาติ

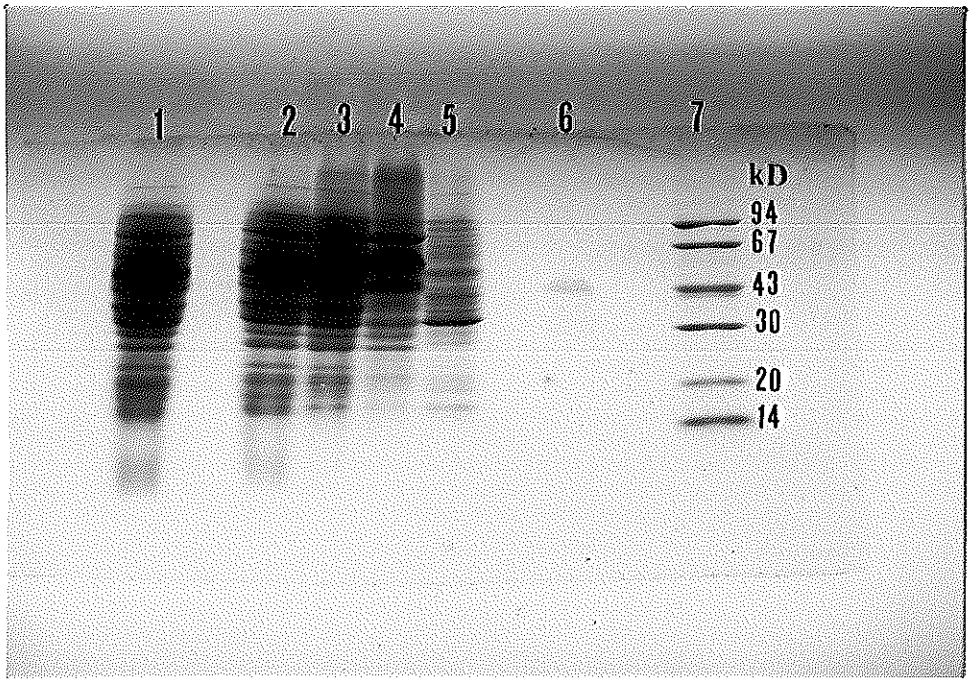
การศึกษาเอนไซม์ที่แยกได้ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยไม่มีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) อยู่ในโพลีอะคริลาไมด์เจล พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้ในขั้นนี้ ยังมีโปรตีนอื่นๆ ปนอยู่ ดังจะเห็นได้จากการย้อมโปรตีนด้วยคูมาซีบลู จะมีแถบโปรตีนอยู่มาก และจากการศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ว่าอยู่ ณ. ตำแหน่งใดของเจล โดยนำแผ่นเจลที่ได้ไปตัดตามช่องที่มีตัวอย่าง ให้เป็นแถบเล็กๆ ขนาด 1-2 มิลลิเมตร และหาความว่องไวของเอนไซม์ในชิ้นเจลเหล่านั้น พบว่าตำแหน่งที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงสุดอยู่ตรงตำแหน่งที่มีค่า Rf 0.58 แสดงว่าเอนไซม์เคลื่อนที่เข้าหาประจุบวก ในสนามไฟฟ้า ดังรูปที่ 12 แสดงว่าที่ pH 8.3 ที่ทำการแยกเอนไซม์นั้น เอนไซม์มีประจุเป็นลบ



รูปที่ 12 ตำแหน่งของเอนไซม์ ในอิเล็กโทรโฟเรซิส แบบไม่มี SDS

3.9.2 ผลการศึกษาเอนไซม์ในอิเล็กโทรโฟเรซิส แบบ SDS

เมื่อนำซี-ซีรั่ม เอนไซม์ในส่วนที่ไม่จับกับ CM-cellulose เอนไซม์ที่ไม่จับกับ CM-cellulose ซึ่งผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 และชะด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 และเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose และชะด้วย 0.1 M NaCl ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 และ 0.2 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 ที่มีปริมาณโปรตีน 50 ไมโครกรัม รวมทั้งเอนไซม์ที่แยกจากการสกัดจากเจล แบบไม่มี SDS ที่มี Rf เท่ากับ 0.58 ในข้อ 3.9.1 โดยมีโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว 6 ตัว คือ ฟอสโฟรีเลสบี (M.W. 94,000 ดาลตัน) โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน (M.W. 67,000 ดาลตัน) อัลบูมินจากไข่ (M.W. 43,000 ดาลตัน) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (M.W. 30,000 ดาลตัน) ทริพซินอินฮิบิเตอร์ (M.W.20,000 ดาลตัน) และแอลฟา-แลคตาบูมิน (M.W. 14,000 ดาลตัน) อยู่ด้วยพบว่า ซี-ซีรั่มมีแถบโปรตีนต่าง ๆ มากมาย เอนไซม์ในส่วนที่ไม่จับกับ CM-cellulose นั้นมีการกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปเพียงเล็กน้อย และแม้นำเอนไซม์ไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 ก็ยังมีแถบโปรตีนต่าง ๆ มาก และเมื่อผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ที่ชะด้วย 0.1 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 และ 0.2 M NaCl ใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 แถบของโปรตีนเหลือน้อยลงแต่ก็มีโปรตีนอยู่หลายชนิดและเมื่อนำไปแยกโดยใช้อิเล็กโทรโฟเรซิส แบบไม่มี SDS และสกัดเจลบริเวณที่มีความว่องไวของเอนไซม์มาศึกษา จะได้แถบโปรตีนที่ชัดเจนเพียงแถบเดียว และน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง โบวีน ซีรัม อัลบูมินและอัลบูมินจากไข่ ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 SDS เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของซี-ซีรั่ม เอนไซม์ในส่วนที่ไม่จับกับ CM-cellulose เอนไซม์ที่ไม่จับกับ CM-cellulose ซึ่งผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 และชะด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 และเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose และชะด้วย 0.1 M NaCl ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ และ 0.2 M NaCl ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ และเอนไซม์ที่แยกจากการสกัดจากเจลแบบไม่มี SDS

ช่องที่ 1 ซี-ซีรั่มที่มีปริมาณโปรตีน 40 ไมโครกรัม

ช่องที่ 2 เอนไซม์ส่วนที่ไม่จับกับ CM-cellulose 40 ไมโครกรัม

ช่องที่ 3 เอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ sephadex G-75 40 ไมโครกรัม

ช่องที่ 4 เอนไซม์ที่ผ่าน DEAE cellulose eluted with 0.2 M NaCl 40 ไมโครกรัม

ช่องที่ 5 เอนไซม์ที่ผ่าน DEAE cellulose eluted with 0.1 M NaCl 40 ไมโครกรัม

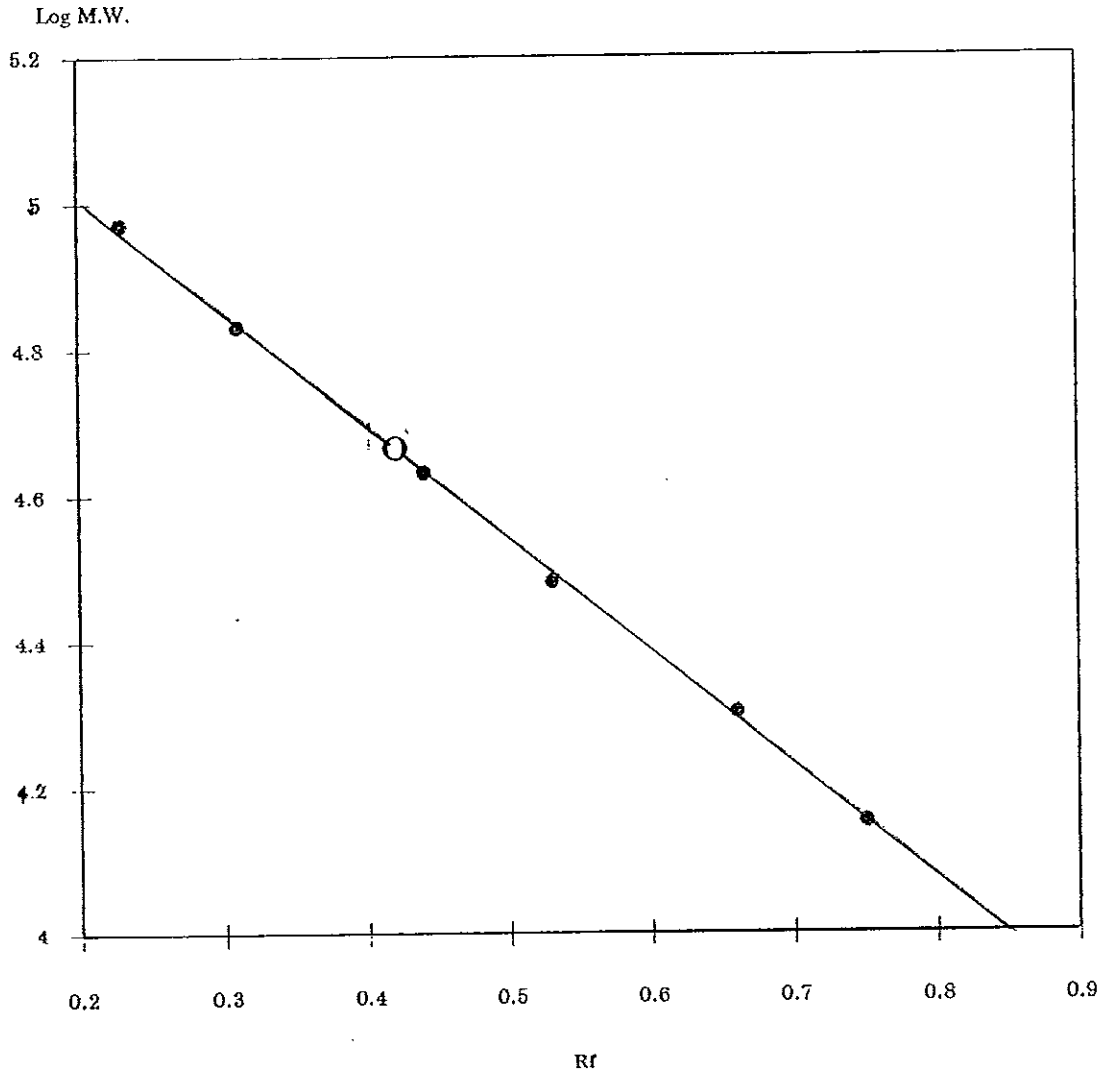
ช่องที่ 6 เอนไซม์ที่แยกจากการสกัดเจลแบบไม่มี SDS

ช่องที่ 7 โปรตีนมาตรฐาน

3.10. น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

3.10.1 น้ำหนักโมเลกุลจาก เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แบบมี SDS

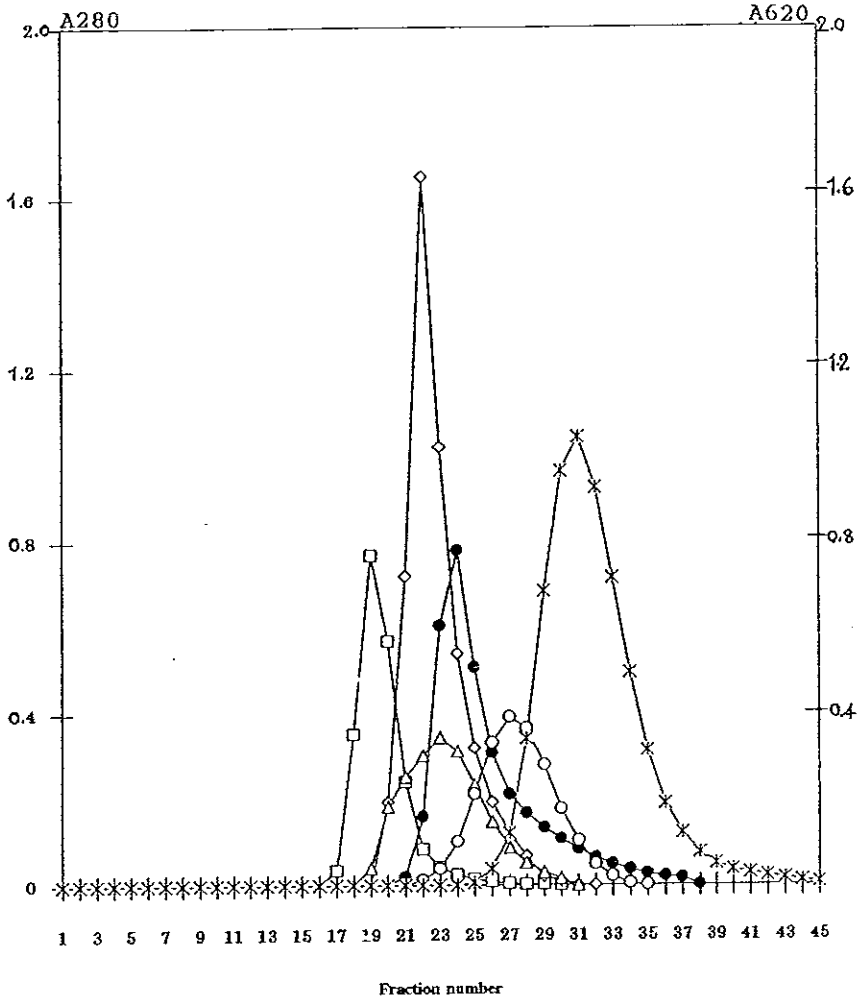
เอนไซม์ที่สกัดได้จาก เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แบบไม่มี SDS ณ. ตำแหน่งที่มีความว่องไวสูงสุดจากการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสจากหลายๆ ช่อง ด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอที่จะนำไปหาน้ำหนักโมเลกุล โดยเทียบระยะทางที่เอนไซม์เคลื่อนที่ได้กับโปรตีนมาตรฐานและโบรโมฟีนอล โปรตีนจะเคลื่อนที่ได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาด จากกราฟระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ได้ 44,670 ดาลตัน (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE โดยมีโปรตีนมาตรฐาน 6 ตัวคือ ฟอสโฟรีเลส บี (M.W. 94,000 ดาลตัน) โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน (M.W. 67,000 ดาลตัน) อัลบูมินจากไข่ (M.W. 43,000 ดาลตัน) คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (M.W. 30,000 ดาลตัน) ทริพซินอินฮิบิเตอร์ (M.W. 20,000 ดาลตัน) และ แอลฟา-แลคตาบูมิน (M.W. 14,000 ดาลตัน)จากกราฟหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ได้ 44,670 ดาลตัน

3.10.2 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น โครมาโกราฟฟี่

เอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนอื่นออกไปบางส่วนแล้ว โดยใช้ CM-cellulose จับโปรตีนบางส่วน และเอนไซม์ในส่วนที่ไม่จับกับ CM-cellulose นี้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นต่อไป โดยการผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วย เซฟาเด็กซ์ G-75 แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย centriflo membrane cone CF-25 เมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ G-100 แล้ววัดปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะโปรตีน หรือปริมาตรชะ ที่ชะเอนไซม์นี้ออกมา ปริมาตรชะของเอนไซม์นี้ หาได้โดยติดตามความว่องไวของเอนไซม์ที่ถูกชะออกมาเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลจำนวน 4 ตัว บรรจุในคอลัมน์เดียวกันนี้ทีละตัว และชะด้วย 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 จดปริมาตรชะของโปรตีนมาตรฐานเหล่านี้ ดังรูปที่ 15 เมื่อใช้กราฟระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า V_e/V_o ของโปรตีนมาตรฐาน หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ HMG-CoA synthase พบว่าเอนไซม์นี้มีขนาด 58,600 ดาลตัน ดังรูปที่ 16



รูปที่ 15 การชะโปรตีนและเอนไซม์จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-100 ติดตามการเคลื่อนที่ของบลูเด็กซ์แตรน และโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ

(□—□) แสดงการเคลื่อนที่ของบลูเด็กซ์แตรนที่ A_{620} nm

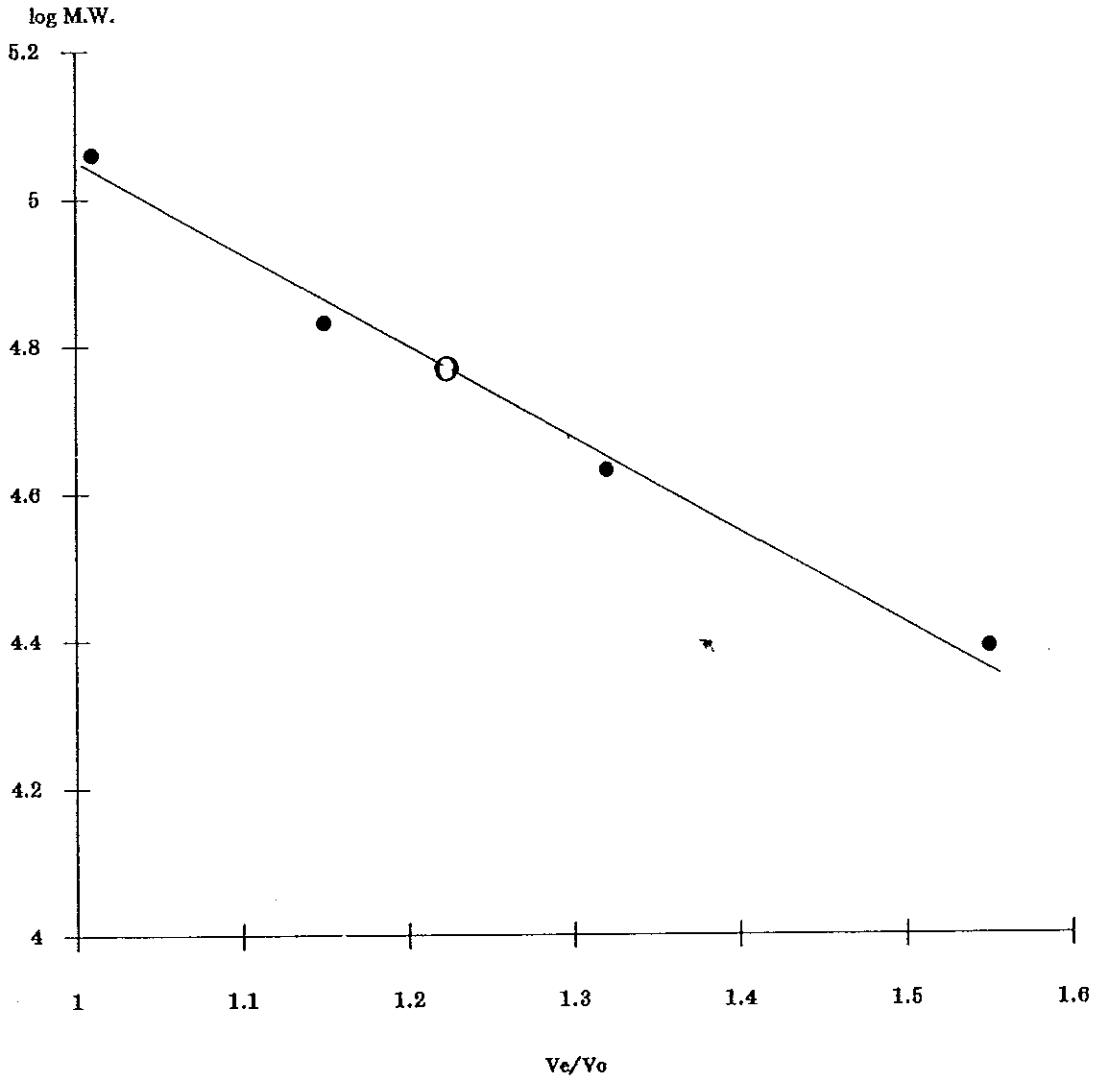
(◇—◇) แสดงปริมาณโปรตีน เบต้ากาแลคโตซิเดสที่ A_{280} nm

(Δ—Δ) แสดงปริมาณโปรตีน โบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน ที่ A_{280} nm

(●—●) แสดงปริมาณโปรตีนสารตัวอย่าง ที่ A_{280} nm

(O—O) แสดงปริมาณโปรตีน อัลบูมินจากไข่ ที่ A_{280} nm

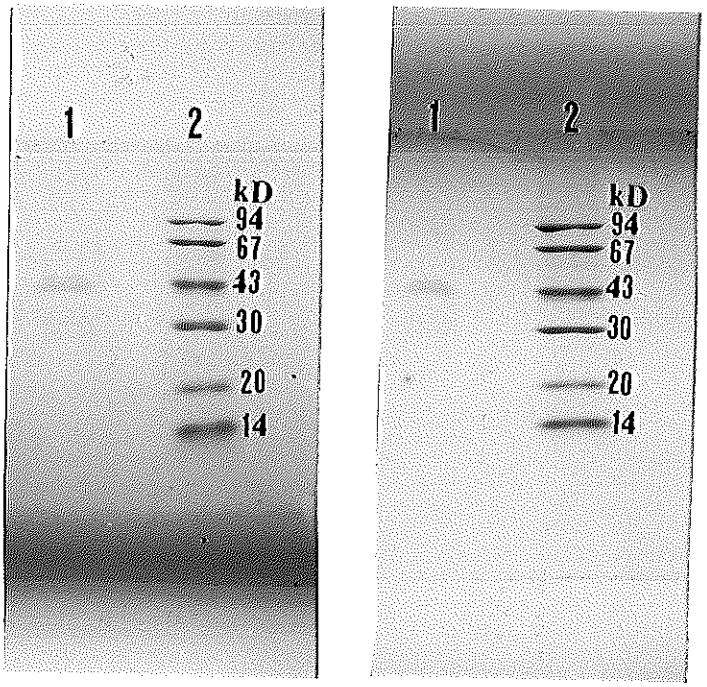
(✳—✳) แสดงปริมาณโปรตีนไคโมทริพซิโนเจน เอ ที่ A_{280} nm



รูปที่ 16 log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับค่า V_e/V_o ของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-100 (ในรูปที่ 15) โดยมีโปรตีนมาตรฐาน 4 ตัวคือเบต้ากาแลคโตซิเดส (M.W. 116,000 ดาลตัน) โบวีน ซีรั่มอัลบูมิน (M.W. 67,000 ดาลตัน) อัลบูมินจากไข่ (M.W. 43,000 ดาลตัน) และไคโมทริพซิโนเจน เอ (M.W. 25,000 ดาลตัน) จากกราฟหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ได้ 58,600 ดาลตัน

3.11 การศึกษาหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์จากซี-ซีรั่ม

ในการศึกษาว่าเอนไซม์ที่ได้จากการสกัด non SDS-PAGE เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสว่าเป็นโปรตีนที่มีหน่วยย่อยเพียง 1 หน่วย (โมโนเมอร์) หรือประกอบด้วยหน่วยย่อยมากกว่า 1 หน่วย (โพลีเมอร์) และถ้ามีหน่วยย่อยมากกว่า 1 หน่วยแล้ว หน่วยย่อยเหล่านั้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันหรือไม่ โดยศึกษาลักษณะการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ ใน SDS โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้เอนไซม์ 40 ไมโครกรัมเท่ากันในสภาวะต่าง ๆ กัน พบว่าแถบของโปรตีน. ที่ไม่ได้รีดิวซ์เอนไซม์ด้วยเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล และแถบของโปรตีน ที่รีดิวซ์เอนไซม์ด้วยเบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล ต่างก็ประกอบด้วยโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 44,670 ดาลตัน เพียงขนาดเดียวไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 17 แสดงว่าเอนไซม์นี้น่าจะเป็นโมโนเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 44,670 ดาลตัน



(ก) (ข)

รูปที่ 17 SDS โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของเอนไซม์

(ก) ไม่ถูกรีดิวซ์ด้วย เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล

(ข) ถูกรีดิวซ์ด้วย เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล

ช่องที่ 1 เอนไซม์ที่แยกจากการสกัดเจลแบบไม่มี SDS

ช่องที่ 2 โปรตีนมาตรฐาน

3.12 การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในส่วนตะกอนก้นหลอดของน้ำยางพาราให้บริสุทธิ์ขึ้น

ตะกอนก้นหลอดที่แยกได้จากน้ำยางพาราจำนวน 2 มิลลิลิตร ที่ละลายใน 0.1 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.2 , 0.2 mM EDTA และ Brij W-1 ร้อยละ 2 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร มีความว่องไวของเอนไซม์ทั้งหมดจากการนำเอา ^{14}C-acetyl CoA ไปสังเคราะห์เป็น ^{14}C-HMG-CoA ได้เท่ากับ 453 nmole/min และมีโปรตีนจากการวัดการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร 110 หน่วย ความว่องไวจำเพาะในรูปของ nmole/min/ OD 280 เท่ากับ 4.1 เมื่อนำเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ที่ออกจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 มีค่าลดลงมาก คือจากเดิมความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 453 nmole/min เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 เหลือความว่องไวของเอนไซม์เท่ากับ 30 nmole/min และปริมาณโปรตีนที่วัดโดยการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 280 นาโนเมตร พบว่ามีปริมาณโปรตีนลดลงจากเดิม 110 เป็น 50.26 หน่วย และความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ลดลงจากเดิม 4.1 nmole/min/ OD เป็น 0.6 nmole/min/ OD เหลือเอนไซม์เพียงร้อยละ 6.6 (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 การแยกเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากตะกอนก้นหลอดของยางพารา ให้บริสุทธิ์ขึ้น

ขั้นตอน	ความว่องไวทั้งหมด (nmole/min)	ปริมาณโปรตีน (A_{280})	ความว่องไวจำเพาะ (nmole/min/ A_{280})	เอนไซม์ที่ได้ (ร้อยละ)
เอนไซม์ใน ตะกอนก้นหลอด	453	110	4.1	100
คอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ G-75	30	50.26	0.6	6.6

4. วิจารณ์

4.1 เอนไซม์ที่พบในน้ำยางพารา

เมื่อแยกน้ำยางพาราออกเป็น 4 ส่วน นำแต่ละส่วนไปหาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ยกเว้นส่วนของยางที่ไม่สามารถทำได้ พบว่าในส่วนของซี-ซีรั่ม ซึ่งเปรียบเหมือนของเหลวในไซโทพลาซึม (cytosolic fluid) มีความว่องไวของเอนไซม์สูงสุด รองลงมาคือตะกอนของก้นหลอดซึ่งประกอบด้วย lutoid bodies มีลักษณะเป็นอนุภาคที่มีเยื่อหุ้มเช่นเดียวกับไมโทคอนเดรีย เอนไซม์นี้ในสัตว์จะพบได้ทั้งในไซโทพลาซึมและไมโทคอนเดรีย เช่น ในเซลล์ตับไก่ ตับหนู และสมองหนู (Clinkenbeard และคณะ 1975, Miziorko และคณะ 1977, Miziorko 1985, Shah 1982) แต่ในน้ำยางพารา เอนไซม์นี้มีปริมาณสูงในซี-ซีรั่ม ซึ่งแตกต่างจาก HMG-CoA synthase ในเซลล์สัตว์ซึ่งจะมีปริมาณสูงในส่วนของไมโทคอนเดรีย (Clinkenbeard และคณะ 1975, Shah 1982) เอนไซม์ในส่วนของซี-ซีรั่ม และในส่วนของไซโทพลาซึมของเซลล์สัตว์ อาจเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ isoprenoid เช่นเดียวกัน

จากการศึกษานี้พบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่พบในน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM 600 มีความว่องไวจำเพาะ 70 nmole/min/mg protein หรือ 550 nmole/min/ml latex ซึ่งพบว่ามีปริมาณสูงกว่า HMG-CoA reductase หลายเท่า (7051 เท่า) Lynen (1969) พบว่าในน้ำยางพารามี HMG-CoA synthase 232 nmole/min/ml latex และ HMG-CoA reductase 0.078 nmole/min/ml latex ความแตกต่างเกี่ยวกับความว่องไวของการศึกษานี้ กับของ Lynen อาจเนื่องจากวิธีการที่ต่างกัน

4.2 HMG-CoA lyase

การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยวิธีใช้สารกัมมันตรังสีจะต้องกำจัด HMG-CoA lyase ซึ่งอาจมีผลต่อการทดลองออกก่อน ในการศึกษานี้ ได้ทดสอบหาว่ามี HMG-CoA lyase อยู่ในน้ำยางพาราหรือไม่ โดยการใช้ ^{14}C-HMG-CoA ผสมในสารละลายเอนไซม์อุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0-10 นาที ติดตามดูปริมาณ ^{14}C-HMG-CoA ว่าลดลงตามเวลาหรือไม่ พบว่า HMG-CoA ไม่ลดลงแสดงว่าไม่มี HMG-CoA lyase ในน้ำ

ยางพารา หรือมีก็น้อยมากไม่สามารถตรวจวัดได้ในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Hepper และ Audley (1969) ที่ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานถึง 3 ชั่วโมง จึงสามารถตรวจพบความว่องไวของ HMG-CoA lyase ในน้ำยางพาราเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากการศึกษาพบว่าในน้ำยางพารา ซี-ซีรั่มและในส่วนของตะกอนก้นหลอดต่างก็ไม่มี HMG-CoA lyase (Suvachittanont และ Wititsuwannakul 1995) เช่นเดียวกับส่วนของไซโทพลาซึมของสมองหนู (Shah 1982) และคล้ายกับไซโทพลาซึมของตับไก่ ซึ่งมี HMG-CoA lyase น้อยมากประมาณร้อยละ 4 แต่ในไมโทคอนเดรีย มี HMG-CoA lyase ปริมาณสูง (Clinkenbeard และคณะ 1975b) นอกจากนี้ยังพบว่า การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยแยกโปรตีนอื่น ๆ ออกไปก็ไม่พบ HMG-CoA lyase แสดงว่าไม่มี HMG-CoA lyase อยู่ในซี-ซีรั่มจริง ๆ มิใช่เป็นเพราะมีโปรตีนอื่น ๆ ที่ยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA lyase ปนอยู่

4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อเอนไซม์ HMG-CoA synthase

เมื่อซี-ซีรั่มถูกทำให้เจือจางลงถึง 1 : 6 ของความเข้มข้นเดิมเกลือ NaCl 0.2 M สามารถยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase แต่ถ้าเติม 30 % กลีเซอรอล ความว่องไวของเอนไซม์จะกลับมาเหมือนเดิม แสดงว่าเมื่อเอนไซม์นี้อยู่ในสภาพเจือจางจะมีความไวต่อเกลือ และกลีเซอรอล 30% ช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ได้ Clinkenbeard และคณะ (1975a) พบว่า 30 % กลีเซอรอล ช่วยทำให้เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-3 เดือน เอนไซม์ในซี-ซีรั่มสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 4 สัปดาห์ โดยความว่องไวลดลงเพียงเล็กน้อย ส่วนเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่มที่แยกโปรตีนอื่น ๆ บางส่วนออกแล้ว พบว่าเกลือ NaCl (0.1-0.2 M) ยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ได้ร้อยละ 25 ถึงร้อยละ 45 ดังนั้นการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงผลของเกลือด้วย

4.4 ผลของ pH ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่ม คือ pH 8.2 แต่เอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ผ่านขั้นตอนทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้ว จะมี pH ที่เหมาะสมที่ pH 7.5 ทั้งนี้อาจเนื่องจากการกำจัดโปรตีนออกบางส่วนแล้วทำให้สิ่งแวดล้อม

ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป มีผลให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH เปลี่ยนแปลงไป สำหรับเอนไซม์นี้ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 8.0-8.2 (Miziorko และคณะ 1977, Miziorko 1985, Balasubramanium และคณะ 1977, Miziorko และคณะ 1982, Shah 1982) แต่ Clinkenbeard และคณะ (1975b) พบว่า เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึมของตับไก่ มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ระหว่าง 9.2-9.4 pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่ได้จากต้นอ่อนของแรดิช มีค่า pH 8.0 (Weber และคณะ1994) ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่ม เป็นที่น่าสนใจว่า pH ของซี-ซีรั่มในน้ำยางพาราที่ได้จากต้นยางมีค่าอยู่ในช่วง 6.5 - 7.0 แต่ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์มีค่า 8.0-8.-2 อาจเป็นไปได้ที่ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอนไซม์นี้เกิดขึ้นในบริเวณเล็ก ๆ (micro-environment) ซึ่งมี pH ที่เหมาะสำหรับการเกิดปฏิกิริยา แม้ว่าการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ในหลอดทดลอง ความว่องไวของเอนไซม์จะเหลือเพียงร้อยละ 40 ที่ pH 6.0 และความว่องไวของเอนไซม์จะเหลือประมาณร้อยละ 80 ที่ pH 9.0 แสดงว่า pH ที่สูงกว่า 7.0 มีผลน้อยกว่า pH ที่ค่อนข้างเป็นกรด

4.5 บทบาทของ acetoacetyl CoA และ acetyl CoA

เมื่อนำ partially purified เอนไซม์มาศึกษาความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase โดยมี acetoacetyl CoA ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0-0.25 mM และใช้ acetyl CoA 0.5 mM พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ มีค่าไม่แตกต่างกันแสดงว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ แม้ว่าจะไม่มีการเติม acetoacetyl CoA ลงในปฏิกิริยา ปรากฏการณ์นี้พบในกรณีที่ศึกษาโดยใช้ซี-ซีรั่มเป็นแหล่งของเอนไซม์ซึ่งทำให้เข้าใจว่ามี acetoacetyl CoA ในซี-ซีรั่มเพียงพอสำหรับปฏิกิริยา (Suvachittanont และ Wititsuwannakul 1995) Shah (1982) พบว่า acetoacetyl CoA ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในไซโทพลาซึมของสมองหนู และอธิบายได้ว่ามี acetoacetyl CoA อยู่ในไซโทพลาซึมของสมองหนูเพียงพอในการทำปฏิกิริยา แต่ partially purified เอนไซม์ที่แยกจากซี-ซีรั่มนั้น ผ่านกระบวนการแยกสารโดยเจลฟิลเตรชั่น ซึ่งแยกสารโมเลกุลเล็ก ๆ เช่น acetoacetyl CoA ออกไปแล้ว ดังนั้นคำอธิบายที่ว่า acetoacetyl CoA ที่มีอยู่มากพอ จึงไม่อาจใช้ได้ในกรณีนี้ แต่ปฏิกิริยาการเกิด HMG-CoA อาจจะเกิดได้โดยการรวมตัวกันของ 2 acetyl CoA $\longrightarrow$ acetoacetyl CoA + CoA ซึ่งเกิดปฏิกิริยารวดเร็วมาก

โดยเอนไซม์ thiolase ที่ยังคงมีอยู่ แล้ว acetoacetyl CoA จึงรวมตัวกับ acetyl CoA อีก 1 โมเลกุลเกิดเป็น HMG-CoA Bach และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้จากต้นอ่อนของแรดิช ไม่ต้องการ acetoacetyl CoA ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเช่นกัน แต่ Bach และคณะ (1991) คิดว่าที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเอนไซม์ HMG-CoA synthase และ acetoacetyl CoA thiolase ในพืชอาจเป็นเปปไทด์สายเดียวที่มีหน้าที่การทำงานสองอย่าง คือ เป็นทั้ง synthase และ thiolase หากสามารถแยก HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์ได้ และศึกษาผลของ acetoacetyl CoA ทำให้ทราบแน่ชัดว่า HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่มของน้ำยางพารา มีลักษณะเหมือนหรือต่างกับเอนไซม์ในต้นอ่อนของแรดิชหรือไม่ HMG-CoA synthase ในไซโทพลาซึมของตับไก่ มีค่า K_m ของ acetoacetyl CoA ค่อนข้างต่ำ คือ $<2 \times 10^{-6}$ M (Clinkenbeard และคณะ 1975b, Miziorko และคณะ 1982) จากรายงานของ Miziorko และคณะ (1982) พบว่าความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในตับไก่จะลดลงอย่างช้า ๆ ถ้าเพิ่มจำนวน acetoacetyl CoA แต่ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่มที่ศึกษาจะไม่ลดลง

เอนไซม์ในซี-ซีรั่มที่ผ่านการแยกโปรตีนบางส่วนออกแล้ว จะมีความว่องไวของเอนไซม์สูงขึ้นตามความเข้มข้นของ acetyl CoA ที่เพิ่มขึ้น มีค่า K_m ของ acetyl CoA เท่ากับ 1 mM เมื่อใช้ 0.05 mM acetoacetyl CoA แต่ K_m ของ acetyl CoA ของเอนไซม์นี้ ที่พบในซี-ซีรั่มเท่ากับ 9 mM (Suvachittanont และ Wititsuwannakul 1995) ส่วนเอนไซม์นี้ในไซโทพลาซึมของตับไก่ มีค่า K_m ของ acetyl CoA เท่ากับ 290-310 μM (Clinkenbeard และคณะ 1975b)

4.6 ผลของ EDTA ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่ม

ในปฏิกิริยาที่มี 0.1 mM EDTA ผสมอยู่ เอนไซม์จะมีความว่องไวสูงกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มี 0.1 mM EDTA ถึง 2.6 เท่า แสดงว่า EDTA อาจไปจับกับแคทไอออนซึ่งยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์อยู่ และหากเติมแคทไอออนต่างๆ ลงไป เช่น Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+} ความเข้มข้น 10 mM ลงไปในขณะที่มี 0.1 mM EDTA อยู่พบว่าแคทไอออนเหล่านี้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เพราะแคทไอออนมีปริมาณมากกว่า EDTA มาก ส่วน 10 mM Fe^{2+} ทำให้ความว่องไวของ partially purified เอนไซม์ในซี-ซีรั่มลดลงประมาณร้อยละ 75

ถึงร้อยละ 80 ทั้ง Fe^{2+} ที่ละลายในน้ำกลั่นและละลายใน 0.01 M HCl แต่ Bach และคณะ (1991) พบว่า Fe^{2+} chelated ด้วย EDTA จะกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ให้สูงขึ้น และถ้ามี cofactor เป็น pyrroloquinoline quinone ความว่องไวของเอนไซม์จะยิ่งสูงขึ้นมาก Clinkenbeard และคณะ (1975c) พบว่า 20 mM ของ Mg^{2+} จะยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียของตับไก่ได้ประมาณร้อยละ 80 แต่จะกระตุ้นความว่องไวของเอนไซม์ในไซโทพลาซึมได้ประมาณร้อยละ 50

4.7 ผลของไดไธโอทรีทอล, ไอโอโดอะเซตาไมด์ และ SDS ต่อความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase

ไดไธโอทรีทอล ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้เอนไซม์ที่มี reactive sulfhydryl groups มีความคงตัวแต่เป็นที่น่าประหลาดใจว่าไดไธโอทรีทอล 2 mM-60 mM ลดความว่องไวของ partially purified เอนไซม์ เกือบหมดในทุกกรณี แต่เอนไซม์ในซี-ซีรั่มมีความไวต่อ ไดไธโอทรีทอลน้อยกว่า โดยจะถูกยับยั้งเพียงร้อยละ 70 เมื่อใส่ 10 mM ไดไธโอทรีทอล ทำไมจึงเป็นเช่นนี้ไม่สามารถอธิบายได้ เพราะทราบกันว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากแหล่งอื่น จะมีหมู่ sulfhydryl (Miziorko และ Behnke 1985a) ดังนั้นการเติมไดไธโอทรีทอลน่าจะช่วยรักษาให้มีความว่องไวสูง

ไอโอโดอะเซตาไมด์ เป็น alkylating agent ที่อาจจับ cysteine ตรง active site ยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ได้ พบว่าทั้งเอนไซม์ในซี-ซีรั่มและ partially purified เอนไซม์ ถูกยับยั้งโดยไอโอโดอะเซตาไมด์ แสดงว่าเอนไซม์นี้น่าจะมี cysteine อยู่ตรง active site เช่นกัน

เป็นที่น่าสนใจว่า SDS 3 mM ที่ใช้ในการศึกษา SDS-PAGE จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์หรือไม่ เพราะหากไม่มีจะได้ศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยวัดความว่องไวของเอนไซม์ ในแผ่น SDS เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แต่พบว่า 3 mM SDS สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เกือบหมด จึงไม่อาจใช้วิธีนี้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลได้

4.8 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

เป็นที่ทราบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในพืช เสียสภาพธรรมชาติในสารละลายที่

มีเกลือความเข้มข้นสูงอยู่ด้วย (Alam และ คณะ 1991) ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่เอนไซม์ยังคงรักษาสภาพอยู่ได้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่ม จะเสียความว่องไวในระหว่างขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เสมอในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้อะซีโตนที่เย็นตกตะกอนโปรตีน พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ตกตะกอนเกือบหมด โดยสูญเสียความว่องไวเอนไซม์เพียงร้อยละ 16.6 จัดว่าไม่มากนัก และกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ไปได้ร้อยละ 15 และความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ในซี-ซีรั่มเป็น 88.2 nmole/min/mg protein และใน resuspended acetone precipitate มีความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ เป็น 87.7 nmole/min/mg protein การใช้ CM-cellulose ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่าสามารถแยกโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้มาก โดยโปรตีนอื่น ๆ จับกับ CM-cellulose แต่เอนไซม์ HMG-CoA synthase ไม่จับกับ CM-cellulose และสูญเสียความว่องไวของเอนไซม์ไปประมาณร้อยละ 32.6 กำจัดโปรตีนอื่น ๆ ได้ร้อยละ 66.9 มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 2.03 เท่า

การใช้ centriflo membrane cone CF-25 เพื่อกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 25,000 ดาลตัน สามารถกำจัดโปรตีนได้ประมาณร้อยละ 47.3 และสูญเสียความว่องไวของเอนไซม์ร้อยละ 11.8 ทำให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 3.41 เท่า

การใช้เซฟาเด็กซ์ G-75 ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ซึ่งสามารถแยกน้ำหนักโมเลกุลได้ดีในช่วง 3,000-70,000 ดาลตัน สามารถกำจัดโปรตีนได้ร้อยละ 39.8 และสูญเสียความว่องไวของเอนไซม์ไปร้อยละ 21 ทำให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 4.5 เท่า

การใช้ DEAE-cellulose ซึ่งเป็น anion exchange โครมาโตกราฟฟี่ เอนไซม์จะจับกับคอลัมน์ สามารถชะโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วย 0.1 M NaCl ซึ่งเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่เจือจาง และมีเกลือ 0.1 M NaCl อยู่ด้วย ทำให้สูญเสียเอนไซม์ไปร้อยละ 78.6 กำจัดโปรตีนไปร้อยละ 82.6 เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 6.8 เท่า มีปริมาณเอนไซม์อยู่ร้อยละ 8.5 ชะต่อไปด้วย 0.2 M NaCl ได้เอนไซม์บริสุทธิ์ 6.3 เท่า มีปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 13.3

เมื่อนำเอนไซม์แต่ละขั้นตอนไปศึกษาการแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าแต่ละขั้นตอนยังคงมีโปรตีนอื่น ๆ ปนอยู่มากและมีเอนไซม์เหลืออยู่ประมาณร้อยละ 20 และปริมาณโปรตีนลดลงจาก 216 mg เป็น 5 mg

4.9 ลักษณะของเอนไซม์ที่แยกได้

จากข้อมูลของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นนี้ ทำให้พอจะสรุปลักษณะของเอนไซม์นี้ได้ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่เป็นปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมดและเป็นเอนไซม์ที่ไม่เสถียร สูญเสียความว่องไวได้ง่าย ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้มากพอที่จะศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ได้

แม้ว่าการแยกเอนไซม์ด้วย CM-cellulose และ เซฟาเด็กซ์ G-75 จะยังไม่บริสุทธิ์ แต่เมื่อนำไปทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี non SDS-PAGE นำชิ้นส่วนเจลที่มีความว่องไวของเอนไซม์สูงที่สุดสกัดเอาเอนไซม์ไปทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบมี SDS เทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล พบว่ามีแถบโปรตีนที่ชัดเจน 1 แถบอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลระหว่างโบวีน ซีรั่ม อัลบูมิน (M.W. 67,000 ดาลตัน) และอัลบูมินจากไข่ (M.W. 43,000 ดาลตัน) และเมื่อนำไปหา log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนกับการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโปรตีนมาตรฐาน พบว่าได้น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่า 44,670 ดาลตัน

เมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ภายหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ G-75 ไปหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟฟี่และติดตามความว่องไวของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 58,600 ดาลตันการที่น้ำหนักโมเลกุลจาก SDS-PAGE ต่ำกว่าน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จากเจลฟิลเตรชั่น โครมาโตกราฟฟี่ แสดงว่าโครงสร้างของโมเลกุลน่าจะมีลักษณะเป็น fibrous เมื่ออยู่ในสภาพที่มี SDS ทำให้มีลักษณะเป็น random coil มีรูปร่างกระทัดรัดขึ้น น้ำหนักโมเลกุลที่ศึกษาได้จึงต่ำกว่า

การศึกษาหน่วยย่อยของเอนไซม์โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จากเจลแล้ว โดยการเปรียบเทียบเอนไซม์ที่ไม่ถูกรีดิวซ์ และถูกรีดิวซ์ด้วย 5 % เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอลใน SDS-PAGE พบแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 44,670 ดาลตัน เพียงแถบเดียว แสดงว่าเอนไซม์นี้น่าจะเป็นโมโนเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 44,670 ดาลตัน แต่เอนไซม์ HMG-CoA synthase ในไมโทคอนเดรียของตับไก่ มีค่าอยู่ระหว่าง 96,000 - 105,000 ดาลตัน และประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 52,000 ดาลตัน Clinkenbeard และคณะ(1975b) พบว่าส่วนที่พบในไซโทพลาซึมมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 90,000-100,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 52,000-58,000 ดาลตัน ส่วน Bach และคณะ (1990 และ 1991) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ AACT/HMGS จากต้นอ่อน

ของแรดิช โดยใช้วิธีเจลฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟฟี่ ได้น้ำหนักโมเลกุล 54 kD ส่วน Weber และคณะ (1994) ศึกษาน้ำหนักโมเลกุล AACT/HMGS โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเป็นโปรตีนเดี่ยว 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 55.5 ± 2 kD จะเห็นว่าเอนไซม์ HMG-CoA synthase ที่แยกได้จากน้ำยางพาราและที่แยกได้จากต้นอ่อนของแรดิช ซึ่งเป็นเซลล์พืชมีขนาดใกล้เคียงกัน (52-58 kD) และมีโปรตีนเดี่ยวเช่นเดียวกัน แต่แตกต่างกันกับเอนไซม์จากสัตว์ทั้งในด้านขนาดน้ำหนักโมเลกุลและโปรตีนเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ

4.10 แนวทางที่อาจปรับปรุงในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

จากการทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase จากซี-ซีรั่มให้บริสุทธิ์ขึ้นสามารถแยกโปรตีนออกได้เพียงบางส่วนเท่านั้น เพราะว่ายังมีโปรตีนอื่น ๆ ปนอยู่มาก สังเกตจาก SDS-PAGE เนื่องจากเอนไซม์ไม่เสถียร สูญเสียความว่องไวของเอนไซม์ได้ง่ายในสภาพที่เจือจาง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนานเกินกว่า 24 ชั่วโมง ในขั้นตอนทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งเอนไซม์ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์จะอยู่ในสภาพที่เจือจาง และชะคอลัมน์ด้วยเกลือ ยิ่งทำให้เอนไซม์สูญเสียความว่องไวมากขึ้น การทดลองนี้ ใช้โปรตีนในซี-ซีรั่ม 216 mg ในการแยกเอนไซม์ หากเพิ่มปริมาณซี-ซีรั่มให้มากขึ้น ก็อาจจะสามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้มากกว่านี้ เพราะเอนไซม์นี้ในซี-ซีรั่ม เป็นโปรตีนที่มีปริมาณน้อยและไม่เสถียรเสียสภาพความว่องไวได้ง่าย ในสภาพที่เจือจางและในสภาพที่มีเกลืออยู่ด้วย

ในการทดลองนี้สามารถแยกเอนไซม์ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ขึ้น โดยการสกัดจาก non SDS-PAGE เจล ดังจะเห็นจากแถบของโปรตีนที่ชัดเจนเพียงแถบเดียวแต่ปริมาณของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธีนี้ยังน้อย ไม่เพียงพอที่จะนำไปศึกษาสมบัติอื่นๆหรือนำไปใช้ประโยชน์อื่น ๆ เช่น ใช้ในการฉีดสัตว์ทดลอง เพื่อให้สัตว์สร้าง antibody จะต้องทำการทดลองซ้ำ ๆ หลาย ครั้ง ซึ่งเสียเวลาในการทำการทดลองมาก จากการศึกษาของ Weber และคณะ (1994) และ Bach และคณะ (1990) สามารถทำเอนไซม์ AACT/HMGS จากต้นอ่อนของแรดิช ให้บริสุทธิ์โดยมีโปรตีน 1 แถบโดยใช้ระบบ FPLC (Weber และคณะ 1994) หากได้ใช้วิธี FPLC มาช่วยในการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์น่าจะให้ผลดีขึ้น หากสามารถแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มากพอที่จะศึกษาสมบัติ และลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในโปรตีนนี้ และสามารถเตรียม probe ไว้ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของ HMG-CoA synthase ของยางพาราสายพันธุ์ต่าง ๆ การ

ตรวจสอบจะมีความไวสูงขึ้นกว่าการใช้เอนไซม์โดยตรง หรือ ดีกว่าการใช้ antibody ของเอนไซม์ ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางที่ดีต่อไปในอนาคตได้

5. สรุป

การศึกษาเรื่องของเอนไซม์ HMG-CoA synthase ในน้ำยางพารา สรุปเป็นข้อ ๆ ได้ดังนี้

1. ในน้ำยางพารามี HMG-CoA synthase มากที่สุดในส่วนของซี-ซีรั่ม รองลงมาคือส่วนของตะกอนก้นหลอด และมีน้อยที่สุดในส่วนของฟรีวิสลิ่ง

2. ในน้ำยางพาราส่วนของซี-ซีรั่ม และส่วนของตะกอนก้นหลอด ต่างก็ไม่มี HMG-CoA lyase และใช้เอนไซม์ที่แยกโปรตีนอื่น ๆ ออกเพียงบางส่วนแล้ว ก็ยังคงไม่มี HMG-CoA lyase

3. HMG-CoA synthase เป็นเอนไซม์ที่ไม่เสถียร ในสภาวะที่เจือจางมากและมีเกลือ NaCl อยู่ด้วยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะสูญเสียความว่องไวของเอนไซม์ได้ง่าย กลีเซอรอล 30 % ลดการเสียความว่องไวได้

4. เอนไซม์ในซี-ซีรั่ม สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 4 สัปดาห์ โดยความว่องไวไม่ลดลง

5. ความว่องไวของเอนไซม์ที่ผ่านการแยกโปรตีนบางส่วนออกแล้ว จะถูกยับยั้งได้โดย NaCl ที่ความเข้มข้น 0.1 - 0.2 M NaCl ทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 25 ถึงร้อยละ 45

6. pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ HMG-CoA synthase ในซี-ซีรั่มมีค่าเท่ากับ 8.0 - 8.2 ในขณะที่เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บ้างแล้ว มี pH ที่เหมาะสมเป็น 7.5

7. acetoacetyl CoA ไม่มีผลต่อความว่องไวของเอนไซม์ในซี-ซีรั่ม และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บ้างแล้ว

8. ความว่องไวของ HMG-CoA synthase มีค่า K_mของ acetyl CoA เท่ากับ 1 mM

9. 0.1 mM EDTA ช่วยให้ความว่องไวของเอนไซม์ HMG-CoA synthase สูงขึ้น แต่ถ้าใส่แคทไอออน เช่น Fe^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} 10 mM ลงไปในขณะที่มี EDTA 0.1 mM อยู่ด้วย ความว่องไวของเอนไซม์ก็จะถูกยับยั้งโดยแคทไอออนเหล่านี้

10. ไดไธโอทรีทอล 10 mM ขึ้นไป จะยับยั้งการทำงานของ partially purified เอนไซม์ได้ประมาณร้อยละ 84 แต่ในซี-ซีรั่ม ไดไธโอทรีทอล 10 mM ยับยั้งได้ประมาณร้อยละ 70

11. ไอโอโดอะเซตาไมด์ 30 mM ขึ้นไป ยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA synthase ได้เกือบหมด ทั้งเอนไซม์ในซี-ซีรั่มและ partially purified เอนไซม์

12. 3 mM SDS ยับยั้งการทำงานของ partially purified HMG-CoA synthase ได้เกือบหมด

13. น้ำหนักโมเลกุลของ partially purified HMG-CoA synthase เมื่อทำ non SDS-PAGE แล้วตัดเอาเจลชิ้นที่มีความว่องไวสูง ไปสกัดเอนไซม์ ทำ SDS-PAGE เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่ามีโปรตีน 1 แถบ น้ำหนักโมเลกุล 44,670 ดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลของ partially purified เอนไซม์ โดยวิธีเจลฟิลเตรชั่น โครมาโตกราฟฟี่ เทียบกับน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน มีค่า 68,600 ดาลตัน และเอนไซม์นี้เป็น monomer เพราะเมื่อถูกรีดิวซ์หรือไม่ถูกรีดิวซ์ด้วย 6 % เบต้าเมอร์แคปโตเอทานอล แล้วทำ SDS - PAGE ได้โปรตีนเพียงแถบเดียว น้ำหนักโมเลกุล 44,670 ดาลตัน

14. การทำเอนไซม์ HMG-CoA synthase ให้บริสุทธิ์โดยใช้ CM - cellulose Gel filtration DEAE - cellulose นั้นทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นได้ 6.8 และ 5.3 เท่า แต่ความว่องไวลดลงไปมากในระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เหลือเพียงร้อยละ 8.5 และร้อยละ 13.3 การชะคอลัมน์ด้วยเกลือ NaCl ทำให้เอนไซม์สูญเสียความว่องไวไปมาก และเมื่อนำไปทำ SDS-PAGE พบว่ายังคงมีโปรตีนอื่น ๆ เหลืออยู่อีกมาก เอนไซม์นี้น่าจะเป็นโปรตีนที่มีอยู่เป็นปริมาณน้อยมากในซี-ซีรั่ม

เอกสารอ้างอิง

คณะกรรมการพิจารณาคำแนะนำพันธุ์ยาง สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร (2527) คำแนะนำพันธุ์ยางปี 2528 วารสารยางพารา 553 - 91

วิจิตรา จุติดำรงพันธุ์, ผจญศักดิ์ ครองชนม์ (2527) การเปรียบเทียบลักษณะของโปรตีนในน้ำยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกในภาคใต้ ว. สงขลานครินทร์ 6 : 221 - 226

อุดส่าห์ จันทร์อำไพ (2527) คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์บางประการของผลผลิตยางไทย 10 พันธุ์ กับ RRIM 600 ว. สงขลานครินทร์ 6 : 121 - 127

Alam, A., Britton, G.,Powls, R. and Goach, J. 1991. Aspects related to 3 -hydroxy 3 - methylglutaryl - CoA synthesis in higher plants. Biochem. Soc. Trans.

Anderson, L. E. and McClure, W. O. 1973. An improved scintillation cocktail of high solubilizing power. Anal. Biochem. 51 : 173-179

19 : 164 S

Ayte, J., Gil-Gomez, G., Haro, D., Marrero, P. F. and Hegardt, F.G. 1990a. Rat mitochondrial and cytosolic HMG-CoA synthase are encoded by two different genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 : 3874-3878

Ayte, J., Gil-Gomez, G., and Hegardt, F.G. 1990b. Nucleotide sequence of a rat liver cDNA encoding the cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. Nucleic Acids Research 18 : 3642-3642

.Ayte, J., Gil-Gomez, G., and Hegardt, F.G. 1993. Structural characterization of the 3′ non-coding region of the gene encoding rat mitochondrial. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. Gene. 123 : 267-270

Bach, T. J., Weber, T. and Motel, A. 1990. Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3 -hydroxy 3 - methylglutaryl - CoA in plants. Rec. Adv. Phytochem. 24 : 1 - 82

Bach, T. J., Boronat, A., Caelles, C.,Ferrer, A., Weber, T. and Wettstiein, A. 1991. Aspects related to mevalonate biosynthesis in plants. Lipids. 26 : 637 - 648

Bach, T. J., Raudot, V., Vollack, K. U., Weber, T. and Zeiler, S. 1994. Further studies on the enzymatic conversion of acetyl-coenzyme A into 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A in radish. Plant Physiol. Biochem. 32 (6) : 775 - 783

Balasubramanium, S., Goldstein, J. L. and Brown, M.S. 1977. Regulation of cholesterol synthesis in rat adrenal gland through coordinate control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and reductase activities. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S..A. 74 : 1421-1425

Bucher, N. L. R., Overath, P. and Lynen, F.1960. β-hydroxy-β-methylglutaryl coenzyme A reductase cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. Biochim. Biophys. Acta. 40 (3) : 491

Casals, N., Roca, N., Guerrero, M., GIL - Gomez, G., Jase' Ayte, J., Ciudad, C. J. and Hegardt F. G. 1992. Regulation of the expression of the mitochondrial hydroxy-3- methylglutaryl - CoA synthase gene. Biochemical. J. 283 : 261 - 264

Clinkenbeard, K.D., Reed, W.D., Mooney, R.A. and Lane, M.D. 1975a Intracellular localization of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A cycle enzymes in liver. J. Biol. Chem. 250 : 3108-3116

Clinkenbeard, K, D., Sugiyama, T., Reed, W. D., and Lane, M.D.1975b. Cytoplasmic 3 - hydroxy -3- methylglutaryl - coenzyme A synthase from liver. J. Biol.Chem. 250 : 3124 - 3135

Clinkenbeard, K. D., Reed, W. D. and Lane, M. D. 1975c. Molecular and catalytic properties of mitochondrial (ketogenic) 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase of liver. J. Biol. Chem. 250 : 3117 - 3123

Clinkenbeard, K, D., Sugiyama, T., Moss, J, Reed, W. D. and Lane, M.D. 1973. Molecular and catalytic properties of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase from avian liver. J. Biol. Chem. 248 : 2275 - 2284

Chin, D. J., Luskey, K. L., Anderson, R. G. W., Faust, J. R., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. 1982. Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin resistant chinese hamster cell with a 500 fold increase in 3 - hydroxy -3- methylglutaryl - coenzyme A reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79 : 1185

Chye, M. L., Tan, C. T., and Chua, N. H. 1992. Three genes encode 3-hydroxy 3- methylglutaryl coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis* : *hmg*1 and *hmg*3 are differentially expressed. Plant Molecular Biology. 19 : 473 - 484

Fish, W. W., Mann, X. G. and Tanford, C. 1969. The estimation of polypeptide chain molecular weight by gel filtration in 6 M guanidine hydrochloride. J. Biol.Chem. 224 : 4989 - 4994

Gil-Gomez, G., Ayte, J., and Hegardt, F.G. 1993. The rat mitochondrial 3- hydroxy -3- methylglutaryl - coenzyme A synthase gene contians elements that mediate its multi hormonal regulation and tissue-specificity. Eur. J. Biochem. 213 : 773-779

Gil, G., Goldstein, J. L., Slaughter, C. A. and Brown, M. S. 1986. Cytoplasmic 3 - hydroxy -3- methylglutaryl - coenzyme A synthase from the hamster. I. Isolation and sequencing of a full - length cDNA. J. Biol.Chem. 261 (8) : 3710 - 3716

Greenspan, M. D.,Yudkovitz, J. B., Lo, C. Y., Chen, J. S.,Alberts, A. W.,Hunt, V. M., Chang, M. N.,Yang, S. S.,Thompson, K. L. and Chiang, Y. C. 1987. Inhibition of 3 - hydroxy -3- methylglutaryl - coenzyme A synthase by L - 659, 699. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (21) : 7488 - 7492

Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. Nature. 343 (6257) : 425 - 430

Hepper, C. M. and Audley, B. G. 1969. The biosynthesis of rubber from β-hydroxy - β- methylglutaryl - coenzyme A in *Hevea brasiliensis* latex. J. Biochem. 144 : 379 - 386

Kattarcooley, D. A., Wang, H. H. L., Mende-mueller, L. M. and Miziorko, H. M. 1990. Avian liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl- CoA synthase-distinct genes encode the cholesterogenic and ketogenic isozymes. Arch. Biochem. Biophys. 283 : 523-529

Kornblatt, J. A. and Rudney, H. 1971. Two forms of acetoacetyl coenzyme A thiolase in yeast. I. Separation and properties. J. Biol. Chem. 246 : 4414-4423.

Kose, K., Dogan, P. and Ozesmi, C. 1993. The effect of contraceptive steroids on hepatic cholesterol metabolism in female rats. Biochem. Mol. Biol. Int. 30 (2) : 237 - 243

Kush, A., Goyvaents, E., Chye, M. L. and Chua, N. H. 1990. Laticifer specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 : 1787-1790.

Laemmli, U. K. and Favre, M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage 4 : I. DNA packaging events. J. Mol. Biol. 80 : 575 - 599

Leonard, S., Arbergast, D., Geyer, D., Jones, C. and Sinensky, M, 1986. Localization of the gene encoding 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase to human chromosome 5. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 (7) : 2187 - 2189

Li, A. C. Tanaka, R. D.,Callaway, K., Fogelman, A. M. and Edwards, P. A. 1988. Localization of 3 - hydroxy -3- methylglutaryl - coenzyme A reductase and 3 - hydroxy -3- methylglutaryl - coenzyme A synthase in the rat liver and intestine is affected by cholestyramine and mevinolin. J. Lipid Research. 29 : 781 - 796

Lowe, D. M. and Tubbs, P. K. 1985. Succinylation and inactivation of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase by succinyl - CoA and its possible relevance to the control of ketogenesis. J. Biochem. 15 ; 232 (1) : 37 - 42

Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265 - 275

Lynen, F. 1969. Biochemical problems of rubber synthesis. J. Rubb. Res. Inst. Malaya. 21 (4) : 389 - 406

Martinez-Gonzalez, J., Buesa, C., Piulachs, M. D., Belles, X. and Hegardt, F. G. 1993. 3 - Hydroxy-3-methylglutaryl - coenzyme A synthase from the cockroach *Blattella germanica* : cloning, expression, developmental pattern and tissue expression. Eur. J. Biochem. 217 : 691 - 699

Mayer, R. J., Louis - Flamberg, P., Elliot, J. D., Fisher, M. and Leber, J. 1990. Inhibition of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase by antibiotic 1233 A and other β- lactones. Biochem. Biophys. Res. Comm. 169 : 610 -616

Meddleton, B. and Tubbs, P. K. 1975. 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase from bakers' yeast. Method Enzymol. 35 : 1731 - 1737

Mehrabian, M., Callaway, K. A., Clarke, C. E., Tanaka, R. D. Greenspan, M., Lusis, A. J., Sparkes, R. S., Mohandas, T., Edmond, J., Fogelman, A. M. and Edwards, P. E. 1986. Regulation of rat liver 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase and the chromosomal localization of the human gene J. Biol. Chem. 261 : 16249 - 16255

Miziorko, H. M. 1985. 3-hydroxy-3-methylglutaryl - coenzyme A synthase from chicken liver. Methods Enzymol. 110 : 19 - 26

Miziorko, H. M. and Behnke, C. E. 1985a. Active site directed inhibition of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase by 3 - chloropropionyl coenzyme A. Biochemistry. 24 : 3174 - 3179

_____. 1985b. Amino acid sequence of an active site peptide of avian liver mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase. J. Biol. Chem. 260 (25) : 13513 - 6

Miziorko, H. M. and Lane, M. D. 1977. 3 - Hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase J. Biol. Chem. 252 : 1414 -1420

Miziorko, H. M.,Kramer, P. R. and Kulkoski, J. A. 1982. S - (3 - Oxobutyl) coenzyme A ; Interactions with acetoacetyl coenzyme A utilizing enzymes. J. Biol. Chem. 257 : 2842 - 2847

Nagashima, H., Kumagai, H., Tomoda, H. and Omura, S. 1993. Inhibition on hepatic cholesterol biosynthesis by a 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase inhibitor, 1233A, in mice. Life Sci. 52 (19) : 1595 - 1600

Omura, S., Tomoda, H., Kumagai, H.,Greenspan, M. D., Yodkovitz, J. B., Chen, J. S., Alberts, S., Martin, I., Mochales, S. and Monaghan, R. L. 1978. Potent inhibitory effect of antibiotic 1233A on cholesterol biosynthesis which specifically blocks 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase. J. Antibiot. (Tokyo)] 40 (9) : 1356 - 1357

Quant, P. A. Tubbs. P. K. and Brand, M. D. 1989. Treatment of rats with glucagon or mannoheptulose increases mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl - coenzyme A synthase activity and decreases succinyl - CoA content in liver. J. Biochem. 262(1) : 159 -164

Rosser, D. S. E., Ashby, M. N., Ellis, J. L. and Edwards, P. A. 1989. Coordinate regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and prenyltransferase synthesis but not degradation in Hep G2 cells. J. Biol. Chem. 264 : 12653

Royo, T., Pedragosa, M. J., Ayte, J., Gil,.G. G. Vilara, S. and Hegardt, F. G. 1993. Testis and ovary express the gene for the ketogenic mitochondrial 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase. J. Lipid Res. 34 (6) : 867 - 874

Salam, W. H., Cagen, L. M. and Heimberg, M. 1988. Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis by fatty acids : effect of feeding olive oil on cytoplasmic acetoacetyl coenzyme A thiolase, beta - hydroxy - beta - methylglutaryl - CoA synthase and acetoacetyl - coenzyme A ligase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 (1) : 422 - 427

Schnitzer, P. R., and Sinensky, M. 1987. Characterization of HMG-CoA synthase activity of rat liver and CHO - Kl cells. J. Cell Biochem. 35 (2) : 93 - 103

Servous, M. and Karst, F. 1986. Regulation of early enzymes of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Biochem. J. 240 : 541 - 547

Shah, S. N. 1982. Cytosolic 3-hydroxy-3 -methylglutaryl - coenzyme A synthase E.C. - 4.1.3.5 in rat brain properties and developmental change. Neurochem. Res. 7 : 1359 - 1366

Sipat, A. B. 1982. Hydroxymethylglutaryl - CoA reductase (NADPH) in the latex of *Hevea brasiliensis* Phytochemistry. 21 : 2613 - 2618

Smith, J. R., Osborne, T. F., Slaughter, C. A., Brown, M. S., Goldstein, J. and Gil, G. L. 1988. Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase. J. Biol. Chem. 263 : 18480 - 18487

Stewart, P. R. and Rudney, H. 1966. The biosynthesis of 3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A in yeast. J. Biol. Chem. 241 : 1212 - 1221

Suvachittanont, W., Promsuwansiri, C. and Trankanont, K.1986. Levels of thiol compounds in leaves of *Hevea brasiliensis*.Proceedings of Australian Biochemical Society P90

Suvachittanont, W., and Wititsuwannakul, R. 1995. 3- hydroxy - 3 - methylglutaryl - coenzyme A synthase in *Hevea brasiliensis*. Phytochemistry. 40 : 757 - 761

Thumelin, S. Forestier, M., Girard, J. and Pegorier, J. P. 1993. Developmental changes in mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl - coenzyme A synthase gene expression in rat liver intestine and kidney. J. Biochem. 292 (Pt2) : 493 - 496

Tomoda, H., Kumagai, H., Tanaka, H. and Omura, S. 1987. F-244 specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl - coenzyme A synthase. Biochim. Biophys. Acta. 922 (3) 351 - 356

Vander Heijden, R., Verpoorte, R. and Duine, J. A. 1994. Biosynthesis of 3 - hydroxy-3-methylglutaryl - coenzyme A in Catharanthus roseus : acetoacetyl - CoA thiolase and HMG - CoA synthase show similar chromatographic behaviour. Plant Physiol. Biochem. 32 (6) : 807 - 812

Weber, T. and Bach, T. J. 1993. Partial purification and characterization of membrane associated 3-hydroxy-3-methylglutaryl - coenzyme A lyase from radish seeding. J. Naturforsch. 48C : 444 - 450

_____,1994. Conversion of acetyl coenzyme A into 3-hydroxy-3- methylglutaryl - coenzyme A in radish seeding. Evidence of a single monomeric protein catalyzing a Fe^{2+} / quinone - stimulated double condensation reaction. Biochim. Biophys. Acta. 1211 : 85 - 96

Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4412

Whitaker, J. R. 1950. Determination of molecular weight of protein by gel filtration on sephadex. Anal. Chem. 35 : 1950-1953.

Wititsuwannakul, R. 1986. Diurnal variation of HMG - CoA reductase in latex of *Hevea brasiliensis*. Experientia. 42 : 45 - 46

Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Sotthibandhu, R., Suvachittanont, W. and Sukonrat, W. 1988. Correlation studies on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and dry rubber yield in *Hevea brasiliensis*. Proceedings of the IRRDB Rubber Physiology and Exploitation Meeting, Paris, France. 161

Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., and Suwanmanee, P.1990. 3 - hydroxy -3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from the latex of *Hevea brasiliensis*. Phytochemistry. 29 : 1401 - 1403

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสุรีย์ พีรภูติ

วัน เดือน ปีเกิด 24 ธันวาคม 2499

วุฒิทางการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทั่วไป สาขา คณิตศาสตร์ - เคมี)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2523