การทำเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน

นายพรชัย แซ่กิม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-634-945-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17432522

PURIFICATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE BY IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY

Mr. Pornchai Kim

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-634-945-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน
โดย	นายพรชัย แซ่กิม
สาขาวิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ดร. สมพร กมลศิริพิชัยพร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. สมพร กมลศิริพิชัยพร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

พรชัย แซ่กิม : การทำเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน (PURIFICATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE BY IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์, ดร. สมพร กมลศิริพิชัยพร, 106 หน้า. ISBN 974-634-945-7

ในการศึกษาการทำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจากซีรั่มกระต่ายให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 45 % และทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose พบว่าที่ pH 6.5 แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ไม่ยึดติดกับ DEAE-cellulose resin แอนติบอดีที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์จากการตรวจสอบโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส และมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ CGTase โดยมีค่าไดเตอร์เท่ากับ $1:2^{8}$ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Ouchterlony immunodiffusion

ได้ทดลองตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase เข้ากับตัวค้ำ CNBr-activated Sepharose 4 B เพื่อเตรียมแอนติบอดีคอลัมน์เพื่อใช้แยกเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ พบว่าตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำได้ 98 % คิดเป็นปริมาณแอนติบอดี 4.9 มิลลิกรัมต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตร สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์คือ การใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 mM , pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 M เป็นสารชะ ด้วยอัตราการชะ 0.1 มิลลิลิตรต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 155 เท่า และ enzyme yield 45 % เมื่อทำการแยกเอนไซม์ CGTase โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ พบแถบโปรตีน 2 แถบ แต่จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอสจะเห็นแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72,000 ดาลตัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C626795 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE/*Bacillus sp.* A11 /IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY
PORNCHAI KIM : PURIFICATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE BY IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY . THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI , Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. TIPAPORN LIMPASENI, Ph.D., SOMPORN KAMOLSIRIPICHAIPORN, Ph.D., 106 PP. ISBN 974-634-945-7

A polyclonal antibody prepared against cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) was purified from rabbit antiserum by ammonium sulfate precipitation with a 45 % saturation and DEAE-cellulose ion exchange chromatography. Fractions were tested for the presence and purity of IgG by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The result demonstrated that antibody against CGTase of high purity was obtained by the described purification method and the antibody titer was determined to be $1:2^8$ by Ouchterlony immunodiffusion.

The purified antibody was linked to CNBr-activated Sepharose 4 B and used for immunoaffinity purification of CGTase. The bound enzyme was eluted with 3.5 M sodium thiocyanate in 50 mM ammonium hydroxide, pH 10.5, at a flow rate 0.1 millilitre/minute at room temperature. The specific activity of the purified CGTase was increased 155 folds and about 45 % of the total activity was recovered. The prepared enzyme was separated into two bands after non denaturing-polyacrylamide gel electrophoresis, but showed only a single band in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the protein band was estimated to be 72,000 dalton.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ดร. สมพร กมลศิริพิชัยพร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาแนะนำให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการดำเนินงานวิจัยด้วยดีตลอดมา ตลอดจนได้ให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความกรุณาและคำแนะนำสำหรับการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่น้อง เพื่อนนิสิตปริญญาโทเทคโนโลยีชีวภาพและชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยนี้

ท้ายสุดข้าพเจ้าขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่ได้ให้ทุนการศึกษาในการทำงานวิจัยนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตารางประกอบ ..... ฎ

สารบัญรูปประกอบ ..... ฎ

คำย่อ ..... ฑ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วิธีทดลอง 17

เครื่องมือ 17

เคมีภัณฑ์ 18

วัสดุชีวภาพ

1.แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 19

2. แอนติซีรั่ม 19

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Medium 1 19

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi 20

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายสำหรับหาแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase 20

2. สารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน 21

3. สารละลายสำหรับการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน 21

4. สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล
อิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ 22

5. สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์ เจล
อิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส 23

6. สารละลายสำหรับการตรึงแอนติบอดี 24

7. สารละลายสำหรับแอฟฟินิตีคอลัมน์ 25

การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเอนไซม์ CGTase

1. การเตรียมเชื้อตั้งต้น 26

2. การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase 27

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

1. Dextrinizing activity assay 27

2. Cyclodextrin - trichloroethylene assay 28

การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford 28

การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน 29

การแยกแอนติบอดีจากแอนติซีรั่ม

1. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 29

2. การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน
ด้วย DEAE-cellulose 31

การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

1. การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ 32

2. การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส 34

การหาความจำเพาะของแอนติบอดี..... 35

การตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำ..... 36

การทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน 37

3. ผลการทดลอง..... 39

การแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase จากแอนติซีรั่มของกระต่าย

1. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 39

2. การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

ด้วย DEAE-cellulose..... 41

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase

โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส 41

การหาปริมาณและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase 42

การตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำ..... 42

การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์

1. การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 51

2. การทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน 51

การขยายขนาดแอนติบอดีคอลัมน์ 59

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CGTase

โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส

1. การทำโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ 61

2. การทำโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส..... 66

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 68

เอกสารอ้างอิง..... 86

ภาคผนวก..... 93

ประวัติผู้เขียน..... 106

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. คุณสมบัติบางประการของไซโคลเดกซ์ทริน 2

2. คุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ 7

3. วิธีทั่วไปที่ใช้ในการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ 10

4. ผลการเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ 40

5. ผลการดึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase เข้ากับตัวค้ำ 46

6. สรุปผลการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ 52

7. ผลของสารต่าง ๆ ที่ใช้เป็นสารชะในแอนติบอดีคอลัมน์
ต่อ Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase 56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1. โครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทริน 3
2. แสดงการเกิด inclusion complex ของไซโคลเดกซ์ทริน 4
3. อนุพันธ์ชนิดต่าง ๆ ของไซโคลเดกซ์ทริน 5
4. โครงสร้างของแอนติบอดี 14
5. หลักการโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน 15
6. แผนภาพการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน 30
7. รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส 43
8. การทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน 44
9. การวัดประสิทธิภาพของการตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase กับตัวค้ำโดยการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ในสารละลายก่อนและหลังการตรึงกับตัวค้ำ 47
10. รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ก่อนและหลังการตรึงกับตัวค้ำแยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส 49
11. การทำอิมมูโนดิฟฟิวชันของสารละลายแอนติบอดี ก่อนและหลังการตรึงกับตัวค้ำ 50

12. การแยกเอนไซม์ CGTase ด้วยแอนดิบอดีคอลัมน์ขนาด 0.6 x 1.2
เซนติเมตร ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ pH 10.5
ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ 58
13. การแยกเอนไซม์ CGTase ด้วยแอนดิบอดีคอลัมน์ขนาด 0.8 x 4.5
เซนติเมตร ชะด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ pH 10.5
ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ 60
14. รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้เอนไซม์
CGTase บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส
แบบไม่เสียสภาพ 62
15. รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้เอนไซม์
CGTase บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิส
แบบไม่เสียสภาพ (7.5 เปอร์เซ็นต์เจล) 63
16. รูปแบบการย้อมสี Dextrinizing activity ของเอนไซม์ CGTase
ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์
เจล อิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ 64
17. รูปแบบการย้อมสี Dye staining for cyclodextrin ที่เกิดจาก
ปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์
แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ
(7.5 เปอร์เซ็นต์เจล) 65
18. รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ CGTase ในขั้นตอน
ต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล
อิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส 67

คำย่อ

°C = องศาเซลเซียส

CD = Cyclodextrin

CGTase = Cyclodextrin glycosyltransferase

ml = Millilitre

ug = Microgram

mg = Milligram

mM = Millimolar

M = Molar

w/v = weight by volume

v/v = volume by volume

TEMED = NNN′N′ - tetramethylethylenediamine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย