

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน

รายงานผลการวิจัย

ชื่อ "การศึกษาเปรียบเทียบการจับตัวของตะกั่วและทองแดงต่อเซอรูโลพลาสมิน"

โดย

สุกัญญา สุนทรท

ประจำปีงบประมาณ 2541

จท
วท 15
009878

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน

รายงานผลการวิจัย

ชื่อ "การศึกษาเปรียบเทียบการจับตัวของตะกั่วและทองแดงต่อเชอรูโลทลาสมิน"

โดย

สุกัญญา สุนทรส

20 กันยายน 2542



24 พ.ค. 2543

I18654184

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับสถานที่
สาธารณูปโภค และอุปกรณ์ที่ใช้ตลอดงานวิจัย และขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติที่อนุมัติเงินทุน
สนับสนุนงานวิจัยเรื่องนี้

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาเปรียบเทียบการจับตัวของตะกั่วและทองแดงต่อเชอร์โลพลาสมีน

ชื่อผู้วิจัย สุกัญญา สุนทรส

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ 15 พฤษภาคม 2542

เชอร์โลพลาสมีน คือโปรตีนในซีรัมที่ทำหน้าที่ขนส่งทองแดง โดยสามารถจับกับทองแดงได้ถึง 8 อะตอม / โมเลกุล เชอร์โลพลาสมีนยังสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงเรียกว่าออกซิเดสอีกด้วย การเร่งปฏิกิริยานี้ต้องใช้ทองแดงที่เกาะอยู่กับโมเลกุลด้วย ผลจากอะตอมมิกแอบซอร์พชัน สเปกโตรโฟโตเมตรีชี้ให้เห็นว่าตะกั่วสามารถจับกับเชอร์โลพลาสมีน ได้ โดยแทนที่ทองแดง โลหะทั้งสองจับกับเชอร์โลพลาสมีนได้สูงที่สุดที่ pH 6.0 และเมื่อเก็บไว้ที่ 4° ซ. รูปที่จับกับตะกั่วจะเสถียรอยู่ได้ 3 วัน จากนั้นปริมาณตะกั่วจะค่อยๆลดลง ในวันที่ 18 จะเหลือเพียงประมาณ 35 % อย่างไรก็ตามตะกั่วสามารถแทนที่ทองแดงได้เพียงบางส่วนเท่านั้น กล่าวคือมีตะกั่วอยู่ประมาณ 2 อะตอม / โมเลกุลของเชอร์โลพลาสมีนเท่านั้น นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณตะกั่วที่เพิ่มขึ้น ปริมาณทองแดงและออกซิเดสแอ็คติวิตีที่ลดลงขึ้นกับความเข้มข้นของตะกั่ว และมีความสัมพันธ์กันชัดเจน

การศึกษานี้ยังใช้สารจับโลหะ (metal chelators) 3 ชนิด ได้แก่ 2,3 Dimercapto-1-propane sulfonic acid (DMPS), Ethylenediamine tetrasodium salt (Na₄EDTA), และ Penicillamine ดึงทองแดงออกจากเชอร์โลพลาสมีนด้วย พบว่า DMPS เป็นตัวจับโลหะที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการดึงทองแดงออกจากเชอร์โลพลาสมีน ตัวดึงทองแดงทั้งสามสามารถลดออกซิเดส แอ็คติวิตีได้มากกว่าตะกั่ว การทดลองนี้ยังวิเคราะห์เชอร์โลพลาสมีนด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงในพอลิครีลาไมด์เจล (isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis) ที่ pH 4-6 พบว่าระบบนี้ไม่สามารถจำแนกเชอร์โลพลาสมีน ในรูปที่จับกับไม่จับกับทองแดงหรือตะกั่วได้ ผลดังกล่าวสามารถใช้ช่วยอธิบายการจับของโลหะทั้งสองต่อเชอร์โลพลาสมีนได้

Abstract

Project Title : Comparative Study of Pb and Cu Binding on Ceruloplasmin

Name of the Investigators : Suganya Soontaros

Year : 1999

Ceruloplasmin, the copper-transporting protein in human serum carried 8 atoms of copper (Cu) per molecule. The protein also possessed oxidase activity, of which its full function required the presence of coppers. The results from atomic absorption spectrophotometry demonstrated the lead (Pb) could also bind to this protein by replacing the former metal. The binding of both metal reached maximum at pH 6.0, the lead-bound complex was stable for about 3 days while stored at 4 °C, the amount decreased with time, only 35 % remained on day 18. However, copper could only partially replaced by lead Pb, atomic absorption spectrophotometry showed that only 2 atoms of lead were found on ceruloplasmin molecule. Moreover, lead binding, copper release and decrease of oxidase activity were concentration dependent and corresponded very well with each other.

Three metal chelators, namely 2,3 Dimercapto-1-propane sulfonic acid (DMPS), Ethylenediamine tetrasodium salt (Na₄EDTA) and Penicillamine, were used to chelate copper from ceruloplasmin, DMPS was the most effective agent. The decreases in oxidase activity was more pronounced with metal chelators than with lead. In isoelectric focusing gel polyacrylamide electrophoresis of pH 4-6, copper or lead could not shift ceruloplasmin band. The discussion of metal binding sites in ceruloplasmin was included.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วิธีทำการวิจัย	3
ผลการวิจัย	
1) สภาวะที่เหมาะสมในการจับตัวของตะกั่วบน ceruloplasmin	6
2) สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บ ceruloplasmin ที่จับอยู่กับตะกั่ว	7
3) ความสัมพันธ์ระหว่างการจับของตะกั่ว ต่อ oxidase activity ของ ceruloplasmin	8
4) ผลของ metal chelators ต่อ oxidase และค่า pI ของเซอร์คูโลพลาสมีนเมื่อศึกษาใน ไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง	9
- ผลของ metal chelators ต่อ oxidase activity ของเซอร์คูโลพลาสมีน	9
- ผลของ metal chelators ต่อค่า pI ของเซอร์คูโลพลาสมีน	11
อภิปราย	13
สรุป	14
เอกสารอ้างอิง	15

เลขหมู่ จพ
๑๓ ๑๕
เลขทะเบียน ๐๐๙๘๗๘
วัน,เดือน,ปี ๒๑ ม.ค. ๕๓

รายการตารางประกอบ

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
1	Condition ในการใช้ atomic absorption spectrophotometry	4
2	สูตรการเตรียม isoelectric focusing gel pH 4-6	5

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	รายการ	หน้า
1	ผลของ pH ต่อการจับตัวของโลหะบนเซอรูโลพลาสมิน	6
2	ความเสถียรของสารเชิงซ้อนระหว่างเซอรูโลพลาสมินกับ ตะกั่ว	7
3	ความสัมพันธ์ของการจับตะกั่วต่อ oxidase activity ของ ceruloplasmin	9
4	ผลของ metal chelators ต่อ oxidase activity ของเซอรูโลพลาสมิน	10
5	ผลของตะกั่วและ DMPS ต่อค่า pI ของเซอรูโลพลาสมิน	12



บทนำ

ตะกั่วเป็นโลหะที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่นในอุตสาหกรรมแบตเตอรี่ เป็นส่วนผสมของน้ำมัน อุตสาหกรรมสี วัสดุเซรามิก ตลอดจนจนถึงยาฆ่าแมลง (Winship, K.A.1989) อย่างไรก็ดี หากใช้ไม่ถูกวิธี หรือควบคุมไม่ถูกต้อง ตะกั่วก็อาจเกิดพิษต่อร่างกายได้ ปัจจุบันสามารถพบตะกั่วได้ในสภาพแวดล้อมและในระบบชีวภาพทั่วไป (Goyer, R.A.1991) กระบวนการทางอุตสาหกรรมทำให้คนงานในโรงงานช่างต้นมีโอกาสที่จะสัมผัส และเสี่ยงต่อการเป็นโรคเนื่องจากพิษตะกั่วได้สูงกว่าคนทั่วไป

ในประเทศไทยมีรายงานว่าสารตะกั่ว เป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดของโรคภัยไข้เจ็บที่เกิดจากการปฏิบัติงานในโรงงานแบตเตอรี่ การจราจรที่แออัดเพิ่มอัตราการหายใจเอาตะกั่วเข้าสู่ร่างกาย ตะกั่วเข้าสู่ร่างกายได้ทางการเดินหายใจและทางอาหาร แล้วดูดซึมผ่านเข้าทางเดินอาหาร การดูดซึมนี้ส่นเด็กสูงกว่าผู้ใหญ่มาก ตะกั่วอินทรีย์ เช่น tetraethyl lead ยังดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้อีกด้วย (Winship, 1989) เมื่อเข้าสู่ร่างกาย ตะกั่วจะทำให้เกิดอาการของโรคพิษตะกั่วได้ 2 แบบ คือ แบบเฉียบพลัน (acute poisoning) มักเกิดเนื่องจากการกินสารละลายตะกั่วความเข้มข้นสูงโดยอุบัติเหตุ จะมีอาการรุนแรงจนถึงแก่ความตายได้ หากรักษาไม่ทัน และแบบเรื้อรัง (chronic poisoning) เกิดเนื่องจากการสะสมตะกั่วเข้าสู่ร่างกายทีละน้อย อาจโดยการหายใจ การกิน หรือดูดซึมทางผิวหนัง อาการที่พบบ่อย คือ อาการโลหิตจาง (anemia) ไตถูกทำลาย อาการทางระบบประสาทส่วนกลางถูกรบกวนจนถึงถูกทำลาย (Winship, 1989).

ในทางชีวเคมี ได้มีผู้ศึกษาผลของตะกั่วต่อระบบโลหิต พบว่าตะกั่วสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ฮีโมโกลบิน โดยยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดในกระบวนการนี้ เช่น heme synthetase, delta aminolaevulinic acid dehydratase (δ -ALA) และ ferrochelatase เป็นต้น อันจะนำไปสู่ภาวะโลหิตจางในที่สุด (Goyer, 1991) สำหรับในระบบประสาทส่วนกลาง พบว่ามีการสะสมของตะกั่วสูงที่สุดใน gray matter ผู้ป่วยเกิดอาการ encephalopathy เสียการทรงตัวและสติสัมปชัญญะ รุนแรงจนถึงตายในที่สุด

จากข้อสังเกตที่ว่าตะกั่วสามารถออกฤทธิ์ได้ต่อหลายอวัยวะในร่างกาย ผู้วิจัยจึงตั้งสมมุติฐานว่า การขนส่งตะกั่วในกระแสโลหิตอาจเป็นกระบวนการสำคัญ ในการเกิดโรคพิษตะกั่วในอวัยวะต่างๆ ผลการวิจัยเดิมของคณะผู้วิจัยชุดนี้ได้ชี้ให้เห็นว่า มีโปรตีนในซีรัม อย่างน้อย 2 ชนิดที่สามารถจับตะกั่วได้ และตัวหนึ่งในนี้คือโปรตีนที่มีหน้าที่ขนส่งทองแดง ชื่อ เซอรูโลพลาสมิน (ceruloplasmin) (Mungkalee, et al, 1994) ยิ่งกว่านั้นยังพบว่าโมเลกุลของเซอรูโลพลาสมินที่นำมาจากซีรัมของคนไข้โรคพิษตะกั่วมีตะกั่วจับอยู่ด้วย (Mungkalee, 1994) ทำให้สรุปได้ว่า เมื่อตะกั่วเข้าสู่ร่างกาย เซอรูโลพลาสมินอาจทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งตะกั่วไปยังอวัยวะต่างๆ การทดลอง

ในเม็ดเลือดแดงให้เห็นว่าการขนส่งตะกั่วเข้าสู่เซลล์นั้นอาศัยเฮมูโกลบินด้วย (Mungkalee, 1994)

นอกจากการขนส่งโลหะแล้ว เฮมูโกลบินยังมี oxidase activity ซึ่งคาดว่าเป็น ferroxidase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน Fe(II) เป็น Fe(III) เพื่อส่งเข้ากระบวนการสังเคราะห์ฮีม (heme) ต่อไป อย่างไรก็ตามเฮมูโกลบินต้องใช้ทองแดงที่จับอยู่กับโมเลกุลของมันในการช่วยเร่งปฏิกิริยาดังกล่าว (Holmberg, 1951) จึงเป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อตะกั่วเข้าไปจับกับเฮมูโกลบินนั้น มันอาจแทนที่ทองแดง และมีบทบาทต่อ oxidase activity ของเฮมูโกลบิน การค้นพบอันนี้อาจเป็นสาเหตุอันหนึ่งของภาวะ anemia ในคนไข้โรคพิษตะกั่วอีกด้วย

โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการจับตัวของทองแดงและตะกั่วต่อเฮมูโกลบิน ในแง่ปริมาณของการจับตัวของโลหะทั้งสองบนเฮมูโกลบิน (metal binding) และ oxidase activity และผลที่เกิดขึ้นหลังการดึงตะกั่วออกจากเฮมูโกลบินด้วย metal-chelating agents

วิธีการวิจัย

1. สารเคมีและวิธีการวิจัย

1.1 สารเคมี

- 1.1.1 เฮมูโกลบิน ของคนซื้อจาก Sigma Chemical Company และมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วย DEAE-cellulose column chromatography
- 1.1.2 โลหะที่ใช้ศึกษาการจับตะกั่ว Lead acetate (Analytical grade) จาก B.D.H
- 1.1.3 Graphite furnace atomic absorption spectrophotometry สารเคมีที่ใช้ตรวจวัดโลหะ ได้แก่ Pb, และ Cu มาตรฐานจาก Normex Farmitaria Carlo Erba และเป็น atomic absorption grade
- 1.1.4 สารเคมีที่ใช้ตรวจ oxidase activity ได้แก่ p-phenylenediamine.HCl จาก Sigma, sodium acetate, sodium azide, และ glacial acetic acid (analytical grade) จาก Merck
- 1.1.5 สารเคมีที่ทำ Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis (IEF-PAGE)
Acrylamide, ammonium persulfate, glacial acetic acid และ absolute ethanol Analytical grade จากบริษัท Merck
N,N-methylene-bis-acrylamide, N,N,N,N-tetraethylmethylene (Electrophoresis grade) และ Coomassie brilliant blue R-250 จาก Sigma
Ampholyte pH 4-6 จาก Pharmacia Fine Chemical
Copper sulfate (Analytical grade) จาก Reidel

1.1.7 Protein determination o-Phosphoric acid, glacial acetic acid, absolute ethanol จาก Merck

1.2 เครื่องมือ

Power Supply, Model Power Pac-3000, Biorad Laboratoies, USA

Mini IEF Cell, model 111, Biorad Laboratoies, USA

UV-Visible Spectrophotometer, model 7800, Jasco, Japan

Hot -Air Oven, Memmert

Imaging Densitometer, model GS-670, Biorad Laboratoies, USA

Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophometer, model SpectrAA-300, Varian, USA

1.3 วิธีทำการทดลอง

ทุกการทดลอง ทำอย่างน้อย 2 ครั้ง ได้ผลใกล้เคียงกัน ในแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ค่าที่เสนอ ในผลทดลองเป็นค่าเฉลี่ยของ 3 ค่าที่ได้

1.3.1 การเตรียมเซอร์ูโลพลาสมินให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial-Purified Ceruloplasmin)

โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ด้วย DEAE-cellulose (DE-52) ซึ่ง equilibrate ด้วย 0.01M acetate buffer, pH 5.5 อัตราเร็วในการชะ 1มล./นาที หลังจากได้ เซอรูโลพลาสมิน แล้ว ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมจนการดูดกลืนแสงที่ความยาว ช่วงคลื่น 280 นาโนเมตรมีค่าเป็นศูนย์ จึงชะเซอร์ูโลพลาสมินออกจากคอลัมน์ด้วย สารละลาย 100 mM NaCl ใน 0.01M acetate buffer, pH 5.5

1.3.2 การตรวจวัดโลหะด้วย graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (F-AAS)

เจือจางสารตัวอย่างด้วย 0.02 M HNO₃ แล้วฉีดเข้า F-AAS สำหรับการวัดตะกั่ว ต้องกระทำที่ความยาวช่วงคลื่น 283.3 นาโนเมตร และทองแดงที่ 324.8 นาโน เมตร ตามลำดับ ที่ peak height mode และความกว้างของ slit 0.5 นาโนเมตร โดยใช้ internal standards ด้วย ปริมาตรสารที่ฉีด 16 µl ใช้ 0.1 M H₃PO₄ และ palladium เป็น emulsifier อุณหภูมิและอัตราการไหลของแก๊สดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Condition ในการใช้ atomic absorption spectrophotometry

STEP NO.	TEMPERATURE (°C)	TIME (sec.)	GAS FLOW (l/min.)
1	85	5.0	3.0
2	120	30.0	3.0
3	500	5.0	3.0
4	500	10.0	3.0
5	500	2.0	0.0
6	2100	0.8	0.0
7	2100	2.0	0.0
8	2600	5.0	3.0

1.3.3 การตรวจวัด ferroxidase activity ของ ceruloplasmin (Wolf, P. *et al*, 1973)

โดยติดตามการออกซิไดซ์ p-phenylenediamine ที่ 37 °ซ. ใน 0.1 M acetate buffer, pH 6.0 ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นสีชมพู (Wurster's red) วัดการดูดกลืนแสงได้ที่ 530 นาโนเมตรด้วย spectrophotometer

$$\text{ceruloplasmin unit} = A_{530} \times 1,000$$

1.3.4 การศึกษา ceruloplasmin ด้วย isoelectric focusing

วิเคราะห์ เซอรูโลพลาสมีน ด้วย isoelectric focusing แบบแผ่น ระบบแนวนอน ใน chamber แบบ Mini IEF Cell, model 111 และไม่ใช้ electrode buffer โดยทดสอบละลายเจลดังส่วนผสมในตารางที่ 2 ลงระหว่างแผ่นกระจก เหนือ supporting film

ตารางที่ 2 สูตรการเตรียม isoelectric focusing gel pH 4-6

สารละลาย	ปริมาตร (มล.)
น้ำกลั่นปราศจากอิออน	1.39
30% acrylamide	0.90
1% N,N'-Methylene-bisacrylamide	1.28
ampholyte, pH 4-6	0.25
50% sucrose	1.19
10% ammonium persulfate	0.03
TEMED (μ l)	1.5

หลังจาก gel polymerize แล้ว แกะกระจกออก บรรจุสารตัวอย่าง 3-15 μ l ลงบน เจลโดยใช้กระดาดขนาด 0.2 X 0.5 ซม. ดูดซับสารตัวอย่าง แล้ววางติดลงบน แผ่นเจล คว่ำเจลลงบน graphite electrode ของ chamber ทำการทดลองต่อไปที่ 4°C. ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ อย่างต่อเนื่องดังนี้ ช่วงแรก 100 volt นาน 15 นาที 200 volt นาน 15 นาที และ 400 volt 1.20 ชม.

หลังจากทำ isoelectric focusing แล้ว ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แขนเจลในสารละลายสีย้อม 0.04% Coomassie Brilliant Blue R-250 , 0.5% CuSO_4 ใน 27% ethanol 10% acetic acid นาน 3 ชม. แล้วจึงชะสีออกด้วยตัวชะขั้นที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย 12% ethanol, 7% acetic acid, 0.5% CuSO_4 เป็นเวลา 2 ชม. และสารละลายตัวชะขั้นที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย 25% ethanol, 7% acetic acid อีก 15 นาที จึงนำมาฝั่งให้แห้ง บันทึกผลโดยการถ่ายรูป

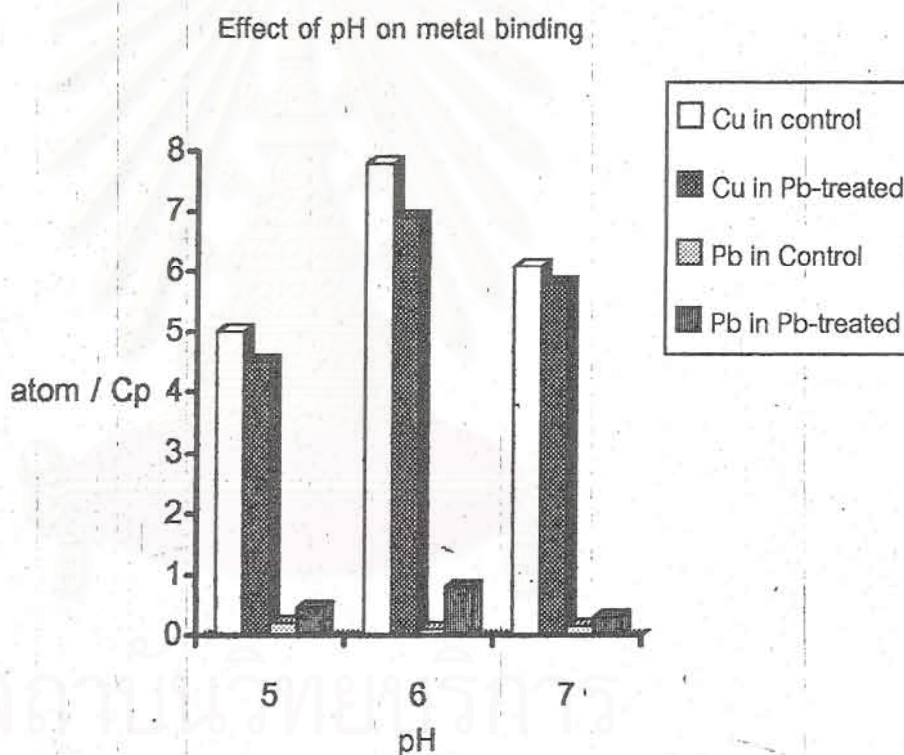
1.3.5 การหาปริมาณโปรตีน ใช้วิธี Dye-Binding ของ Bradford M.B, 1976

1.3.6 การแยกเซอรูโลพลาสมีนออกจากตะกั่วอิสระ โดยใช้ Sephadex column chromatography ขนาด 1 x 20 cm และโดยใช้บัฟเฟอร์เหมือนในสารตัวอย่าง เป็นตัว equilibrate และชะ column อัตราการชะ 20 มล./ชม. ปริมาตรสารตัวอย่าง และขนาดของการเก็บในแต่ละหลอด 1 มล. ติดตามเซอรูโลพลาสมีนซึ่งจะออกมาที่ void volume ด้วยการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร

ผลการวิจัย

1. สภาพที่เหมาะสมในการจับตัวของตะกั่วบน ceruloplasmin

ได้ทำการทดสอบหาปริมาณทองแดงที่จับตัวอยู่บนโฮโลเซอรูโลพลาสมิน (holoceruloplasmin) และสภาพที่เหมาะสมที่สุดที่ตะกั่วจะจับกับโปรตีนนี้ โดยทดลองปมโฮโลเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่วในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เทียบกับหลอดควบคุม ซึ่งได้แก่โฮโลเซอรูโลพลาสมินเมื่อไม่มีตะกั่ว แล้วแยกเอาเซอรูโลพลาสมินที่จับกับโลหะออกจากโลหะอิสระ เพื่อนำไปวัดปริมาณทองแดงและตะกั่ว

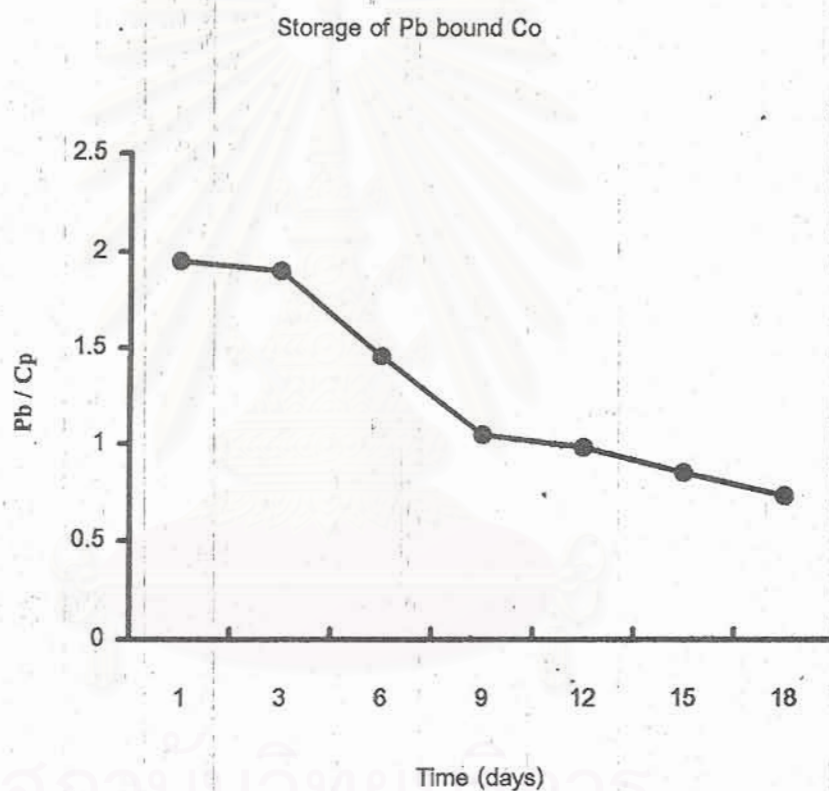


รูปที่ 1 ผลของ pH ต่อการจับตัวของโลหะบนเซอรูโลพลาสมิน

ปมเซอรูโลพลาสมินอิสระ 1 มิลลิลิตร (4 μ M) กับ 1.8 ppm lead ในรูป lead acetate ใน 0.01 M acetate buffer, pH 5.0, 6.0 และ ใน 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.0 ที่ 37° ซ. เป็นเวลา 30 นาที แยกเซอรูโลพลาสมินออกจากตะกั่วอิสระทันทีด้วย Sephadex G-25 (1 X 20 cm) ตามวิธีในข้อ 1.3.6 แล้วนำเซอรูโลพลาสมินไปวัดปริมาณโลหะด้วย F-AAS ด้วยวิธีในข้อ 1.3.2

ผลการทดลองในรูปที่ 1 แสดงว่าที่ pH 6.0 จะพบปริมาณโลหะบนโมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสตินสูงที่สุด กล่าวคือ มีปริมาณทองแดงใกล้เคียงกับที่เคยรายงานไว้โดย Holmberg คือ 8 อะตอมต่อไฮโดรเซอร์ูโลพลาสติน 1 โมเลกุล และ ณ pH นี้ ตะกั่วจะสามารถแทนที่ทองแดงได้สูงที่สุด คือ 0.63 อะตอม/ โมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสติน ค่านี้ต่ำกว่าปริมาณที่ทองแดงถูกปลดปล่อยออกมาเล็กน้อย (0.96 อะตอม / โมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสติน) การทดลองต่อจากนี้จะทำที่ pH 6.0 เสมอ

2. สภาพที่เหมาะสมในการเก็บ ceruloplasmin ที่จับกับตะกั่ว



รูปที่ 2 ความเสถียรของสารเชิงซ้อนระหว่างเซอร์ูโลพลาสตินกับตะกั่ว ที่ 4°C.

ปมเซอร์ูโลพลาสตินอิสระ 1 มิลลิลิตร (4 μ M) กับ lead acetate (28.8 ppm lead) ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 ที่ 37°C. เป็นเวลา 30 นาที แยกโปรตีนออกจากตะกั่วอิสระด้วย Sephadex G-25 column (1 X 20 cm) ตามวิธีในข้อ 1.3.6 แบ่งสารละลายโปรตีนที่ได้ออกเป็นปริมาตรย่อยๆ เก็บไว้ที่ 4°C. เมื่อถึงเวลาที่ระบุไว้ในผลการทดลอง นำไปผ่าน Sephadex G-25 column เพื่อกำจัดตะกั่วอิสระออกอีกครั้งหนึ่ง แล้วจึงนำไปวัดปริมาณโลหะด้วย F-AAS (ข้อ 1.3.2) ผลการทดลองข้างต้นเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัด 4 ค่า

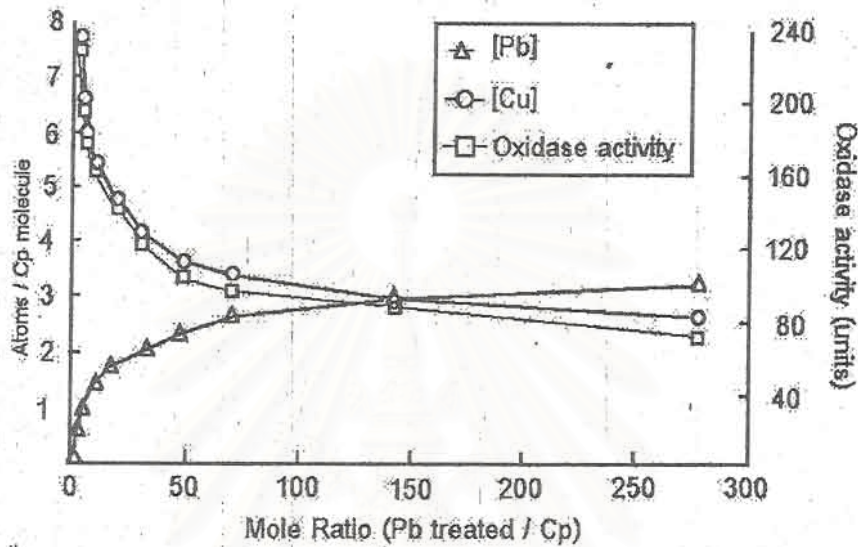
เพื่อเป็นการทดสอบว่าเมื่อตะกั่วจับกับเซอร์ูโลพลาสมินแล้ว จะมีความเสถียรพอที่จะใช้ในการศึกษาได้นานเพียงใด จึงได้นำเซอร์ูโลพลาสมินที่มีตะกั่วจับอยู่ไปเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลาต่าง ๆ กัน แล้วแยกโลหะอิสระออกจากโปรตีนอีกครั้งหนึ่ง ก่อนนำไปวัดตะกั่วที่ยังคงจับอยู่กับเซอร์ูโลพลาสมิน รูปที่ 2 แสดงให้เห็นว่า การจับของตะกั่วต่อเซอร์ูโลพลาสมินเป็นแบบผันกลับได้ โดยจะสามารถหลุดออกจากโมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสมิน กล่าวคือเหลือประมาณ 50% ในวันที่ 9 และลดลงอีกเหลือประมาณ 40% ในวันที่ 18 โดยที่ใน 3 วันแรก ปริมาณตะกั่วยังใกล้เคียงกับปริมาณตั้งต้น ดังนั้นเพื่อจะทำให้ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าที่เชื่อถือได้ ทุกการทดลองต่อจากนี้จึงทำให้เสร็จสิ้นภายใน 1 วัน โดยไม่เก็บเซอร์ูโลพลาสมินในรูปที่จับกับตะกั่วไว้ ก่อนวัดปริมาณตะกั่วเสมอ

3. ความสัมพันธ์ระหว่างการจับของตะกั่ว ต่อ oxidase activity ของ ceruloplasmin

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ในเชิง stoichiometry ของการจับระหว่างตะกั่วกับโมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสมินต่อ oxidase activity ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งจะเห็นได้ว่า เมื่อไม่ใส่ตะกั่ว ไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมินมีทองแดงอยู่บนโมเลกุล 8 อะตอม เมื่อเพิ่มตะกั่วลงไปในสารตัวอย่าง ทองแดงจะถูกปลดปล่อยออกจากเซอร์ูโลพลาสมิน พร้อมๆกับการจับตัวของตะกั่ว การเปลี่ยนแปลงปริมาณของโลหะทั้งสองขึ้นกับความเข้มข้นของตะกั่วที่ใช้ในการทดลอง ลักษณะกราฟที่เกิดขึ้นเป็นแบบ hyperbola อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าพิจารณาว่าทองแดงถูกไล่ออกมากที่สุดเพียง 5 อะตอมเท่านั้น ถึงแม้ว่าจะเพิ่มปริมาณของตะกั่วลงในสารตัวอย่างจนถึง 278 อะตอม / โมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสมินแล้ว ปริมาณของทองแดงที่ยังคงอยู่บนโมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสมินก็ไม่ต่างจากเมื่อใช้ตะกั่วต่ำกว่าครึ่งหนึ่งมากนัก เป็นที่น่าสังเกตอีกด้วยว่า ปริมาณของตะกั่วที่เข้าไปแทนที่เมื่อเทียบกับปริมาณทองแดงที่หลุดออกก็ไม่ได้อยู่ในอัตราส่วน 1:1 กล่าวคือเมื่อทองแดงหลุดออกจากเซอร์ูโลพลาสมิน 5 อะตอม ตะกั่วเข้าไปแทนที่เพียง 3.2 อะตอมเท่านั้น

ปัจจัยที่ได้ศึกษาอีกอันหนึ่งคือ oxidase activity ซึ่งลดลงอย่างชัดเจนเมื่อตะกั่วเข้าจับกับเซอร์ูโลพลาสมิน การลดลงของ oxidase นี้ ขนานไปกับการลดลงของทองแดงด้วย จนถึงจุดที่ใช้ตะกั่วสูงที่สุด (278 Pb atom / mole Cp) อัตราของการปลดปล่อยทองแดงกับการลดลงของ oxidase activity มีค่าเท่ากันพอดี คือ ประมาณ 63%

Relationship between metal binding and oxidase activity on purified ceruloplasmin



รูปที่ 3. ความสัมพันธ์ของการจับตะกั่ว ต่อ oxidase activity ของ ceruloplasmin

ปมเซอร์คูโลพลาสมีนอิสระ 1 มิลลิลิตร (4 μ M) กับ lead acetate ความเข้มข้นต่างๆกันใน 0.01 acetate buffer, pH 6.0 ที่ 37° ซ. เป็นเวลา 30 นาที แยกโปรตีนออกจากตะกั่วอิสระด้วย Sephadex G-25 column (1 X 20 cm) (ข้อ 1.3.6) แล้วจึงนำไปวัดปริมาณโลหะด้วย F- AAS (ข้อ 1.3.2) และวัด oxidase activity (ข้อ 1.3.3)

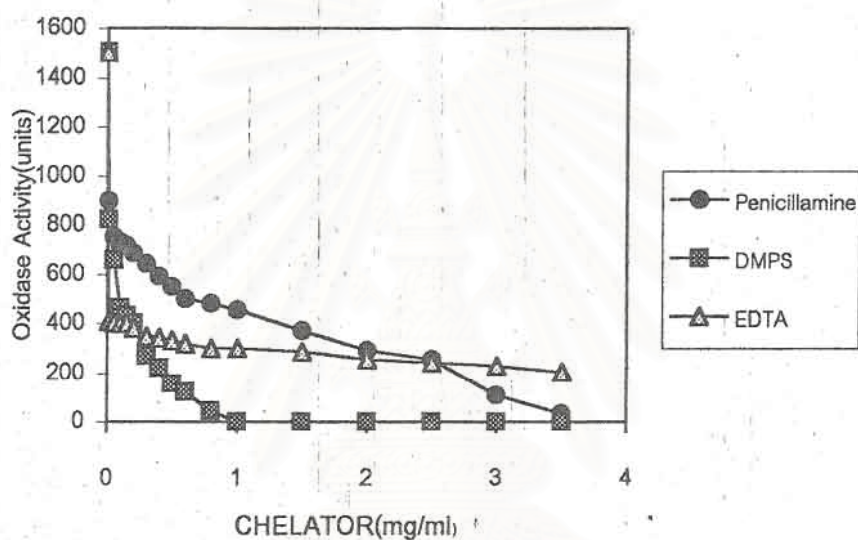
4 ผลของ metal chelators ต่อ oxidase activity และค่า pI ของเซอร์คูโลพลาสมีนเมื่อศึกษาในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis)

****จากการที่พบว่าตะกั่วไม่สามารถลด oxidase activity ได้ทั้งหมด จึงได้วางแผนการทดลองที่จะเปรียบเทียบความสามารถนี้กับตัวจับโลหะอื่น และเปรียบเทียบรูปแบบของเซอร์คูโลพลาสมีนในสภาพที่มีและไม่มีโลหะด้วยไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงในพอลิอะคริลามิไนด์เจล (isoelectric focusing polyacrylamide gel) โดยอาศัยหลักที่ว่าหากการจับของโลหะเกิดขึ้น หมู่เคมีที่มีประจุของเซอร์คูโลพลาสมีนแล้ว โลหะนั้นจะสามารถเปลี่ยนค่าไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ของเซอร์คูโลพลาสมีนได้

การศึกษานี้เลือกใช้ metal chelator 3 ชนิด ได้แก่ DMPS, EDTA และ Penicillamine เพื่อศึกษาการความสัมพันธ์ของปริมาณทองแดงกับ oxidase activity ที่ลดลง และเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า pI

4.1 ผลของ metal chelators ต่อ oxidase activity ของเซอรูโลพลาสมิน

Effect of chelators on ceruloplasmin oxidase activity



รูปที่ 4 ผลของ metal chelators ต่อ oxidase activity ของเซอรูโลพลาสมิน

บ่มเซอรูโลพลาสมิน (0.2 mg/ml) ปริมาตร 50 μ ล กับ chelator ปริมาตร 5 μ ล และ 0.1M acetate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 45 μ ล ที่ 37 $^{\circ}$ ซ. โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ metal chelator ดังในรูป 4 เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที ดึงสารละลายปริมาณ 30 μ ล ไปตรวจวัด oxidase activity ตามวิธีในข้อ 1.3.3 ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง

เห็นได้ว่า metal chelators ทั้งสามสามารถลด oxidase activity ของเซอรูโลพลาสมินได้ แต่ด้วยความสามารถที่แตกต่างกันบ้าง DMPS มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยสามารถลด oxidase activity ได้ทั้งหมด เมื่อใช้ความเข้มข้น 1 มก./มล. และความเข้มข้นของ DMPS ที่ลด oxidase activity ได้ครึ่งหนึ่งมีค่าเท่ากับ 5 มก./มล. ความเข้มข้นของ EDTA ที่ยับยั้งเอ็นไซม์ได้ครึ่งหนึ่งมีค่าต่ำกว่าก็จริง แต่กลับไม่สามารถลด oxidase activity ได้ทั้งหมด ยังคงเหลือ activity อีกประมาณ 80 % Penicillamine ลด oxidase activity ได้สมบูรณ์ แต่ต้องใช้ปริมาณมากกว่า DMPS จึงอาจสรุปได้ว่า DMPS เป็น

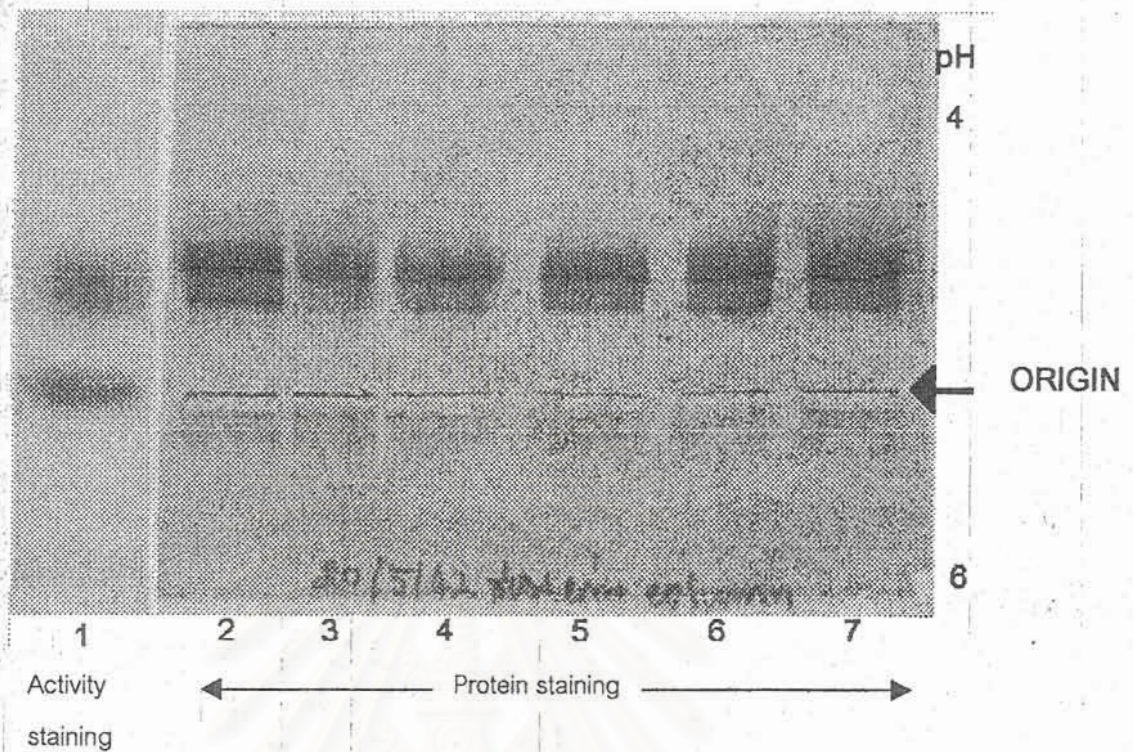
metal chelator ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และเป็นที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่ง คือ DMPS สามารถทำงานได้ดีกว่าตะกั่วในการไล้ที่ทองแดงบนโมเลกุลของเซอรูโลพลาสมีนอีกด้วย ผลการทำงานที่แตกต่างกันเช่นนี้ อาจใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาความสัมพันธ์ของ ตำแหน่งที่ตะกั่ว และทองแดงจับกับเซอรูโลพลาสมีนได้ หากเราสามารถแยกเซอรูโลพลาสมีนอิสระ เซอรูโลพลาสมีนที่จับกับตะกั่ว และที่จับกับทองแดงออกจากกันได้

4.2 ผลของ metal chelators ต่อค่า pi ของเซอรูโลพลาสมีน

การทดลองก่อนหน้า พบว่าเราไม่สามารถแยก เซอรูโลพลาสมีนอิสระ ออกจากเซอรูโลพลาสมีนที่จับกับโลหะออกจากกันได้ ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ nondenaturing (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) แต่คาดว่าโลหะอาจเปลี่ยนประจุสุทธิบนเซอรูโลพลาสมีนได้ จึงนำไฮโดเซอรูโลพลาสมีน ไฮโดเซอรูโลพลาสมีนที่ถูกดึงทองแดงออกด้วย DMPS และที่จับกับตะกั่วไปจำแนกออกจากกัน ด้วย isoelectric focusing ใน polyacrylamide gel electrophoresis ที่ pH 4-6 โดยตรวจวัด activity ในเจล เพื่อยืนยันตำแหน่งของ เซอรูโลพลาสมีนด้วย ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 5

จะเห็นได้ว่า เซอรูโลพลาสมีนมาตรฐานมีแถบโปรตีนหลัก 2 แถบ ซึ่งสอดคล้องกับ oxidase activity แต่เมื่อดึงทองแดงออกจากเซอรูโลพลาสมีนด้วย DMPS จนไม่สามารถเร่งปฏิกิริยา oxidation ได้แล้ว หรือปมกับตะกั่วจน oxidase activity ลดลงประมาณ 60 % แถบโปรตีนหลักทั้ง 2 แถบก็ยังปรากฏอยู่ เช่นเดิม แสดงว่าโลหะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงค่า pi ของเซอรูโลพลาสมีนเมื่อติดตามด้วย IEF-PAGE ได้วิธีนี้ จึงไม่สามารถจำแนกเซอรูโลพลาสมีนที่จับและไม่จับกับโลหะออกจากกันได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 ผลของตะกั่วและ DMPS ต่อค่า pI ของเอนไซม์โลพลาสติน

บ่มเอนไซม์โลพลาสตินกับสารจับโลหะ DMPS หรือ lead acetate ความเข้มข้นต่างๆ ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 ที่ 37 °ซ.เป็นเวลา 30 นาที (ปริมาตรรวม 25 μ l) นำลงวิเคราะห์ใน IEF-PAGE pH 4-6 ด้วยวิธีในข้อ 1.3.4 ตัดเจลช่องที่ 1 มาทำการย้อม oxidase activity และช่องที่ 2-7 ทำการย้อมโปรตีน

ช่องที่	สารตัวอย่าง
1	148.4 μ g Cp (46,464 units)
2	14.8 μ g Cp
3	7.4 μ g Cp
4	10.0 μ g Cp ใน 1.8 ppm lead acetate
5	10.0 μ g Cp ใน 28.8 ppm lead acetate
6	10.0 μ g Cp ใน 5 mg/ml DMPS (33.5 μ g)
7	10.0 μ g Cp ใน 1 mg/ml DMPS (6.7 μ g)

อภิปราย

ในส่วนต้นของการวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะของการจับตัวของโลหะที่ต้องการวิเคราะห์กับ Cp ตลอดจนวิธีการเก็บรักษาสารที่เตรียมได้เพื่อนำไปศึกษาต่อ พบว่า Cp จับได้ดีกับตะกั่วที่ pH 6.0 และมีเสถียรภาพพอสมควรเมื่อเก็บที่ 4 °C. อย่างไรก็ตามการศึกษาทั้งหมดต่อจากนี้ไม่ได้ใช้ Cp ที่จับกับโลหะที่เก็บไว้เป็นเวลานาน แต่เตรียมขึ้นแล้ววิเคราะห์ในวันเดียวกัน

ผลการทดลองอันแรกที่น่าสนใจและยังไม่มีผู้ศึกษาวิเคราะห์มาก่อน คือ ถึงแม้จะเป็นที่ทราบกันดีว่า Cp ต้องการทองแดงในการเร่งปฏิกิริยา แต่ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาว่าเมื่อตะกั่วจับกับ Cp แล้วสามารถไล่ที่ทองแดงออกได้ และลด oxidase activity ของ Cp ได้ ลักษณะผลการทดลองในรูปที่ 3 มีข้อที่ควรนำมาพิจารณาเกี่ยวกับลักษณะการจับของโลหะต่อ Cp ดังนี้

เมื่อยังไม่มีตะกั่ว Cp มีทองแดงอยู่ในโมเลกุลประมาณ 8 อะตอม ค่านี้ค่อนข้างสูงกว่าที่ Messerschmidt (1990) และ Zaitseva และคณะ(1996) รายงานว่ามี 7 และ 6 อะตอมตามลำดับ ซึ่งได้เสนอโมเดลการจับระหว่างทองแดงกับ Cp ให้ความ Cp ประกอบขึ้นด้วย 6 domains การจับกับทองแดงมีสองลักษณะใหญ่ๆ พวกแรกเรียกว่าเป็น trinuclear clustered site อยู่บริเวณส่วนสัมผัสระหว่าง domain ที่ 1 กับ 6 ทำหน้าที่จับกับทองแดง 3 อะตอม พวกที่สองกระจายตัวอยู่ใน domain ที่ 2, 4 และ 6, domain ละ 1 อะตอม เรียกว่าเป็น mononuclear sites กรดอะมิโนที่ทำหน้าที่จับกับทองแดงในตำแหน่งนี้ ได้แก่ Cys, His และ Met

รูปที่ 3 ลักษณะกราฟของตะกั่วที่จับกับ Cp ขึ้นกับความเข้มข้นของตะกั่วที่ใช้ และเป็น hyperbola ที่มีจุดอิ่มตัว การเพิ่มของตะกั่วมีความสัมพันธ์กับปริมาณของทองแดงและ oxidase ที่ลดลงอย่างชัดเจน แต่การลดลงนี้ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือถึงแม้จะเพิ่มปริมาณตะกั่วขึ้นอีกเพียงใดก็ตาม ตะกั่วลด oxidase activity และทองแดงลงไปได้สูงสุดเพียง 60% ผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะตะกั่วสามารถไล่และแทนที่ทองแดงที่จับกับ Cp ที่ site หนึ่งได้ แต่ไล่อีก site หนึ่งไม่ได้ ซึ่งต่างจากตัวจับโลหะ DMPS กับ Penicillamine ในรูปที่ 4 ที่สามารถไล่ทองแดงได้ทั้งหมด และลด oxidase activity ได้อย่างสมบูรณ์ แสดงว่า metal chelators เหล่านี้สามารถไล่ที่ทองแดงออกได้จากทั้ง 2 sites

ความแตกต่างของผลการทดลองข้างต้นอาจนำไปเป็นวิธีการศึกษา site ที่จับกับกับตะกั่วและที่จับกับทองแดงได้ว่า มีความสัมพันธ์กันอย่างไร หากเราสามารถจำแนก holoceruloplasmin และ Cp ที่จับกับทองแดง และกับตะกั่วออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามการทดลองแยก Cp เมื่อมีและไม่มีตะกั่วหรือทองแดงจับอยู่ด้วย IEF-PAGE นั้น พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จ เราไม่สามารถแยกโปรตีนในสภาพข้างต้นออกจากกันได้ ค่า pi ของโปรตีนในสภาพดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันจนสามารถแยกออกจากกันได้ที่ pH 4-6 ผลการทดลองนี้แตกต่างจากโปรตีนที่จับกับโลหะอื่น เช่น transferrin (Tf) ที่ทำหน้าที่ขนส่งเหล็กในซีรัม ในห้องปฏิบัติการเดียวกันนี้พบว่าเหล็กสามารถเลื่อน

แถบของ Tf ใน IEF-PAGE ได้อย่างชัดเจน การที่ทองแดงไม่สามารถเลื่อนแถบของ Cp ใน IEF-PAGE ได้นั้นอาจเป็นเพราะตำแหน่งที่โลหะเข้าไปจับนั้นไม่ได้อยู่บนพื้นผิวหน้าของ Cp แต่ฝังตัวอยู่ภายในโมเลกุล จึงไม่ทำให้ประจุของผิวหน้าของ Cp เปลี่ยนแปลงไป

ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการนี้ สอดคล้องกับคำอธิบายของ H.C.Freeman and L.Jensen จากผลการทดลองจาก X-ray crystallography ว่า copper blue centre มีลักษณะเป็น β -barrel ซึ่งฝังตัวอยู่ภายในโปรตีน (Frausto da Silva, J.J.R. and Williams, R.J.P., 1993) ลักษณะของ β -barrel คงที่ ไม่ขึ้นกับโลหะที่จับ ลักษณะเช่นนี้จึงไม่ทำให้ประจุสุทธิบนพื้นผิวโมเลกุลของ Cp เปลี่ยนแปลงไป

หากการจับของโลหะบน Cp เป็นไปอย่างจำเพาะที่ β -barrel ซึ่งฝังตัวอยู่ภายในโปรตีนจริง เพื่อที่จะจำแนก Cp ในรูปที่จับกับไม่จับกับโลหะออกจากกันนี้ อาจต้องใช้เทคนิคอื่น เช่น denaturing gel เช่น urea gel เพราะโลหะอาจช่วยคงสภาพของรูปร่างของ Cp ไว้ ใน urea gel และห้องปฏิบัติการนี้จะทำการทดลองนี้ต่อไป

ถึงแม้ว่าผลการทดลองข้างต้นนี้จะสามารถอธิบายลักษณะการจับของทองแดงและตะกั่วต่อ Cp ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น แต่ผลการทดลองที่ว่าตะกั่วสามารถจับกับ Cp นั้นสอดคล้องกับที่พบในเลือดของผู้ป่วยโรคพิษตะกั่ว ในห้องปฏิบัติการเดียวกันนี้ ยิ่งกว่านั้นความสามารถที่ตะกั่วลด oxidase activity ของ Cp ลงได้นี้มีประโยชน์อย่างยิ่ง เพราะนำไปสู่ผลงานวิจัยในห้องปฏิบัติการเดียวกันนี้อีกอันหนึ่ง ที่พบว่า oxidase activity สามารถใช้เป็น biomarkers สำหรับคนงานในโรงงานที่เกี่ยวข้องกับการใช้ตะกั่วได้ดี ดีเท่ากับ biomarkers อื่นที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

สรุป

- 1) ตะกั่วและทองแดงจับกับเซอรูโลพลาสมีนได้ดีที่สุดที่ pH 6.0
- 2) สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างตะกั่วกับเซอรูโลพลาสมีนมีความเสถียร สามารถเก็บที่ 4 °C. ได้ 3 วัน
- 3) การจับของตะกั่วต่อเซอรูโลพลาสมีนมีลักษณะที่ขึ้นกับปริมาณของตะกั่วที่ใช้ ตะกั่วสามารถไล่ที่ทองแดงออกได้ และลด oxidase activity ของ Cp ได้ด้วย แต่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งต่างจากสารจับโลหะที่ไล่ที่ทองแดงได้ดีกว่า
- 4) DMPS เป็นสารจับโลหะที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด เมื่อเทียบกับ EDTA และ Penicillamine
- 5) IEF-PAGE ที่ pH 4-6 ไม่สามารถจำแนก เซอรูโลพลาสมีน ในรูป apo-, holo- หรือรูปที่จับกับตะกั่วได้ แสดงว่าค่า pI ของ Cp ในรูปต่างๆไม่แตกต่างกัน



เอกสารอ้างอิง

- Frausto da Silva, J.J.R. and Williams, R.J.P. (1993) *The role of Biological Macromolecules and Polymers in The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. Clarendon Press. Oxford. pp 163-222.
- Goyer, R.A. (1991) *Toxic Effect of Metal* in Casarett and Doull's Toxicology : The Basic Science of Poison, Amdur, M.O., Doull, J. and Klaassen, C.D. eds. 4th ed, U.S.A. pp 639-656.
- Holmberg, C.G. (1951) *Investigations in Serum Copper III. Ceruloplasmin as an enzyme*. Acta Chemica Scandinavica 5: 476-480.
- Mungkalee, S (1994) *Characterization of Lead-binding Protein in Human Serum*, Master's Thesis, Chulalongkorn University.
- Winship, K.A. (1989) *Toxicity of Lead: A Review*. Adverse drug Reactions and Acute Poisoning Review 8 (3) 117-152.
- Wolf, P. et al, (1973) *Serum Ceruloplasmin Determination in Practical Clinical Enzymology and Biochemical Profiling: Techniques and Interpretations*, U.S.A.: A Wiley-Interscience Publication by John Wiley & Sons, Inc. pp 26-29.

คลังยืมวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย