บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ จิราพร โรจน์ทินกร (2537) ซึ่งได้ศึกษาการเตรียมเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus sp.* A11 ให้บริสุทธิ์แล้วนำไปกระตุ้นกระต่ายทดลองให้สร้างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase งานวิจัยนี้ได้นำแอนติบอดีที่เตรียมได้มาใช้ประโยชน์ในการแยกเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน ซึ่งเป็นงานวิจัยต่อเนื่องเพื่อเตรียมแอนติบอดีคอลัมน์ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ CGTase โดยนำแอนติซีรั่มของกระต่ายที่เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ มาทำการศึกษาแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ออกจากแอนติซีรั่มให้บริสุทธิ์ แล้วนำมาตรึงเข้ากับตัวค้ำ และทดสอบแอนติบอดีคอลัมน์ที่เตรียมได้นี้ โดยนำมาศึกษาการเตรียมเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus sp.* A11 ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน

จากรายงานการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus sp.*A11 ให้บริสุทธิ์ โดย วัลยา เตชชัยกุล (2534) และจิราพร โรจน์ทินกร (2537) พบว่าในการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ ต้องผ่านหลายขั้นตอน เช่น การดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้ง การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และต้องผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ที่ใช้หลักการแยกแตกต่างกันอย่างน้อย 2 คอลัมน์ ได้แก่ ion exchange chromatography, gel filtration หรือ chromatofocusing ทำให้ได้ enzyme yield ต่ำและใช้เวลานาน งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบ

สัมพรรคภาพอิมมูโน ซึ่งวิธีการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ที่ศึกษานี้จะมีประสิทธิภาพเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์และได้ปริมาณมาก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ CGTase ต่อไป

เทคนิคบางอย่างในงานด้านอิมมูโนวิทยาเช่นการทำ immunoassay immunoblot หรือการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน จำเป็นต้องใช้แอนติบอดีที่บริสุทธิ์ (Harlow และ Lane , 1988) วิธีที่ใช้ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์นั้นมีหลายวิธี เช่น การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตหรือกรดคาปริลิค การทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบต่าง ๆ เช่น การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose gel filtration หรือการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน โดยใช้แอนติอิมมูโนโกลบูลินเป็นลิแกนด์ ในการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์มักใช้วิธีต่าง ๆ ร่วมกันอย่างน้อย 2 วิธี เช่นใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose หรือใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับกรดคาปริลิคเป็นต้น (Harlow และ Lane, 1988) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีการทำแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่มาก และแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์

ในช่วงแรกของงานวิจัยได้นำแอนติซีรั่มของกระต่ายซึ่งเก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80 °ซ มาทำการแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ออกจากแอนติซีรั่มให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต Hudson และ Hay (1976) ได้รายงานว่าแอนติบอดีส่วนใหญ่ในแอนติซีรั่มของกระต่าย จะตกตะกอนออกจากโปรตีนตัวอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 45 เปอร์เซนต์ ในการแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ จึงเลือกตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น

อิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 45 เปอร์เซนต์ จากการทดลองพบว่าเมื่อนำไปหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยค่าไตเตอร์ของ crude antiserum เป็น 1 : 2^2 ในขณะที่หลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจะได้ค่าไตเตอร์ 1:2^6 (ตารางที่ 4)

ในการแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase โดยวิธีการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วยดีอีเอดี-เซลลูโลส ได้ทดลองทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วยวิธี batch separation และวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าในการทดลองใช้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้ยังไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควร โดยตรวจสอบจากการแยกโปรตีนโดยการทำเจล อิเลคโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส และแอนติบอดีที่เตรียมได้มีปริมาณน้อย (ผลการทดลองไม่ได้แสดงในวิทยานิพนธ์นี้) ในการแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase จึงเลือกใช้วิธี batch separation ซึ่งได้ผลที่ดีกว่า เนื่องจากปริมาตรของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้จะเปลี่ยนแปลงน้อย และการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างจะควบคุมได้ง่ายกว่า ในการแยกแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์โดยวิธีนี้ อาศัยการปรับค่า pH ของสารละลายแอนติบอดีให้ต่ำกว่าค่า isoelectric point ของแอนติบอดีที่มีอยู่ในสารละลายนั้น ซึ่งจะทำให้ประจุสุทธิของโมเลกุลแอนติบอดีมีค่าเป็นบวก จึงไม่จับกับ DEAE-cellulose เรซินซึ่งเป็นตัวแลกเปลี่ยนที่เป็นประจุบวก (Hudson และ Hay,1976) จากการทดลองพบว่าที่ pH 6.5 แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ไม่ยึดติดกับ DEAE-cellulose เรซิน และอยู่ในส่วนสารละลาย เมื่อนำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ไปหาปริมาณและความจำเพาะต่อเอนไซม์ CGTase โดยการทำอิมมูโนดิฟฟิวชัน พบว่าแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีความจำเพาะกับเอนไซม์ CGTase ซึ่งจะเห็นเป็นตะกอนเกิดขึ้น และได้ค่าไตเตอร์ 1:2^8 (ตารางที่ 4) และสามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้ประมาณ 96 เปอร์เซนต์

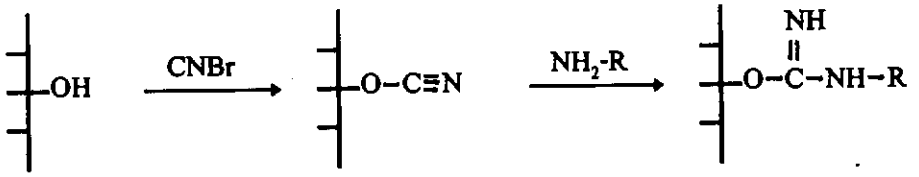
ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส สารในระบบ (2-mercaptoethanol) จะทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีเสียสภาพธรรมชาติ (denature) โดยจะทำลายพันธะไดซัลไฟด์ที่ยึดสาย heavy chain และสาย light chain ของโมเลกุลของแอนติบอดี ให้แยกออกจากกัน ได้เป็นโพลีเปปไทด์ 2 สายคือ heavy chain และ light chain ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 และ 25,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Harlow และ Lane, 1988) เมื่อนำสารละลายแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ มาทำการแยกโปรตีนโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอสนี้ พบว่าจะเห็นแถบโปรตีน 2 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 และ 25,000 ดาลตัน ในตัวอย่างทุกขั้นตอน แต่สารละลายแอนติบอดีที่ผ่านการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose จะพบเฉพาะโปรตีน 2 แถบนี้เท่านั้น (รูปที่ 7) แสดงว่าแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้นี้มีความบริสุทธิ์สูง พร้อมที่จะนำไปตรึงเข้ากับตัวค้ำเพื่อใช้ในการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาคอิมมูโนต่อไป

การตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase เข้ากับตัวค้ำ

ในการตรึงแอนติบอดีให้เข้ากับตัวค้ำ เพื่อเตรียมแอนติบอดีคอลัมน์ เพื่อใช้ในการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน สามารถทำได้หลายวิธี โดยการใช้ตัวค้ำชนิดต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้นให้เหมาะสมกับการจับของแอนติบอดี หรือการใช้การกระตุ้นแอนติบอดีให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมในการตรึงเข้ากับตัวค้ำ วิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือการใช้ Protein A-bead ซึ่งเป็นโปรตีนจาก *Staphylococcus aureus* และมีความจำเพาะกับส่วน Fc ของแอนติบอดี ทำให้สามารถตรึงแอนติบอดีเข้ากับ Protein A-bead ได้ (Harlow และ Lane,1988) วิธีการใช้ Protein A-bead เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ทำได้ง่าย แต่มีราคาแพง

และวิธีการกระตุ้นแอนติบอดีมีโอกาสทำให้แอนติบอดีเสียสภาพได้ง่าย ดังนั้นจึงเลือกใช้ตัวค้ำที่ถูกกระตุ้นให้เหมาะสมกับการตรึงแอนติบอดี มาทำการศึกษาการตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้เข้ากับตัวค้ำ

ตัวค้ำชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในงานโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาคอิมมูโน มีหลายชนิดเช่น อะกาโรส โพลีอะคริลาไมด์ เซลลูโลส ซิลิกา และ ไททาเนียมออกไซด์ ตัวค้ำเหล่านี้มีความเหมาะสมและข้อจำกัดในการใช้งานแตกต่างกันไป เช่น เซลลูโลสเป็นตัวค้ำที่สามารถกระตุ้นได้ง่าย มีราคาถูก แต่แอนติบอดีที่ตรึงอยู่จะค่อย ๆ หลุดออกไปเรื่อย ๆ อะกาโรสเป็นตัวค้ำที่มีลักษณะไฮโดรฟิลิค มีรูพรุนสูง ใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงในการตรึง แต่ไม่ค่อยแข็งแรงนักและมีราคาแพง ซิลิกาและไททาเนียม ออกไซด์ เป็นตัวค้ำที่มีความแข็งแรง ทนต่อสารเคมี ราคาถูก มีความเหมาะสมในการขยายสเกลใหญ่ แต่มีข้อเสีย คือ การจับกับโปรตีนแบบไม่จำเพาะ เป็นต้น เนื่องจากผิวของตัวค้ำมีหมู่ฟังก์ชันประเภทต่าง ๆ เช่น ไฮดรอกไซด์ คาร์บอกซิมิด ออกไซด์ ฯลฯ ซึ่งหมู่เหล่านี้มีความว่องไวน้อย ในการที่จะจับหมู่อะมิโนของแอนติบอดี (Kennedy, 1987) จึงต้องมีการใช้สารกระตุ้น (activator) เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาในการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันเดิมของตัวค้ำ ให้เป็นหมู่ฟังก์ชันใหม่ที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น สารที่ใช้เป็นตัวกระตุ้น เช่น ไซยาโนเจนโบรไมด์ คาร์บอนิลไดอิมิดาโซล กลูตารัลดีไฮด์ โทซิลคลอไรด์ เป็นต้น ไซยาโนเจนโบรไมด์เป็นสารกระตุ้นชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการกระตุ้นตัวค้ำ จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอะกาโรสได้เป็น ไซยาเนตเอสเทอร์ ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีความว่องไวสูง จากนั้นจะเชื่อมต่อหมู่อะมิโนของแอนติบอดีให้เข้ากับอะกาโรส ซึ่งแสดงกลไกการจับระหว่างอะกาโรสและแอนติบอดีได้ดังนี้



agarose cyanate ester agarose-antibody

งานวิจัยนี้ได้ทำการตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase เข้ากับตัวค้ำ CNBr-activated Sepharose 4 B ซึ่งมีข้อดีคือ การตรึงทำได้สะดวก ใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงในการตรึง แอนติบอดีจะตรึงติดกับตัวค้ำได้แน่นทำให้ประสิทธิภาพในการตรึงสูง และมีรายงานการนำตัวค้ำชนิดนี้ไปใช้อย่างแพร่หลาย เช่น Wilson และคณะ, (1976) ได้ทดลองตรึง Human haemoglobin เข้ากับ CNBr-activated Sepharose 4 B เพื่อใช้ในการแยกแอนติบอดีต่อ human haemoglobin ให้บริสุทธิ์ Eilk และ Noort (1976) ได้ตรึงแอนติบอดีต่อทรานสเฟอรินเข้ากับตัวค้ำชนิดนี้ เพื่อใช้เตรียมทรานสเฟอรินจากหนูให้บริสุทธิ์เป็นต้น

จากเอกสารคำแนะนำของบริษัท Pharmacia (1979) ได้แนะนำให้ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนลิแกนด์ที่จะตรึงเข้ากับ CNBr-activated Sepharose 4 B ปริมาณโปรตีนในช่วง 5-10 มิลลิกรัมต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตร และจากรายงานของ Eveleigh และ Levy(1977) ซึ่งได้ศึกษาการตรึงแอนติบอดีต่ออัลบูมิน เพื่อใช้ในการแยกอัลบูมินให้บริสุทธิ์ พบว่าการตรึงที่ใช้ปริมาณแอนติบอดี 5 มิลลิกรัมต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตรจะทำให้ได้แอนติบอดีคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด การใช้ปริมาณแอนติบอดีที่มากเกินไปในการตรึงจะมีผลเสียหลายประการ เช่น ทำให้การจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนลดลง เนื่องจากการจัดเรียงตัวของแอนติบอดีบนตัวค้ำไม่เป็นระเบียบ ทำให้บดบังบริเวณที่จะจับกับแอนติเจน (antigen binding site) ของแอนติบอดีหรือทำให้การชะแอนติเจนออกจากแอนติบอดีทำได้ยาก นอกจากนั้นการใช้ปริมาณแอนติบอดีในการตรึงสูงยังทำให้เกิดการจับกับโปรตีนอื่น ๆ แบบไม่จำเพาะ (non specific binding) อีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้กำหนดให้ตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์

CGTase ปริมาณโปรตีน 5 มิลลิกรัม ต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตร พบว่าสามารถตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้ติดกับ CNBr-activated Sepharose 4 B ได้ติด 98 เปอร์เซนต์ คิดเป็นปริมาณแอนติบอดี 4.9 มิลลิกรัมต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตร (ตารางที่ 5) ในการคำนวณปริมาณแอนติบอดีที่ตรึงกับตัวค้ำใช้วิธีคำนวณหักลบปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในสารละลายแอนติบอดีหลังจากแยกตัวค้ำออกไปแล้ว ซึ่งเป็นวิธีที่เชื่อถือได้วิธีหนึ่ง และเป็นวิธีที่ใช้ในหลายรายงาน (Stankus และ Leslie , 1976 : Doellgast และ Plaut , 1976) แต่เพื่อยืนยันผลการตรึงแอนติบอดีเข้ากับตัวค้ำนั้น มีวิธีที่ใช้ตรวจสอบอื่นๆ อีก เช่น อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีและแอนติเจนเกิดเป็น antibody-antigen complex ซึ่งมีผลทำให้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ พบว่าสารละลายแอนติบอดีหลังจากแยกตัวค้ำออกไปแล้ว ไม่มีแอนติบอดีหลงเหลืออยู่หรือมีน้อยมาก จึงไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CGTase ได้ (รูปที่ 9) อีกวิธีหนึ่งที่ใช้ติดตามแอนติบอดีซึ่งเป็นโปรตีนโดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอสของแอนติบอดี จะเห็นว่าไม่พบแถบโปรตีนในแผ่นเจล จากตัวอย่างสารละลายแอนติบอดีที่ผ่านการตรึงกับตัวค้ำ แสดงว่าแอนติบอดีส่วนใหญ่ถูกตรึงติดกับตัวค้ำ (รูปที่ 10) นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการทำอิมมูโนดิฟฟิวชัน ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีวิธีหนึ่ง โดยอาศัยการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีในตัวกลางที่เป็นเนื้อวุ้น โดยแอนติเจนและแอนติบอดีจะค่อย ๆ แพร่ (diffuse) ผ่านเนื้อวุ้นเข้าหากัน บริเวณ ตำแหน่งที่มีปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีพอเหมาะ จะเกิดเป็นเส้นตะกอน (precipitin line) ให้เห็นได้ (Hudson และ Hay , 1976) จากรูปที่ 11 จะเห็นว่าไม่พบเส้นตะกอนเกิดขึ้น แสดงว่าในสารละลายแอนติบอดีหลังผ่านการตรึงกับตัวค้ำไม่มีแอนติบอดีหลงเหลืออยู่ จากวิธีการตรวจสอบดังกล่างข้างต้นจึงสรุปได้ว่า ในการตรึงแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้เข้ากับตัวค้ำสามารถตรึงแอนติบอดีได้ติดจริง

การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์

ในการแยกเอนไซม์ CGTase โดยการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ควรพิจารณาได้แก่ปริมาตรและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ดั้งต้นที่จะใส่ลงในแอนติบอดีคอลัมน์ เนื่องจากเทคนิคนี้อาศัยความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจน ถ้าในสารละลายมีโปรตีนอื่นเจือปนอยู่เป็นจำนวนมาก จะทำให้โอกาสในการเลือกจับแอนติเจนของแอนติบอดีลดน้อยลง หรือทำให้เกิดการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีกับโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แอนติเจนที่จะแยก นอกจากนี้ในการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี ต้องให้แอนติบอดีสัมผัสกับแอนติเจนเป็นเวลาระยะหนึ่ง ซึ่งถ้าปริมาตรของสารละลายแอนติเจนมีมากจะทำให้ต้องใช้เวลานาน ทำให้ไม่สะดวกในการทำงาน (Chase,1983) ดังนั้นจึงนำเอนไซม์ CGTase จากน้ำเลี้ยงเชื้อมาผ่านขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนด้วยวิธีการดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้งโดยให้เอนไซม์จับกับแป้งด้วยแรงดูดซับและอาศัยความจำเพาะระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทแป้ง (Pongsawasdi และ Yagisawa , 1988) ผลการทดลองพบว่าเมื่อชะเอนไซม์ออกจากแป้งแล้วและนำไปลดปริมาตรลงโดยใช้ ultrafiltration membrane เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 107 เท่า (ตารางที่ 6)

ในขั้นตอนการนำเอนไซม์ CGTase ที่จะแยกให้บริสุทธิ์ ใส่ลงในแอนติบอดีคอลัมน์เพื่อให้เอนไซม์ CGTase จับกับแอนติบอดี ได้เตรียมเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนให้อยู่ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ตามวิธีของ วรรณรัตน์ คุดดิอาชีวะ (2537) เนื่องจากเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus sp.* A11 ที่ศึกษานี้ มีค่า isoelectric point (pI) อยู่ในช่วง 4.4 ถึง 4.9 (จิราพร โรจน์ทินกร ,2537) ดังนั้น ที่ pH 6.0 เอนไซม์ CGTase จะมีประจุสุทธิเป็นลบ ในขณะที่แอนติบอดีซึ่งมีค่า pI ประมาณ 8-9 (Hudson, 1976) แอนติบอดีจะมีประจุสุทธิเป็นบวก จากสภาวะดังกล่าวนี้ ทำให้เอนไซม์

CGTase และแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase จับกันได้ด้วย electrostatic force ซึ่งเป็นแรงที่เกิดขึ้นเนื่องจากประจุที่แตกต่างกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี(Sell, 1987)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน ให้ประสบผลสำเร็จได้แก่ขั้นตอนการล้างแอนติบอดีคอลัมน์ ในขั้นตอนนี้จะมีผลต่อการทดลอง เช่น ทำให้สามารถเพิ่มหรือลด purification factor ของการแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ การทดลองแยกเอนไซม์ CGTase โดยการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน ได้ทดลองล้างแอนติบอดีคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่เสริมและไม่เสริมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ พบว่าบัฟเฟอร์ที่เสริมโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ สามารถชะโปรตีนอื่น ๆ ที่จับกับแอนติบอดีคอลัมน์อย่างไม่จำเพาะได้ดีกว่าบัฟเฟอร์ที่ไม่ได้เสริมโซเดียมคลอไรด์ โดยตรวจสอบจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่ามีโปรตีนออกมาจากแอนติบอดีคอลัมน์ในระดับที่สามารถวัดได้ ซึ่งโปรตีนพีคนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45,000 ดาลตัน และไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ที่ใช้ทดลองนี้เป็นความเข้มข้นที่สามารถชะโปรตีนอื่น ๆ ออก โดยไม่ทำให้เอนไซม์ CGTase ที่ติดอยู่กับแอนติบอดีคอลัมน์หลุดออก ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับที่ Ehle และ Horn (1990) ได้รายงานไว้ว่าบัฟเฟอร์ที่ใช้ในขั้นตอนการล้างคอลัมน์ที่เสริมเกลือ ความเข้มข้นในช่วง 1 มิลลิโมลาร์ ถึง 3 โมลาร์ สามารถชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์อย่างไม่จำเพาะได้ นอกจากนี้การล้างคอลัมน์ที่ใช้บัฟเฟอร์ปริมาตรมากขึ้น ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้แอนติบอดีคอลัมน์สะอาดขึ้น

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนั้น เกิดจากการใช้แรงจับกันอย่างอ่อน ๆ ซึ่งเป็น non covalent bond แรงเหล่านี้ได้แก่ electrostatic force เป็นแรงที่เกิดขึ้นเนื่องจากประจุที่แตกต่างกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี hydrogen bonding เป็นแรงที่เกิดจากการจับกันระหว่าง hydrophilic group เช่น -OH $-NH_2$ -COOH เป็นต้น hydrophobic force

เป็นแรงที่เกิดจากการรวมตัวกันของสารพวก non polar และแรงแวนเดอร์วาลส์ เป็นแรงระหว่างโมเลกุลที่อยู่ใกล้ชิดกัน (Sell , 1987) นอกเหนือจากแรงดังกล่าวแล้ว ลักษณะโครงสร้างของแอนติเจนและแอนติบอดี ก็มีส่วนสำคัญที่ทำให้การจับมั่นคงยิ่งขึ้น ถ้าโครงสร้างของโมเลกุลของแอนติเจนและแอนติบอดีมีความสอดคล้องกัน (complementary) เช่นในลักษณะของแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key) การจับก็มั่นคง นอกจากนั้นสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ก็มีผลต่อการทำปฏิกิริยากันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เช่น pH อุณหภูมิ ionic strength เป็นต้น (Sell , 1987)

ในขั้นตอนการชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ สามารถทำได้โดยการปรับสภาวะแวดล้อมให้แอนติบอดีไม่สามารถจับกันเอนไซม์ได้ดี หรือทำลายแรงที่ใช้ยึดแอนติบอดีและเอนไซม์เข้าไว้ด้วยกัน เช่นด้วยการปรับ pH อุณหภูมิ ionic strength โดยใช้สารต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่อแรงที่ใช้ยึดแอนติบอดีและแอนติเจน เช่น แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ยูเรีย โซเดียมไธโอไซยาเนต ไดออกเซน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีผู้รายงานไว้ว่าสามารถใช้เป็นสารชะในการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนได้ (Melchers และ Messer , 1970 : Zoller และ Matzku , 1976 : Andersson และคณะ , 1979) ขั้นตอนแรกของการศึกษาการชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดี ได้ทดสอบผลของสารต่างๆดังกล่าวข้างต้นต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase พบว่าสารส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ยกเว้น โซเดียมไธโอไซยาเนต (ตารางที่ 7) จากนั้นจึงได้ทดลองใช้สารเหล่านี้มาเป็นสารชะ เพื่อใช้แยกเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ จากการทดลองชะเอนไซม์ CGTase โดยเริ่มจากการปรับ pH ของระบบให้สูงขึ้น ด้วยการใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ pH 10.5 เป็นสารชะ ด้วยอัตราการชะ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ 29 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ 1 และ 10) ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าเนื่องจากค่า pI ของเอนไซม์ CGTase

จาก *Bacillus sp.* A 11 อยู่ในช่วง 4.4-4.9 และค่า pI ของแอนติบอดีมีค่าประมาณ 8-9 ดังนั้น ที่ pH 10.5 จะทำให้ทั้งเอนไซม์ CGTase และแอนติบอดีมีประจุสุทธิเป็นลบ จึงทำให้เกิดแรงผลักซึ่งกันและกัน มีผลทำให้เอนไซม์ CGTase คลายตัวออกจากแอนติบอดีได้ จากนั้นได้ทดลองใช้สารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เช่น ยูเรีย โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มียูเรีย 4 โมลาร์ เป็นสารชะ ด้วยอัตราการชะ 0.5 มิลลิลิตร ต่อนาที พบว่าไม่สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้ (ภาคผนวกที่ 4 และ 10) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก สารที่ใช้คือยูเรียไม่สามารถเปลี่ยนแปลงโครงรูปของ antibody-antigen complex ได้ นอกจากนี้แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นชนิดโพลีโคลนัลแอนติบอดี ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถจับกับโมเลกุลของแอนติเจนได้หลายตำแหน่ง (Harlow และ Lane, 1988) จึงทำให้การจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนเป็นไปอย่างแน่นหนา

จากการทดลองชะเอนไซม์ CGTase ด้วยการใช้โซเดียมไธโอไซยาเนต ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดความไม่เป็นระเบียบ (chaotropic ions) โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ เป็นสารชะ ด้วยอัตราการชะ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ได้เช่นกัน โดยมีค่า enzyme yield 11 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ 9 และ 10) ในการทดลองใช้ ไดออกเซน ซึ่งเป็นสารประเภท polarity reducing agent โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มีไดออกเซน 10 เปอร์เซนต์ เป็นสารชะ ด้วยอัตราการชะ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่า ไม่สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีได้ (ภาคผนวกที่ 6 และ 10) ผลที่ได้นี้อาจวิเคราะห์ได้ว่า แรงส่วนหนึ่งที่ใช้ยึดเอนไซม์ CGTase และแอนติบอดีไว้ด้วยกันเป็นแรง hydrophobic force

จากงานวิจัยของ Bibi (1989) ซึ่งได้ศึกษาการเตรียมเอนไซม์ TEM 1 β-lactamase โดยการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน พบว่าสามารถใช้สับสเตรทของเอนไซม์ ได้แก่ benzylpenicillin และ cloxacillin เป็นสารชะ พบว่าสามารถชะเอนไซม์ให้ออกจากแอนติบอดีได้ ดังนั้นในการแยกเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีที่ศึกษานี้ จึงได้ทดลองใช้ เบต้าไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ CGTase มาเป็นสารชะ โดยใช้สารละลายอะซิเดทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่มีเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน 1 เปอร์เซนต์ พบว่าไม่สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีได้ (ภาคผนวกที่ 8 และ 10) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะบริเวณของเอนไซม์ CGTase (epitope) ที่จับกับแอนติบอดีไม่ใช่บริเวณของเอนไซม์ที่จะจับกับสับสเตรท (active site) ไซโคลเดกซ์ทรินจึงไม่สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีได้ ผลที่ได้นี้ไม่เหมือนกับงานวิจัยของ Bibi (1989) ซึ่งสามารถใช้สับสเตรทของเอนไซม์เป็นสารชะได้ เนื่องจากปัจจัยหลาย ๆ อย่างที่แตกต่างกัน เช่น ชนิดของแอนติบอดีที่ใช้เป็นชนิดโมโนโคลนัลแอนติบอดี ซึ่งจะจับแอนติเจนในบริเวณที่แน่นอนเพียงตำแหน่งเดียว การชะจึงทำได้ง่ายกว่า และอัตราการชะที่ใช้ก็แตกต่างกัน

อัตราการชะ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการแยกเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดี โดยจากการทดลองพบว่าการลดอัตราการชะให้ช้าลง สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีได้มากกว่า การใช้อัตราชะที่เร็ว จากการเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์เป็นสารชะ พบว่า การใช้อัตราการชะ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถชะเอนไซม์ให้ออกจากแอนติบอดีได้ 51 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก 3 และ 10) ในขณะที่การใช้อัตราการชะ 0.1มิลลิลิตรต่อนาที สามารถชะเอนไซม์ให้ออกจากแอนติบอดีได้ถึง 90 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 12) ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่า การใช้อัตราการชะที่ช้ากว่าทำให้ สารชะมีโอกาสสัมผัสกับเอนไซม์

และแอนติบอดีในคอลัมน์ได้นานพอที่จะแยกเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีได้ดีกว่าการใช้อัตราการชะที่เร็ว

นอกจากนี้อุณหภูมิก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญ ที่มีผลต่อการชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดี จากการทดลองที่ได้ทำการแยกเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีโดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ pH 10.5 เป็นสารชะ ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อเปรียบเทียบผลการชะ พบว่าการทดลองที่ทำที่อุณหภูมิห้องสามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีได้ (ภาคผนวก 1 และ 10) ในขณะที่อุณหภูมิ 4 °ซ ไม่สามารถชะเอนไซม์ให้ออกจากแอนติบอดีได้ (ภาคผนวก 2 และ 10) ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับที่ Frankel (1980) ได้รายงานไว้ว่าค่าคงที่ของการแยกตัวของแอนติเจนและแอนติบอดี (Kd) จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ถ้าเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจาก 4 °ซ เป็น 43 °ซ ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นในขั้นตอนการชะ สามารถทำให้เอนไซม์ CGTase แยกออกจากแอนติบอดีได้ง่ายขึ้น ในทำนองกลับกันในขั้นตอนการใส่เอนไซม์ CGTase ลงในคอลัมน์เพื่อให้เอนไซม์จับกับแอนติบอดีได้ดี ควรจะทำการทดลองที่อุณหภูมิต่ำๆ

หลังจากศึกษาการชะเอนไซม์ CGTase โดยการใช้สารเพียงชนิดเดียวในการชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากแอนติบอดีคอลัมน์ การศึกษาการชะเอนไซม์ CGTase ขั้นต่อมาได้ทดลองใช้สารหลายชนิดร่วมกันในการชะ เช่นใช้การปรับ pH ของระบบให้สูงขึ้นร่วมกับการใช้สารที่ทำให้เกิดความไม่เป็นระเบียบ (โซเดียมไธโอไซยาเนต) การใช้ร่วมกับสารที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (ยูเรีย) หรือการใช้ร่วมกับสารประเภท polarity reducing agent (ไดออกเซน) พบว่าการใช้สารหลายชนิดร่วมกัน สามารถชะเอนไซม์ CGTase ให้ออกจากคอลัมน์ได้ดีกว่าการใช้สารเพียงชนิดเดียว เช่น ในการใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์เป็นสารชะ พบว่าสามารถชะเอนไซม์ได้ 51 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก 3 และ 10) เพิ่มขึ้นจากเดิมที่ชะด้วยโซเดียม

ไซโอไซยาเนตเพียงอย่างเดียว สามารถชะเอนไซม์ได้เพียง 11 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวกที่ 9 และ 10) ในกรณี อื่น ๆ ก็ได้ผลการทดลองทำนองเดียวกัน สรุปได้ว่าสารชะที่ดีที่สุดในงานวิจัยนี้คือสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ ถึงแม้ว่าโซเดียมไซโอไซยาเนตจะมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase (ตารางที่ 7) แต่ในการทำโครมาโทกราฟี ได้นำ fractions ที่ออกจากคอลัมน์ในขั้นตอนการชะไปไดอะไลซ์ทันทีซึ่งเป็นการลดช่วงเวลาที่เอนไซม์จะอยู่ในสารละลายโซเดียมไซโอไซยาเนต

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในรูปที่ 13 ซึ่งได้ทดลองขยายขนาดของแอนติบอดีคอลัมน์ให้เพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า (ปริมาตรเจล 5 มิลลิลิตร) แล้วทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนเพื่อแยกเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ โดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ pH 10.5 ที่มีโซเดียมไซโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์ ซึ่งพบว่าเป็นสารชะที่ดีที่สุด (รูปที่ 12) เป็นสารชะ และใช้สภาวะอื่น ๆ ในการชะเหมือนกับการชะคอลัมน์เล็ก พบว่าได้รูปแบบการแยกเหมือนกับในคอลัมน์เล็ก โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น (155 เท่า) แต่ค่า enzyme yield ต่ำกว่าในคอลัมน์เล็ก คือได้เพียง 45 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก คอลัมน์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้ต้องใช้ปริมาตรของสารชะเพิ่มขึ้นตามขนาดคอลัมน์ แต่อัตราการชะที่กำหนดไว้ให้เท่ากันทั้งในคอลัมน์เล็กและใหญ่ ดังนั้นในคอลัมน์ใหญ่จึงต้องใช้เวลาในการชะมากกว่าในคอลัมน์เล็ก ทำให้เอนไซม์ต้องอยู่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน และจากการทดสอบสารที่ใช้ชะ พบว่าโซเดียมไซโอไซยาเนตมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase การสัมผัสกับเอนไซม์ของโซเดียมไซโอไซยาเนตในคอลัมน์นานขึ้น อาจมีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งมีผลต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ได้

ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ CGTase ที่แยกได้จากแอนติบอดีคอลัมน์โดยการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ พบว่าจะพบแถบ

โปรตีน 2 แถบในแผ่นเจล จากตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการชะแอนติบอดีคอลัมน์ (โปรตีนพีค 2) โดยแถบบนมีความเข้มมากกว่าอีกแถบหนึ่งที่อยู่ติดกัน (รูปที่ 14, lane 4 และรูปที่ 15 lane 3) และจากการย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายไอโอดีนและฟีนอลซาลีนเพื่อติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase ในแผ่นเจล พบว่าจะเห็นแถบโปรตีน 2 แถบดังกล่าวเช่นกัน (รูปที่ 16 และ 17) ผลการทดลองที่ได้นี้ได้ผลเหมือนกับงานวิจัยของ จิราพร โรจน์ทินกร (2537) เนื่องจากในขั้นตอนการทดลองกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี ได้ใช้แอนติเจนคือเอนไซม์ CGTase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี chromatofocusing ซึ่งรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ จะได้แถบโปรตีน 2 แถบ และในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซีสแบบเอสดีเอส (รูปที่ 18) ก็เห็นแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72,000 ดาลตันเช่นเดียวกัน แสดงว่าเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้จากการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนมีความบริสุทธิ์สูง การทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์ด้วยการใช้โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนนี้ยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อน เท่าที่ผ่านมามีผู้ใช้โครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพในการทำเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus macerans* ให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ α - cyclodextrin Sepharose 6 B และใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 ที่มีแอลฟาไซโคลเดกซ์ทริน เป็นสารชะพบว่าได้ค่า enzyme yield 90 - 92 เปอร์เซนต์ และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 113 เท่า (Laszlo, 1981) และจากงานวิจัยของ Villette และคณะ, (1991) ได้ ศึกษาการทำเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Bacillus circulan* E 192 ให้บริสุทธิ์โดยใช้ epichlorhydrin - reticulated CD copolymer คอลัมน์ และใช้สารละลาย 1 เปอร์เซนต์ เบต้า ไซโคลเดกซ์ทรินในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ และ 0.02 เปอร์เซนต์ โซเดียมเอไซด์เป็นสารชะ พบว่าได้ค่า enzyme yield 70 เปอร์เซนต์ และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 40 เท่า

จากรายงานการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก *Bacillus sp.*A11 ให้บริสุทธิ์ โดย วัลยา เดชชัยกุล (2534) ในการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ ได้ใช้วิธีต่างๆ เช่นการดูดซับเอนไซม์ด้วยแป้ง การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ ion exchange chromatography, gel filtration พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีค่า enzyme yield 18 เปอร์เซนต์ เอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 59 เท่า และจากงานวิจัยของจิราพร โรจน์ทินกร (2537) ซึ่งได้ศึกษาการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกับงานวิจัยของวัลยา เดชชัยกุล (2534) แต่ในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์ได้ผ่านคอลัมน์ chromatofocusing พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีค่า enzyme yield 28 เปอร์เซนต์ เอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 30 เท่า ส่วนงานวิจัยนี้ได้เตรียมเอนไซม์ CGTase โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีค่า enzyme yield 45 เปอร์เซนต์ และเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 155 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อนำซีรั่มจากเลือดของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส จาก *Bacillus sp.* A11 มาแยกแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase จะตกตะกอนออกจากโปรตีนตัวอื่น ๆ ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 45 เปอร์เซนต์

2. ในการทำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ด้วยการทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนด้วย DEAE-cellulose พบว่าที่ pH 6.5 แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ไม่จับกับ DEAE-cellulose เรซิน และอยู่ในส่วนสารละลายโดยมีค่าไดเตอร์เท่ากับ 1:2[8]

3. แอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์สูง จากการตรวจสอบโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส พบแถบโปรตีน 2 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 55,000 และ 25,000 ดาลตัน ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโมเลกุลแอนติบอดี

4. เมื่อนำแอนติบอดีต่อเอนไซม์ CGTase ไปทดลองตรึงเข้ากับตัวค้ำได้แก่ CNBr-activated Sepharose 4 B พบว่าสามารถตรึงได้ติด 98 เปอร์เซนต์ คิดเป็นปริมาณแอนติบอดี 4.9 มิลลิกรัมต่อตัวค้ำ 1 มิลลิลิตร

5. สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์โดยการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโนคือ การใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 50 มิลลิโมลาร์, pH 10.5 ที่มีโซเดียมไธโอไซยาเนต 3.5 โมลาร์เป็นสารชะ ด้วยอัตราการไหล 0.1 มิลลิลิตรต่อนาที และขั้นตอนการชะทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 155 เท่า และมีค่า enzyme yield 45 เปอร์เซนต์

6. เอนไซม์ CGTase ที่เตรียมได้จากการทำโครมาโทกราฟีแบบสัมพรรคภาพอิมมูโน มีความบริสุทธิ์สูง จากการตรวจสอบโดยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส พบแถบโปรตีนแถบเดียวที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72,000 ดาลตัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย