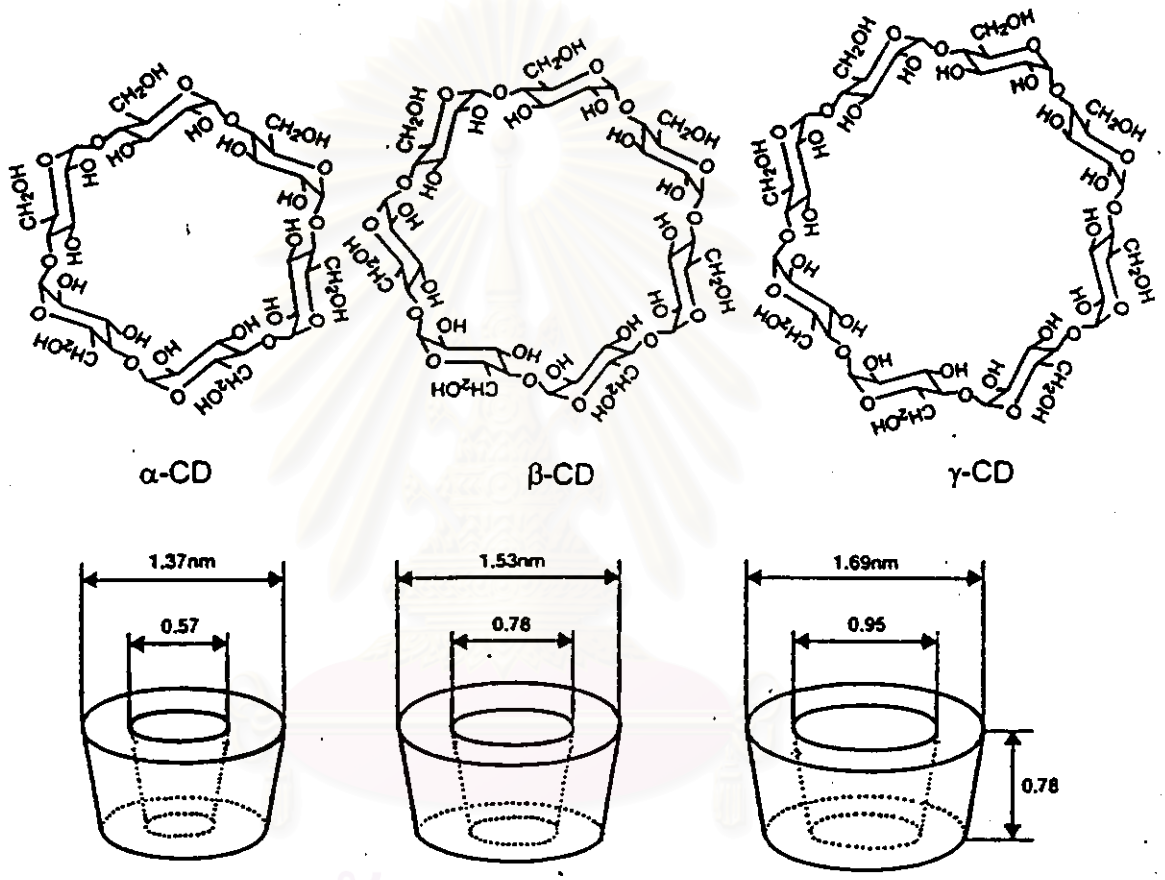
บทที่ 1

บทนำ

ไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrin, CD) เป็นสารประกอบประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนปิด ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic (French, 1957) ไซโคลเดกซ์ทรินส่วนใหญ่ที่เกิดในธรรมชาติมี 3 ชนิดได้แก่ แอลฟา (α)-, เบตา (β)- และ แกมมา (γ)- CD (ตารางที่ 1) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 6, 7 และ 8 หน่วยตามลำดับ (รูปที่ 1) จากรูปจะเห็นว่าโครงสร้างของไซโคล เดกซ์ทริน มีลักษณะเป็นวงแหวนและมีโพรงตรงกลาง รูปร่างคล้ายกับกรวยตัด โดยที่ภายนอกโพรงของโมเลกุลมีลักษณะไฮโดรฟิลิค ทำให้ไซโคลเดกซ์ทรินสามารถละลายในน้ำ หรือสารละลายโพลาร์ได้ ขณะที่โพรงด้านในของโมเลกุลมีลักษณะไฮโดรโฟบิค ทำให้สามารถจับกับสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์บางชนิด ที่มีขนาดเหมาะสมกับขนาดโพรงของไซโคล เดกซ์ทรินได้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (inclusion complex) (รูปที่ 2) มีผลทำให้คุณสมบัติทางเคมีหรือทางกายภาพของสารที่ถูกจับเปลี่ยนแปลงไป จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีการนำไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ประโยชน์ในการรักษาสารที่ต้องการ ได้แก่สารที่มีกลิ่น สี หรือรส ลดการระเหย เพิ่มความเสถียร เพิ่มความสามารถในการละลายของสาร ขจัดสารที่ไม่ต้องการออกจากระบบ ดังนั้นจึงสามารถนำไซโคลเดกซ์ทริน ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ หลายประเภทเช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ยา การเกษตร เป็นต้น (Szejtli, 1989 ; Fromming, 1981; Schmid, 1989 ;Hashimoto, 1988) นอกจากการนำไซโคลเดกซ์ทรินทั้งสามชนิดมาใช้ประโยชน์หลายด้านแล้ว ปัจจุบันมีการสังเคราะห์และนำอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทริน เช่น methylated CD , hydroxypropyl CD และ maltosyl CD (รูปที่ 3) มาใช้

ตารางที่ 1 คุณสมบัติบางประการของไซโคลเดกซ์ทริน (Szejtli, 1988)

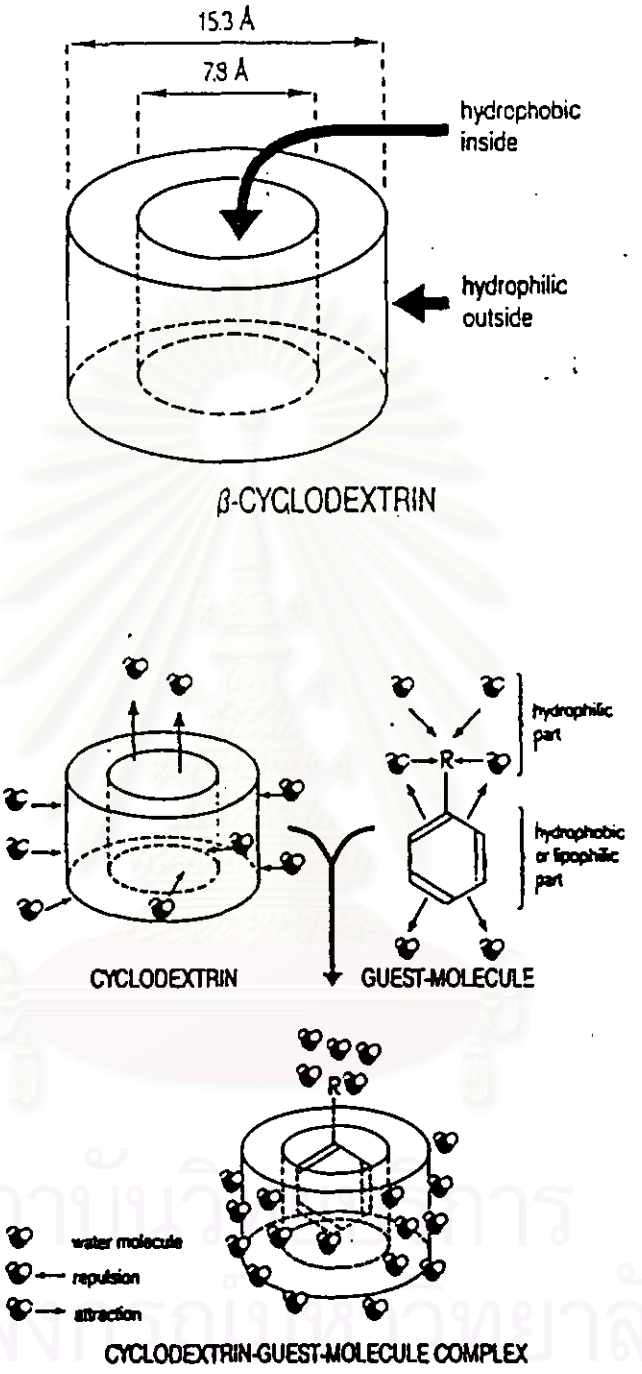
	α-CD	β-CD	γ-CD
Number of glucose unit	6	7	8
Molecular weight	972	1,135	1,297
Cavity dimensions			
Cavity diameters (A°)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Cavity depth (A°)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Cavity volume $(A°)^3$	174	262	472
Solubility in water (g/100 ml at 25 °C)	14.40	1.85	23.20
Crystal form (from water)	hexagonal plates	monoclinic parallelograms	quadratic prisms



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

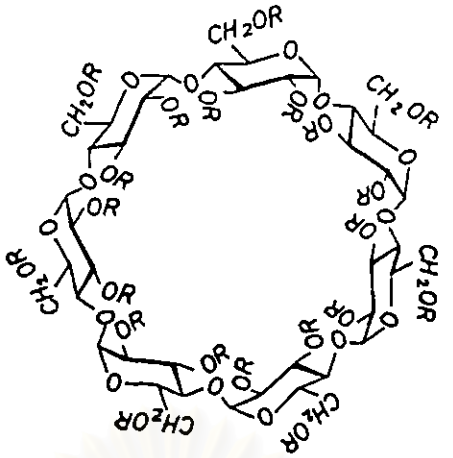
รูปที่ 1 โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α- , β- และ γ- CD ตามลำดับ

(Szejtli, 1988)

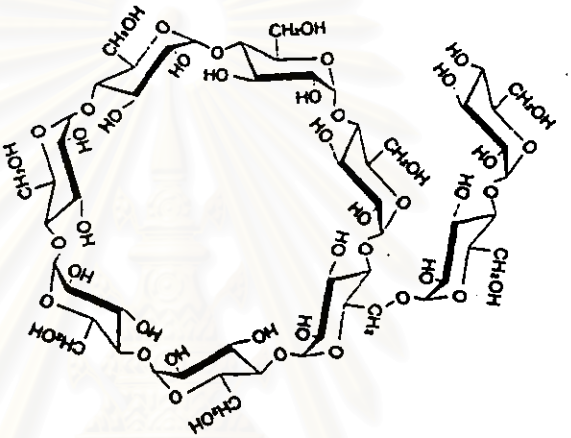


<u>รูปที่ 2</u> แสดงการเกิด inclusion complex ของไซโคลเดกซ์ทริน กับสารอื่น (Janssen, 1992)

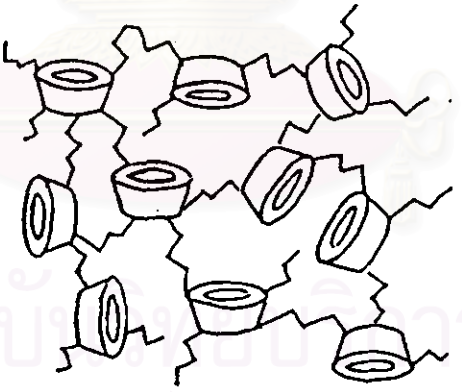
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



A.



B.



C.

รูปที่ 3 อนุพันธ์ชนิดต่าง ๆของไซโคลเดกซ์ทริน (Wacker, 1994: Ensuiko, 1994)

A. substituted CD (R = functional group)

B. branched CD

C. CD-polymer

ประโยชน์ โดยอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินเหล่านี้ สามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิด (Hashimoto,1988) ผลิตภัณฑ์สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ได้มาจากการนำโมเลกุลไซโคลเดกซ์ทรินมาเชื่อมต่อกันได้เป็น CD polymer พบว่ามีรายงานการนำไปใช้สร้าง inclusion complex กับสารบางชนิดเช่น limonin , naringin ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดรสขมในน้ำผลไม้ เพื่อประโยชน์ในการลดปริมาณสาร (Wagner และคณะ ,1988) และมีรายงานการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อแยก เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase) ให้บริสุทธิ์โดยหลักการของโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ (affinity chromatography) (Laszlo และคณะ, 1981; Villette และคณะ, 1991; Abelyan และคณะ, 1994)

เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (cyclodextrin glycosyl-transferase , CGTase , E.C. 2.4.1.19) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งหรือโอลิโกแซคคาไรด์ แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสายพันธุ์บาซิลลัสเช่น *B.macerans* (Depinto และ Campbell, 1973 ; Lane และ Pirt, 1973), *B.circulans* (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987), *B.megaterium* (Kitahata และ Okada, 1974), Alkalophilic *Bacillus* sp. (Nakamura และ Horikoshi, 1976) นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้เช่น *Klebsiella pneumoniae* (Bender, 1977), *Micrococcus sp.* (Yagi, 1980), *Thermoanaerobacter sp.* ATCC 53627 (Starnes, 1990) เอนไซม์ CGTase ที่แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตขึ้น ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่เซลล์ขับออกสู่ภายนอก (extracellular enzyme) นอกจากนี้เอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันจะมีคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพแตกต่างกันเช่น น้ำหนักโมเลกุล pH อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา ความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิเป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

Organism	Predominant product	Optimum pH (activity)	Optimum temp. (°C)	Molecular weight (dalton)	pI	Reference
Klebsiella pneumoniae M 5 al	α-CD	6.0-7.2	ND	68,000	4.8	Bender, 1982
Alkalophilic *Bacillus* 38-2	β-CD	1) 4.6 2) 7.0 3) 9.5	45-50	88,000	5.3	Nakamura and Horikoshi, 1976
Alkalophilic *Bacillus* 17-1	β-CD	6.0	ND	74,000	ND	Yamamoto *et al.*, 1972
Bacillus macerans IFO 3490	α-CD	5.0-5.7	55	65,000	4.6	Kitahara *et al.*, 1974
Bacillus megaterium	β-CD	5.0-5.7	55	ND	6.07	Kitahara and Okada,1974
Bacillus stearothermophilus	α-CD	6.0	ND	68,000	4.5	Kitahara and Okada,1982
Bacillus macerans ATCC 8514	α-CD	6.2	ND	139,000	ND	Depinto and Campbell, 1968
Micrococcus sp.	β-CD	5.8	55-65	88,000	4.2	Yaki *et al.*, 1980
B. fermus/lentus 290-3	γ-CD	6.8	50	75,000	4.1	Englbrecht *et al.*, 1990

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาโครงสร้าง และกลไกการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ CGTase มีกลไกการทำงาน 3 แบบ ได้แก่ cyclization, coupling และ disproportionation (Bender, 1986) โดยปฏิกิริยาทั้ง 3 สามารถแสดงได้ดังนี้

$$(Glc)_n \underset{\text{coupling}}{\overset{\text{cyclization}}{\rightleftharpoons}} (Glc)_{n-x} + c(Glc)_x$$

$$(Glc)_m + (Glc)_p \xrightarrow{\text{disproportionation}} (Glc)_{m-y} + (Glc)_{p+y}$$

เมื่อ $(Glc)_m$, $(Glc)_n$, $(Glc)_p$ คือ 1,4-α-D-Glucopyranosyl chains ที่มี "n","m","p" D-Glucopyranosyl residues

x, y คือ ส่วนของ 1,4-α-D-Glucopyranosyl chain

$c(Glc)_x$ คือ cyclodextrins

ปฏิกิริยา cyclization เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้ง หรือโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีปลายเปิด สำหรับ coupling เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของ cyclization เป็นการสลายไซโคลเดกซ์ทริน เมื่อมีโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ มารับไซโคลเดกซ์ทรินที่ถูกสลายนั้น และเกิดเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ปลายเปิดที่มีความยาวมากขึ้น ส่วน disproportionation เป็นปฏิกิริยาการย้ายหมู่ glycosyl ระหว่างโอลิโกหรือโพลีแซคคาไรด์ ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase เพื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ปฏิกิริยาทั้งสามชนิดจะเกิดควบคู่กันไป

จากการที่ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมหลายประเภท ปริมาณการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินเพิ่มขึ้นมาก แต่อย่างไรก็ตามราคาของไซโคลเดกซ์ทรินโดยทั่วไปยังค่อนข้างสูง เนื่องจากต้นทุนในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินมี

มูลค่าสูง ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้มีการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่นมีการพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ในถังหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ให้ได้ในปริมาณสูง (อุไรวรรณ รัชธร , 2536) การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิได้สูง (Starnes, 1990) ตลอดจนการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ CGTase เช่น Lee และ Tao (1994) ได้โคลนยีนของเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus macerans* เข้าสู่ *E.coli* โดยใช้พลาสมิด pET-21(+) เป็นพาหะ ทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ CGTase เพิ่มขึ้นจากเดิม 115 เท่า นอกจากนี้ความเข้าใจเกี่ยวกับโครงสร้างระดับโมเลกุลและกลไกการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์สามารถนำไปสู่การปรับปรุงเอนไซม์ ด้วยเทคนิคโปรตีนวิศวกรรมได้อีกทางหนึ่ง (Bender, 1990)

ในการศึกษาชีวเคมีของชีวโมเลกุล จำเป็นต้องแยกชีวโมเลกุลนั้นออกมาศึกษา วิธีทั่ว ๆไปที่ใช้แยกชีวโมเลกุลให้บริสุทธิ์นั้นมีหลายวิธี เช่น การตกตะกอนชีวโมเลกุลออกจากสารละลาย โดยการเปลี่ยนประจุของชีวโมเลกุลด้วยการปรับ pH หรือการทำลายพันธะไฮโดรเจนกับน้ำ สารที่ใช้เช่นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แอลกอฮอล์ อะซีโตน เป็นต้น การแยกสารโดยวิธีอิเลคโทรโฟรีซิสหรือโครมาโทกราฟี ซึ่งอาศัยความแตกต่างของประจุของชีวโมเลกุล เช่น electrofocusing , ion-exchange chromatography เป็นต้น (ตารางที่ 3) ในการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ มีผู้รายงานการศึกษาไว้หลายวิธี ในปี 1976 Nakamura และ Horikoshi เตรียมเอนไซม์ CGTase จาก Alkalophilic *Bacillus* sp. โดยใช้วิธีตกตะกอนด้วยอะซีโตน การดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้ง การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และ Sephadex G-100 gel filtration ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 74 เท่า และมีค่า enzyme yield 35 เปอร์เซนต์ ต่อมา Kobayashi และคณะ (1978) ได้ทดลองเตรียมเอนไซม์ CGTase จาก *B.macerans* โดยใช้วิธีการ

ตารางที่ 3 วิธีทั่วไปที่ใช้ในการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Chase, 1983)

Method	Degree of resolution of protein	Ease of scale-up
1. Ultrafiltration	low	easy
2. Precipitation	low/medium	easy
3. Molecular exclusion	medium	medium
4. Electro-methods		
(a) Electrophoresis		
(b) Electrofocusing	medium/high	difficult
(c) Electachophoresis		
5. Adsorption methods		
(a) Adsorption chromatography	medium	medium
(b) Ion-exchange chromatography	medium	medium
(c) Affinity chromatography	high	medium

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้ง การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และการตกผลึก (crystallization) เอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 35 เท่า และมีค่า enzyme yield 50 เปอร์เซนต์ ในปี 1982 Kitahata และ Okada เตรียมเอนไซม์ CGTase จาก *B.stearothermophilus* TC-60 โดยใช้วิธีการดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้ง การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และ Biogel P-150 gel filtration ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ที่เตรียมได้ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 18 เท่า และมีค่า enzyme yield 27 เปอร์เซนต์ นอกจากนั้นในปี 1986 Nomoto และคณะ ได้ทดลองเตรียมเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus sp.* HA3-3-2 โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต Sephadex G-100 gel filtration และการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 83 เท่า และมีค่า enzyme yield 7 เปอร์เซนต์ วิธีต่างๆ ที่กล่าวถึงนี้ใช้เวลาค่อนข้างนาน ต้องผ่านหลายขั้นตอน ทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์ต่ำ จึงมีผู้พัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ เพื่อใช้ในการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ ซึ่งวิธีนี้ช่วยลดระยะเวลาลงได้มาก มีประสิทธิภาพสูง และอาจใช้เพียงขั้นตอนเดียว การทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพ เป็นการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นลิแกนด์ตรึงเข้ากับตัวค้ำเช่นใช้ α-CD ตรึงเข้ากับ Sepharose 6B เพื่อใช้แยกเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *B.macerans* เอนไซม์ CGTase ที่ผ่านกระบวนการนี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 113 เท่าและมีค่า enzyme yield 90-92 % (Laszlo, 1981) นอกจากนี้ยังมีการใช้ β-CD copolymer เพื่อแยกเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *B.circulans* ซึ่งทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 40 เท่าและมีค่า enzyme yield 70 % (Villette, 1991)

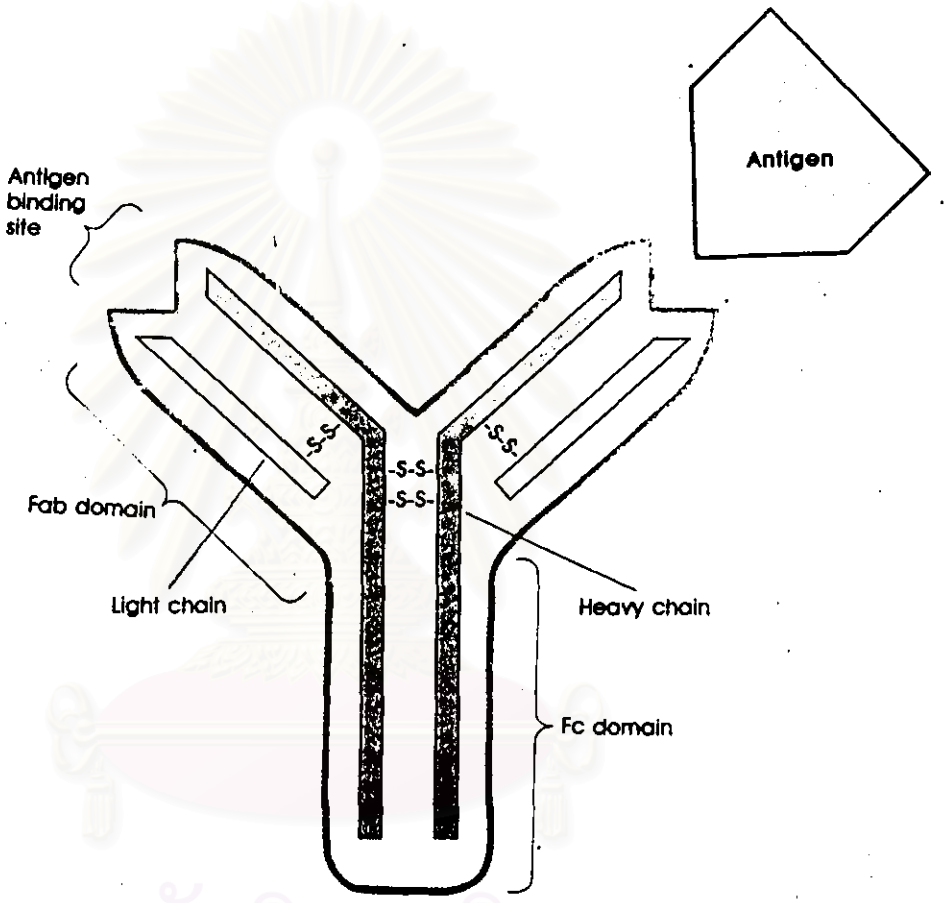
เอนไซม์ CGTase ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus sp.*A11 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987) กลุ่มวิจัยที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รายงานการศึกษาเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus sp.* A11 อย่างต่อเนื่อง โดยวัลยา เตชชัยกุล (2534) ได้ศึกษา ตรวจ และคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียจากตัวอย่างดิน พบว่า *Bacillus sp.* A11 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ในปริมาณสูง อุไรวรรณ รัชชร (2536) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมากในถังหมัก รวมทั้งศึกษาการตรึงเอนไซม์บน DEAE - cellulose และการตรึงเอนไซม์บนตัวค้ำอนินทรีย์ (วรรณรัตน์ คุตติอาชีวะ , 2537) นอกจากนี้ จิราพร โรจน์ทินกร ,(2537) ศึกษาการเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase เพื่อประโยชน์ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี โครงสร้าง ของเอนไซม์ CGTase ต่อไป จากรายงานการศึกษาเอนไซม์ CGTase ในการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ต้องผ่านหลายขั้นตอนเช่น ต้องผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ที่ใช้หลักการแยกแตกต่างกันอย่างน้อย 2 คอลัมน์ ได้แก่ ion exchange chromatography , gel filtration หรือ chromatofocusing (วัลยา เตชชัยกุล, 2534 ; จิราพร โรจน์ทินกร, 2537) ทำให้ได้ yield ต่ำและใช้เวลานาน งานวิจัยนี้จึงศึกษาการเตรียมเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูนโดยการใช้แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase เป็นลิแกนด์ ซึ่งยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อน

แอนติบอดี (antibody) เป็นโมเลกุลที่เป็นพื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สำหรับกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย สิ่งแปลกปลอมเหล่านี้อาจจะเป็นเชื้อโรค แบคทีเรีย ไวรัส หรือสารพิษบางชนิด แอนติบอดีเป็นไกลโคโปรตีนที่มีรูปร่างคล้ายตัวอักษร Y มีแขนสองข้างที่สามารถจับกับแอนติเจน (antigen) แอนติเจนอาจเป็นสารโมเลกุลเล็ก ๆ หรือสารโมเลกุลใหญ่ หรือชิ้นส่วนของสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย บริเวณของแอนติเจนที่จับกับแอนติบอดีเรียกว่า อีพิโทพ (epitope) ส่วนบริเวณปลายแขนสองข้างของแอนติบอดีที่จับกับอีพิโทพ เรียกว่าบริเวณจับกับแอนติเจน (antigen binding site) แอนติบอดีมีโครงสร้างพื้น

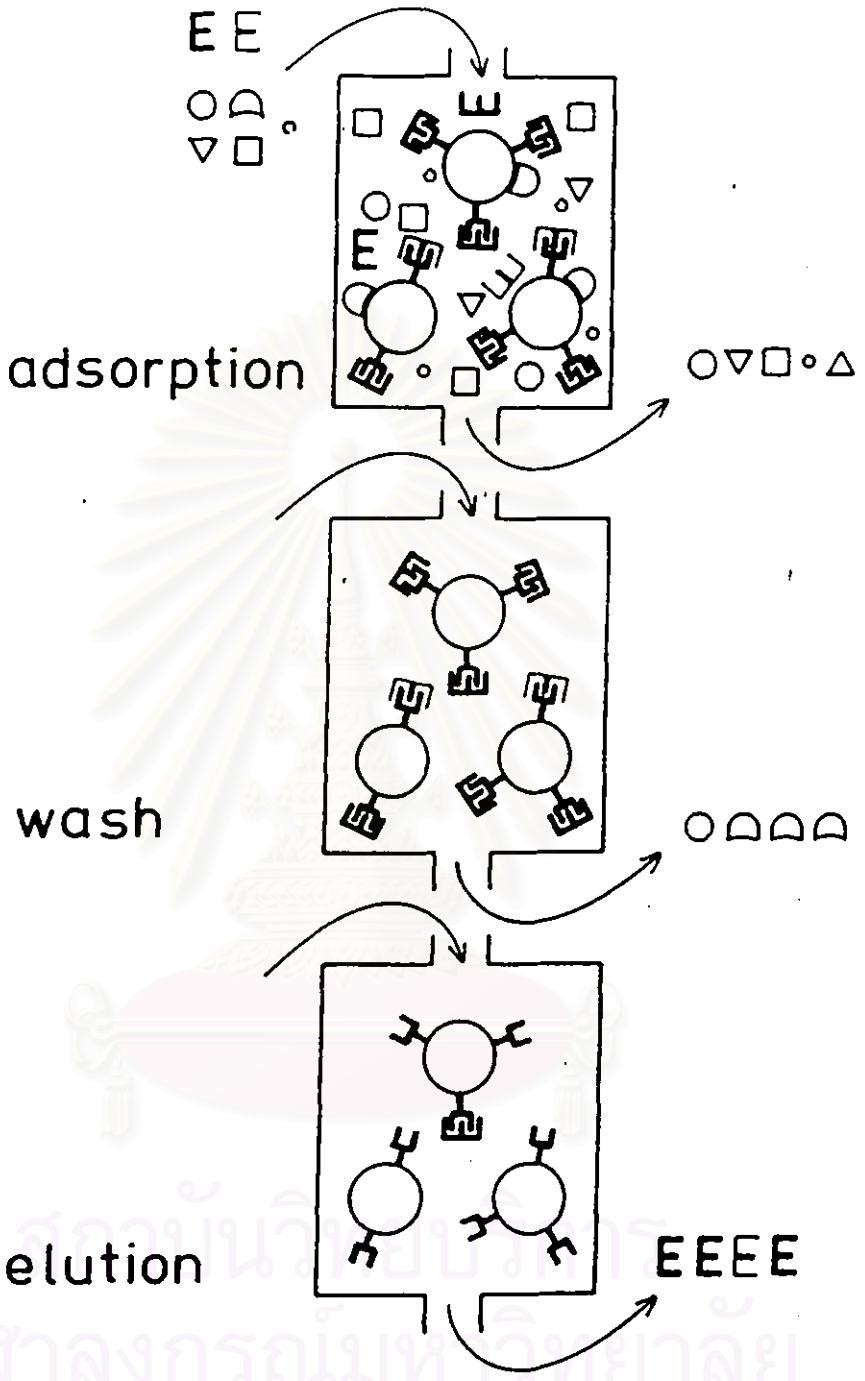
ฐานเป็นอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) โครงสร้างนี้ประกอบด้วย สายโปรตีนสองชนิด ได้แก่สาย light chain ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 220 ตัว และสาย heavy chain ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 440 ตัว หน่วยพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลินประกอบด้วย สาย light chain สองสายและสาย heavy chain สองสาย ทำให้เกิดโครงสร้างรูปอักษร Y (รูปที่ 4) โครงสร้างนี้ถูกยึดไว้ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสาย (inter-chain disulfide bond) แต่ละสายก็ยังมีพันธะไดซัลไฟด์ภายในสาย (intra-chain disulfide bond) ช่วยยึดโครงสร้างของแต่ละสายไว้ด้วยกัน (Sell, 1987) ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จะเป็นรากฐานหลักของการป้องกันโรคโดยการฉีดวัคซีน (vaccination) การตรวจวิเคราะห์สารโดยวิธี radioimmuno assay (RIA) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ตลอดจนการแยกสารโดยวิธี immunoaffinity chromatography

โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน (immunoaffinity chromatography) (รูปที่ 5) เป็นเทคนิคที่ใช้คุณสมบัติทางชีวภาพที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี และเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง เพราะแอนติบอดีมีโครงรูปในสามมิติที่จำเพาะ จึงจับกับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ และเป็นการจับที่มีลักษณะทวนกลับได้ จึงทำให้สามารถแยกแอนติเจนได้โดยการนำแอนติบอดีมาต่อกับอนุภาคของเจลด้วยพันธะโคเวเลนท์ก่อน แล้วจึงบรรจุเจลเข้าท่อแก้วสำหรับโครมาโทกราฟี เมื่อนำสารละลายที่มีแอนติเจนที่ต้องการจะแยกใส่ลงในท่อแก้ว แอนติเจนซึ่งมีความจำเพาะกับแอนติบอดีนั้นจะค้างในท่อแก้ว ส่วนโปรตีนอื่นๆ จะถูกชะออกมาเพราะไม่สามารถจับแอนติบอดี เมื่อล้างโปรตีนอื่นออกหมดแล้ว จึงชะแอนติเจนที่ต้องการด้วยสารละลายที่มีสารจำเพาะ เช่นสับสเตรทของเอนไซม์ หรือใช้สารที่สามารถลดหรือทำลายพันธะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี (Chase, 1983) ในการทำโครมาโทกราฟี แบบสัมพรรคภาพอิมมูโน จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ (Harlow และ Lane , 1988)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 โครงสร้างของแอนติบอดี (Harlow และ Lane, 1988)



รูปที่ 5 หลักการโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน (Ehle และ Hom, 1990)

E: active enzyme, E: inactive enzyme, Y: matrix bound antibody, ○ □ △ ∘ : nonadhering impurities, ○ : adsorbed impurities.

1 การตรึงแอนติบอดีกับตัวค้ำ เป็นการนำแอนติบอดีที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาตรึงเข้ากับอนุภาคเจลที่ถูกกระตุ้นเพื่อให้เหมาะสมกับการจับกับแอนติบอดี เช่น CNBr-activated Sepharose (Pharmacia) , Affigel 10 (BioRad) , Reacti-Gel 6X (Pierce) เป็นต้น

2 การจับของแอนติเจนกับแอนติบอดีคอลัมน์ เป็นสภาวะที่เอื้อให้แอนติเจนจับกับแอนติบอดีได้ดีที่สุด ปัจจัยสำคัญที่ควรคำนึงถึงเช่น ระยะเวลาที่แอนติเจนจะสัมผัสกับแอนติบอดีในคอลัมน์ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้

3 การชะแอนติเจนออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ ในการชะแอนติเจนให้ออกจากแอนติบอดีสามารถทำได้โดย ใช้สารชะที่มีสารจำเพาะเช่น สับสเตรทหรือตัวยับยั้ง (inhibitor) ของเอนไซม์ ซึ่งจะไปทำการแย่งจับกับแอนติบอดีในคอลัมน์ หรือใช้สารละลายที่มีสารที่สามารถทำลาย ลด หรือทำให้พันธะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีอ่อนลง เช่น แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ยูเรีย ไดออกเซน โซเดียมไธโอไซยาเนต เป็นต้น สารเหล่านี้จะมีผลทำให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงโครงรูป ลดแรงไฮโดรโฟบิค แรงแวนเดอร์วาลส์ หรือทำให้ประจุของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป มีผลทำให้แอนติเจนสามารถคลายตัวจากแอนติบอดีได้

งานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาระบบโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน และนำมาใช้ในการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์เพื่อเป็นการลดขั้นตอนและเพิ่ม yield ในการเตรียมเอนไซม์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยสามารถระบุได้ดังนี้

1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase จากแอนติซีรั่ม

2 ศึกษาการตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase เข้ากับตัวค้ำที่เลือกได้

3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนเพื่อแยกเอนไซม์ CGTase บนแอนติบอดีคอลัมน์