

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ลักษณะโครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสไอโซไซม์

จาก *Bacillus circulans* A11

โดย

รศ.ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และ ผศ.ดร.ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์

สถาบันนวัตยบริการ

มิถุนายน 2545

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัย ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการสนับสนุน  
ทุนวิจัย ขอขอบคุณ ศ.ดร.มรว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์ และ ดร.จันทรกานต์ พิภพมงคล แห่งสถาบัน-  
วิจัยจุฬาภรณ์ ในการให้คำปรึกษาแนะนำและความช่วยเหลือด้านเทคนิคและเครื่องมือ และ  
ขอบคุณน.ส.จารุณี ควรพิบูลย์ น.ส.วรรณภา วงศ์แสงวัฒนา และน.ส.วนิดา ประสงค์ สำหรับ  
การทำงานในฐานะผู้ช่วยวิจัยที่มีประสิทธิภาพสูง

ผู้วิจัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย	ลักษณะโครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส ไอโซไซม์จาก <i>Bacillus circulans</i> A11
ชื่อผู้วิจัย	รศ.ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และ ผศ.ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	3 มิถุนายน 2545

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) ไอโซไซม์ จาก *Bacillus circulans* A11 โดยวิเคราะห์บริเวณเร่ง ตรวจสอบกรดอะมิโน และเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ รวมทั้งการศึกษาผลของไกลโคซิเลชันต่อแอกติวิตีและโครงสร้างของไอโซไซม์ เพื่อนำข้อมูลมาประกอบการวิเคราะห์การเกิดหลายรูปแบบของเอนไซม์ ในขั้นตอนแรกได้ทำการแยกไอโซไซม์ทั้ง 4 ของ CGTase ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ preparative แล้วบ่มแต่ละไอโซไซม์ด้วยสารเคมีที่จำเพาะต่อหมู่ฟังก์ชันเพื่อตัดแปรรดอะมิโน และใช้เทคนิคการป้องกันบริเวณเร่งด้วยสับสเตรทเมทิล-บีต้าไซโคลเดกซ์ทรินก่อนการตัดแปร ผลการทดลองพบว่า กรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่ง และมีความสำคัญต่อแอกติวิตีของ CGTase ไอโซไซม์ทั้ง 4 ได้แก่ ทรีปโตเฟน ฮิสติดีน ไทโรซีน และกรดอะมิโนในกลุ่มคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ ไอโซไซม์ 2 และ 4 ยังมีเซรีน และไอโซไซม์ 3 ยังมีไลซีนอยู่ในบริเวณเร่งอีกด้วย ในการตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N รวมทั้งกรดอะมิโนและเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของทุกไอโซไซม์เหมือนกัน คือใน 5 ตำแหน่งแรกเป็น APDTS ซึ่งเหมือนกับในเอนไซม์ CGTase ก่อนแยกไอโซไซม์ ในส่วนขององค์ประกอบกรดอะมิโนของทุกไอโซไซม์ก็ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน และเมื่อวิเคราะห์เพปไทด์ที่เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินด้วยคอลัมน์  $C_{18}$ -HPLC แบบ reverse phase ได้ผลว่า จำนวนและชนิดของเพปไทด์ (ที่แยกโดยความแตกต่างของโพลาไรตี) ของทุกไอโซไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อศึกษาผลของไกลโคซิเลชันต่อไอโซไซม์โดยการทำให้ deglycosylation ด้วยเอนไซม์ Endo H และ PNGase F และด้วยสารเคมี trifluoromethanesulfonic acid สรุปได้ว่า deglycosylation ไม่มีผลต่อขนาดและประจุสุทธิของทุกไอโซไซม์ แต่มีผลต่อแอกติวิตีของไอโซไซม์ 3 และ 4 เล็กน้อย จากการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในไอโซไซม์ด้วยคอลัมน์  $C_4$ -HPLC พบว่า ทุกไอโซไซม์ประกอบด้วยพีคหลัก 2 พีค ที่มีอัตราส่วนต่างกัน จากข้อมูลที่ได้ อาจสรุปได้ว่า หลายรูปแบบของ CGTase เกิดจากโปรตีนชนิดเดียวที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังการถอดรหัสและแปรรหัสจากยีน

**Project Title** STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF ISOZYMES OF  
CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM  
BACILLUS CIRCULANS A11

**Name of the Investigators** Dr.PIAMSOOK PONGSAWASDI AND Dr. TIPAPORN LIMPASENI

**Year** 2002

### Abstract

The aim of this work was to characterize the structure of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) isozymes from Bacillus circulans A11. Active site, amino acid and peptide composition, and effect of glycosylation on activity and structure of isozymes were studied. The information obtained was used to analyze the formation of multiple forms of the enzyme. In the first step, isolation of four CGTase isozymes by preparative gel electrophoresis was carried out. Each isozyme was then incubated with group-specific reagents which chemically modified certain amino acids, and substrate protection using methyl- $\beta$ -cyclodextrin prior to modification was also performed. It was found that amino acids localized in the active site and were essential for activity of all isozymes were tryptophan, histidine, tyrosine, and carboxylic amino acids. In addition to these residues, serine in isozymes 2 and 4 and lysine in isozyme 3 were also protected by the substrate suggesting their presence at the active site. For determination of N-terminal residues, amino acid and peptide composition, the result showed that N-terminus of all isozymes were APDTS which were the same as those in unfractionated enzyme. While amino acid composition of all isozymes was similar. When peptides from tryptic digestion were analyzed by reverse phase  $C_{18}$ -HPLC, the number and type of peptides (separated by polarity difference) from all isozymes were not different. For the effect of glycosylation on CGTase isozymes, enzymatic deglycosylation by the enzyme Endo H and PNGase F and chemical deglycosylation by trifluoromethanesulfonic acid were performed. It was found that deglycosylation had no effect on the size and net charge of all isozymes but exerted some effect on activity of isozymes 3 and 4. Analysis of each isozyme by reverse phase  $C_4$ -HPLC column showed that they were composed of two main protein peaks with different ratios. The overall data suggests that multiple forms of CGTase was the result of post-translational modification of the transcribed and translated form of the enzyme.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	viii
บทนำ	1
การสำรวจการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีการวิจัย	14
ผลการวิจัย	20
การอภิปรายผล	60
ข้อสรุป	73
ข้อเสนอแนะ	73
เอกสารอ้างอิง	75
ภาคผนวก	79

สถาบันวิทย์บริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า
1. Properties of cyclodextrins	4
2. Industrial applications of cyclodextrin	6
3. Properties of cyclodextrin glycosyltransferase	9
4. Summary of amino acid residues involved in the active sites of CGTase	11
5. Multiple forms of CGTases	12
6. Purification of CGTase from <u>Bacillus circulans</u> A11	21
7. Effect of various group-specific reagents on the activity of CGTase isozymes	27
8. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activity of CGTase isozyme 3 by TNBS	28
9. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes 2 and 4 by PMSF	30
10. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes by EDC	31
11. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes by NAI	32
12. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes by NBS	34
13. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes by DEP	35
14. Dextrinizing activity of CGTase after deglycosylation by Endo H	37
15. Dextrinizing activity of CGTase after deglycosylation by PNGase F	37
16. Summarization of notable peptide peaks from digested products of CGTase isozymes	57
17. N-terminal amino acid residues of CGTase isozymes	59

18. Ratio of major peaks from analysis of CGTase isozymes	69
19. Amino acid composition of CGTase isozymes	71



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. Structure and molecular dimension of cyclodextrins	3
2. Beneficial modification of guest molecules by cyclodextrin	5
3. Non-denaturing PAGE of CGTase from different steps of purification	22
4. Elution profile of CGTase isozymes from preparative gel electrophoresis	23
5. Non-denaturing PAGE pattern of every 5 fractions of CGTase isozymes	24
6. Non-denaturing PAGE of the enzyme bands 1 to 5 obtained from preparative gel electrophoresis	25
7. Native PAGE of CGTase treated with 100 mU/ml Endo H	38
8. SDS-PAGE of CGTase treated with 100 mU/ml Endo H	39
9. SDS-PAGE of invertase treated with Endo H	40
10. Native PAGE of ovalbumin treated with Endo H	41
11. SDS-PAGE of ovalbumin treated with Endo H	43
12. Native PAGE of human-transferrin and CGTase (PE) treated with PNGase F	44
13. SDS-PAGE of human-transferrin and CGTase (PE) treated with PNGase F	45
14. Native PAGE of human-transferrin and CGTase isozymes treated with PNGase F	46
15. SDS-PAGE of human-transferrin and CGTase isozymes treated with PNGase F	47
16. SDS-PAGE of CGTase treated with TFMS	48
17. SDS-PAGE of royal jelly protein treated with TFMS	50
18. Decrease in carbohydrate content in proteins after incubation with TFMS for different time period	51
19. HPLC chromatograms from reverse phase C <sub>18</sub> column of the peptides of CGTase isozymes resulting from digestion with trypsin	53
20. Action of Endo H and PNGase F	63
21. HPLC chromatograms from reverse phase C <sub>4</sub> column of protein constituents in CGTase isozymes	66



## บทนำ

ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, 2.4.1.19) เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสับสเตรทแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นที่เป็น  $\alpha$ -1,4 glucans ให้เป็นไซโคลเดกซ์ทริน (CD) (1) ซึ่งถือเป็นผลิตภัณฑ์แบ่งแปรรูปที่มีศักยภาพการใช้งานกว้างขวางมาก โดยโครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินเป็นโอลิโกเมอร์ของกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 ไกลโคซิดิก มีหน่วยกลูโคส 6,7 และ 8 หน่วย มีชื่อเรียกว่า  $\alpha$ -,  $\beta$ - และ  $\gamma$ -CD ตามลำดับ (รูปที่ 1) (2) CD ทั้ง 3 ชนิด มีขนาดและสมบัติต่างกันดังตารางที่ 1 โครงสร้างโมเลกุลของ CD มีลักษณะค่อนข้างไฮโดรโฟบิก จึงสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์ (guest) ที่มีขนาดและสมบัติเหมาะสม (รูปที่ 2) (3) ยังผลให้สมบัติทางเคมีและหรือทางกายภาพของสาร guest เปลี่ยนไป เช่น สารละลายได้ดีขึ้น หรือมีความเสถียรขึ้น (1) นอกจากนี้ CD ทั้ง 3 ชนิดซึ่งถือว่าเป็นรูปแบบธรรมชาติแล้ว ปัจจุบันมีอนุพันธ์ของ CD ที่เกิดจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีหรือการใช้เอนไซม์หลายชนิดทำให้ CD มีสมบัติแตกต่างออกไป เช่น มีโพลาริตีเพิ่มขึ้นหรือน้อยลง หรือมีประจุซึ่งเกิดจากการแทนที่กลุ่มไฮดรอกซิลใน CD ด้วยกลุ่ม เมทิล เอทิล ไฮดรอกซิโพรพิล ไกลโคซิล หรือ ซัลโฟนิล เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีพอลิเมอร์ของ CD ถูกสังเคราะห์ขึ้น (4) ทำให้มีชนิดของ CD ให้เลือกใช้ตามความเหมาะสมต่อ guest ได้มากขึ้น

จากคุณลักษณะการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ CD นี้เอง ที่ทำให้มีการนำ CD มาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้เป็นสาร solubilizer ช่วยเพิ่มความสามารถ การละลายของยา เป็นสาร stabilizer ช่วยรักษาสภาพสารที่มี รส กลิ่น สี ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง หรือเป็น emulsifier ทำให้เกิดอิมัลชันของสารพวกสเตียรอยด์ ไฮโดรคาร์บอน น้ำมัน ไขมัน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ CD เป็นตัวกำจัดสารที่ไม่ต้องการ เช่น กำจัดโคเลสเตอรอลจากไข่แดง หรือกำจัดสารพิษจากระบบสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (1) ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างการประยุกต์ใช้ CD ในอุตสาหกรรมต่างๆ

จากคุณประโยชน์ของ CD และการเพิ่มคุณค่าของผลผลิตจากภาคเกษตรกรรมที่สำคัญของประเทศไทย อันได้แก่ ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง โดยการใช้กระบวนการแปรรูปเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น กลุ่มผู้วิจัยในภาควิชาชีวเคมีได้คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ในปริมาณสูง คือ *B. circulans* A11 (5) และได้วิจัยเพื่อทราบลักษณะและการทำงานของเอนไซม์ในเบื้องต้นและพัฒนาการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในการแปรรูปแป้งให้มีประสิทธิภาพ (6-11) งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาเอนไซม์ในระดับลึกยิ่งขึ้น คือในระดับไอโซไซม์เพื่อทราบลักษณะโครงสร้างและการทำงานที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ใน

วัตถุประสงค์ที่ต่างกันได้กว้างขวางยิ่งขึ้น และเป็นข้อมูลในการปรับปรุงเอนไซม์ให้มีสมบัติดีขึ้นหรือมีสมบัติตามต้องการต่อไป

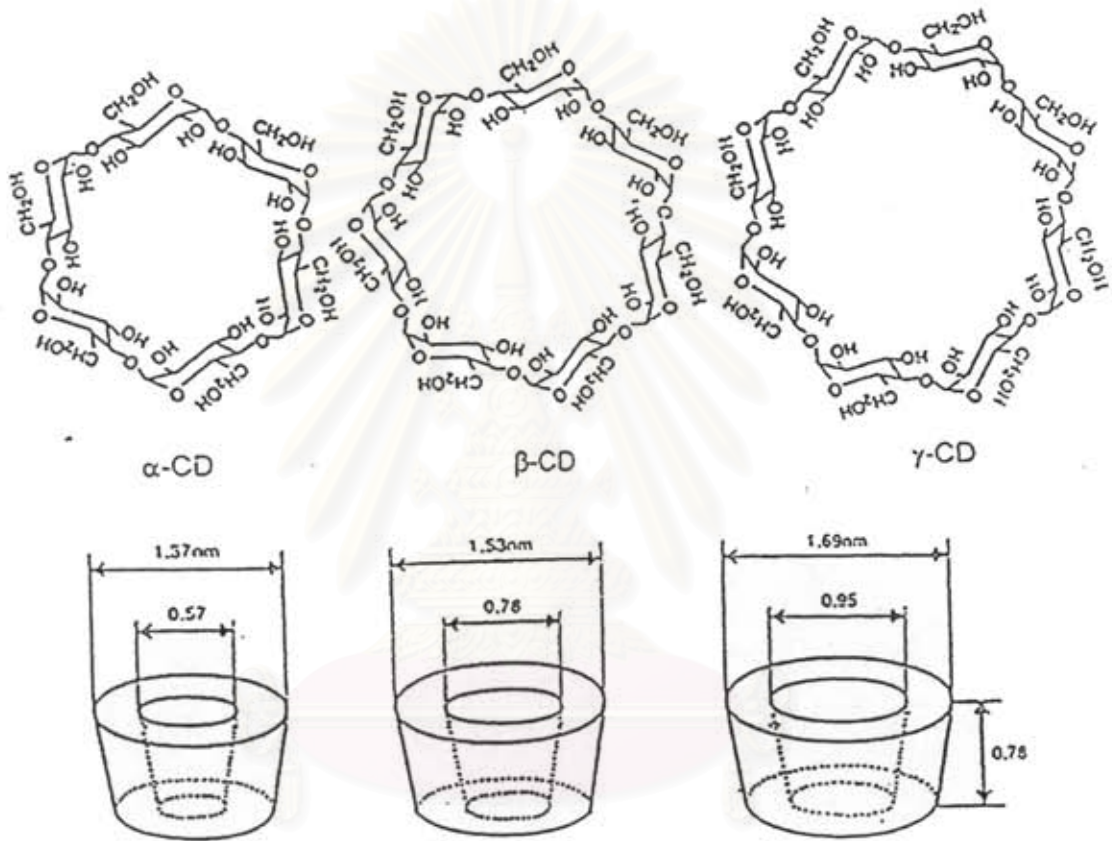
#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษาลักษณะโครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสไอโซไซม์จาก *Bacillus circulans* A11 ดังนี้

1. วิเคราะห์บริเวณเร่งของไอโซไซม์
2. ตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของไอโซไซม์
3. วิเคราะห์ผลของไกลโคซิเลชันต่อแอกติวิตีและโครงสร้างของไอโซไซม์
4. ตรวจสอบเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของไอโซไซม์



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

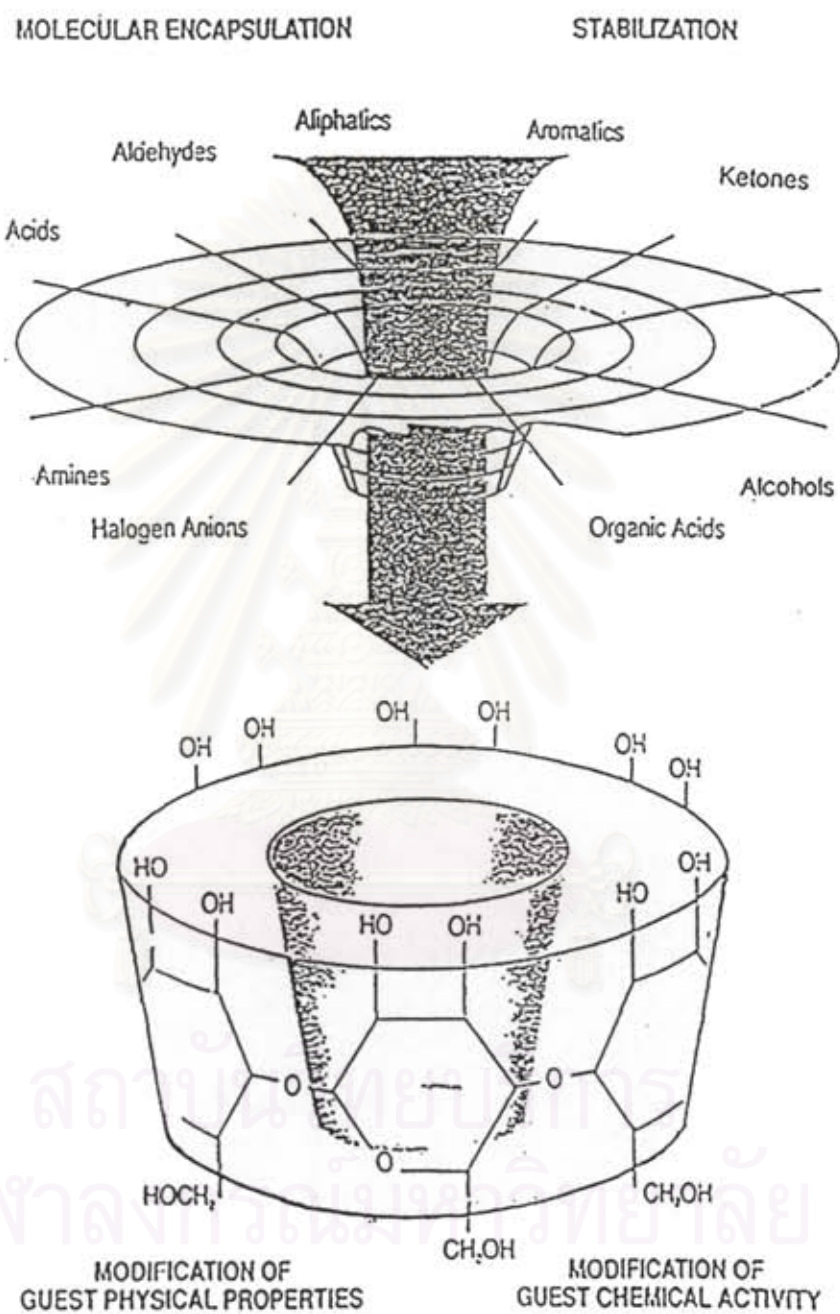
รูปที่ 1 Structure and molecular dimension of cyclodextrins (2)

ตารางที่ 1 Properties of cyclodextrins (1)

Properties	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Number of glucose unit	6	7	8
Molecular weight	973	1135	1297
Cavity diameter, A <sup>o</sup>	5-6	7-8	9-10
Cavity depth, A <sup>o</sup>	7-8	7-8	7-8
Crystal form (water)	Needle	Prism	Prism
Solubility, g/100ml H <sub>2</sub> O, 25 °C	14.5	1.85	23.2



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 Beneficial modification of guest molecules by cyclodextrin (3)

ตารางที่ 2 Industrial applications of cyclodextrins (1 )

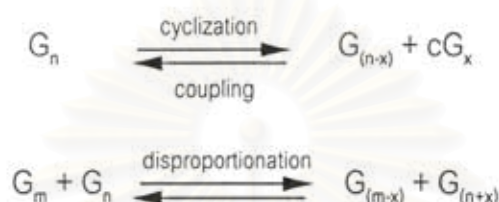
Use	Guest compounds and end products
<u>Foods</u>	
1) Emulsification	Eggless mayonnaise, seasoning oil, Whipping cream, etc.
2) Increase of foaming power	Egg white (freeze-dry), hotcake-mix, Cake-mix, etc.
3) Stabilization of flavors and seasonings	Chewing gum flavor, biscuit flavor, Powdered seasoning, instant noodles, Seasoning paste, etc.
4) Taste masking	Meat paste
5) Reduction of hygroscopicity	Powder flavour products
6) Elimination of unpleasant tastes	Juice, milk, casein, ginseng, propylene glycol
7) Elimination of cholesterol	Egg yolk, milk, butter
8) Reduction of odour	Mutton, fish, soybean
<u>Cosmetics and toiletries</u>	
1) Color masking and control	Fluorescein, bath agents
2) Stabilization of fragrances	Menthol
3) Stabilization	Chalcone, dihydrochalcone (toothpaste), Perfume
4) Preventing inflammation of skin	Skin lotion, sun block cream
5) Deodorant	Mouth wash, in refrigerator
6) Reduction of irritation	Shampoo, cream, skin powder
7) Enhancement of attained concentration	Skin moisturizing lotion
8) Defoaming effect	Laundry liquid

ตารางที่ 2 Industrial applications of cyclodextrins (ต่อ)

Use	Guest compounds and end products
<u>Pharmaceuticals</u>	
1) Increase of solubility	Prostaglandin, phenobarbital, chloramphenicol
2) Taste masking	Prostaglandin
3) Powdering (nonvolatile)	Nitroglycerin, clofibrate
4) Stabilization (UV, thermal)	Prostaglandin, vitamins
5) Decrease of irritation	Cu-alcanolamine complex
6) Enhancement bioavailability	Barbiturate, flufenamic acid, digoxin
7) Reduction of systemic toxicity	2-amino, 4-methyl-phosphonobutyric acid
<u>Agriculture</u>	
1) Stabilization of volatility	Tobacco aroma
2) Stabilization of nutrient	Animal-feed
3) Improvement of palatability	Bone-powder, microbial cell-mass
<u>Pesticides</u>	
1) Stabilization (UV, thermal)	Pyrethrins, pyrethroids, isoprenoid
2) Powdering (non-volatile)	DDVP and other phosphorous pesticides
<u>Chemical technology</u>	
Catalyzation for reaction	Products of hydrolysis, substitution, Diels-Alder reaction, stereospecific reaction, etc.
<u>Plastics</u>	
Stabilization of colors and flavors	Colors, flavors
<u>Others</u>	Adhesives

## การสำรวจการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ CGTase สร้าง CD โดยการย่อยสลายแป้งด้วยกลไกการเร่งปฏิกิริยา 3 แบบ คือ ปฏิกิริยา cyclization, coupling และ disproportionation (1) ดังสมการ



ในเมื่อ  $G_n$  และ  $G_m$  คือ 1,4- $\alpha$ -D-glucopyranosyl chains ที่มี  $n$  และ  $m$  หน่วยกลูโคซิล  
 $x$  คือ ส่วนของ 1,4- $\alpha$ -D-glucopyranosyl chains  
 และ  $cG_x$  คือ ไซโคลเดกซ์ทริน

เอนไซม์ CGTase แตกต่างจากเอนไซม์ย่อยแป้งอื่นๆ ตรงที่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเป็นวง (cyclic) และมีสมบัติ non-reducing โดยที่ปฏิกิริยา cyclization จะเกิดได้ดีเมื่อสับสเตรทมีความยาวในช่วง 16-80 หน่วยกลูโคซิล ขณะที่ปฏิกิริยาย้อนกลับคือ coupling ใช้กลูโคซิลสายสั้นกว่าคือ 5-14 หน่วยและปฏิกิริยาโยกย้ายหมู่กลูโคซิล คือ disproportionation เกิดได้ดีกับโพลีแซคคาไรด์ที่มีความยาวมากกว่า 100 หน่วยกลูโคซิล (12) ดังนั้นความยาวของสับสเตรทจึงเป็นตัวกำหนดลำดับในการผลิต CD

เอนไซม์ CGTase เป็น extracellular enzyme สร้างโดยแบคทีเรียหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มจีสบาซิลลัส ได้แก่ *B. macerans* (13) และ Alkalophilic *Bacillus* sp. (14) นอกจากนี้ยังพบใน *K. pneumoniae* (15) (ตารางที่ 3) แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกัน (13-22) ผลิต CGTase ที่มีสมบัติต่างกัน (1) ที่สำคัญคือ อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์  $\alpha : \beta : \gamma$ -CD ต่างกัน เช่น *B. macerans* และ Alkalophilic *Bacillus* sp. 38 - 2 ให้อัตราส่วนของ  $\alpha : \beta : \gamma$ -CD เป็น 2.7:1:1 และ 1:11.5:1.5 ตามลำดับ (13-14) และ *B. Fermus* 290 - 3 ผลิต  $\gamma$ -CD มากในช่วงต้นของการผลิต (17) ซึ่ง CD แต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสาร guest ได้ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจาก ขนาดโพรงกลางโมเลกุลของ CD ต่างกันนั่นเอง

มีรายงานการแยกเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ และการทำให้บริสุทธิ์ด้วย



ตารางที่ 3 Properties of cyclodextrin glycosyltransferase (13-22)

Organism	Predominant Product	Optimum pH	Optimum Temperature (°C)	MW (dalton)	pI	Reference
<i>Alkalophilic Bacillus</i> 17-1	$\beta$ -CD	6.0	ND	74,000	ND	Yamamoto <i>et al.</i> , 1972
<i>Bacillus fermus</i> 290-3	$\gamma$ -CD	6.0-8.0	50	75,000	4.1	Englbrecht <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus macerans</i> IFO 3490	$\alpha$ -CD	5.0-5.7	55	5,000	4.6	Kitahata <i>et al.</i> , 1974
<i>Bacillus macerans</i> IAM 1243	$\alpha$ -CD	5.5-7.5	60	145,000	ND	Kobayashi <i>et al.</i> , 1978
<i>Bacillus macerans</i> ATCC 8514	$\alpha$ -CD	6.2	ND	139,000	ND	Depinto and Campbell, 1986
<i>Bacillus megaterium</i>	$\beta$ -CD	5.0-5.7	55	ND	6.07	Kitahata and Okada, 1975
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	$\alpha$ -CD	6.0	ND	68,000	4.5	Kitahata and Okada, 1982
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M5 al	$\alpha$ -CD	6.0-7.2	ND	68,000	4.8	Bender, 1977
<i>Micrococcus</i> sp.	$\beta$ -CD	6.2	ND	139,000	ND	Yagi <i>et al.</i> , 1980
<i>Bacillus circulans</i> A11						Kaskangam, 1998
Isozyme 1	$\beta$ -CD	6.0-7.0	40	72,000	4.73	
Isozyme 2	$\beta$ -CD	6.0-7.0	40	72,000	4.49	
Isozyme 3	$\beta$ -CD	6.0	50	72,000	4.40	
Isozyme 4	$\beta$ -CD	7.0	50-60	72,000	4.31	

ND) = Not Determined

ดาดัน และเป็น  $\beta$ -CGTase บริเวณเร่งของเอนไซม์มักพบกรดอะมิโน aspartic, glutamic, histidine, tyrosine หรือ tryptophan (ตารางที่ 4) (11, 24-30)ซึ่งมีความสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ด้วยศักยภาพการใช้งานได้หลากหลายของ CD ประกอบกับกลุ่มผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรต กลุ่มผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. circulans* A11 จากดินแหล่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ ในปริมาณสูง (5) ได้หาภาวะเหมาะสมในการผลิตทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร (6,9) จากการศึกษา พบว่าเอนไซม์ CGTase นี้ ผลิต  $\beta$ -CD เป็นผลิตภัณฑ์หลักโดยมีอัตราส่วน 1:4.6:1.6 (10) งานวิจัยครอบคลุมการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และการศึกษาโครงสร้างและสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ (6-7) การผลิต CD จากผลิตผลภาคเกษตรกรรมที่สำคัญของประเทศไทย เช่น แป้งข้าวเจ้าและแป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น (11) สำหรับงานทางด้าน การนำผลิตภัณฑ์ CD ไปใช้งาน กลุ่มผู้วิจัยศึกษาการใช้ CD ในการเพิ่มความเสถียรของไวตามินอี การลดปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงของไข่เป็ด การลดปริมาณสารขมในผลไม้ และการตรวจวัดสารพิษจากภาคการเกษตรซึ่งตกค้างในอาหาร/สิ่งแวดล้อม เป็นต้น (32-35) ในระหว่างการศึกษและพัฒนาการนำ CGTase หรือ CD ที่ผลิตได้ไปใช้งานนั้น ความเข้าใจเกี่ยวกับเอนไซม์และกลไกการทำงานเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง ดังนั้น การศึกษาเพื่อค้นหาความรู้ในระดับลึกของเอนไซม์จึงต้องทำต่อไป เพื่อสามารถนำไปพัฒนาการนำไปใช้งานให้ได้ดียิ่งขึ้น

ในกระบวนการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์ กลุ่มผู้วิจัยพบว่า เมื่อใช้เทคนิคขั้นสูงที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ได้แก่ chromatofocusing column (36) หรือ preparative gel electrophoresis (23) สามารถแยก CGTase ได้เป็นไอโซไซม์ 4 ชนิด ทุกรูปแบบมีขนาดประมาณ 78 กิโลดาลตันเท่ากัน แต่มีค่า pI ต่างกันคือ 4.73, 4.49, 4.40 และ 4.31 จากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่า แต่ละไอโซไซม์ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ CD ทั้ง 3 ชนิด ในสัดส่วนต่างกัน การศึกษาเพื่อทราบลักษณะโครงสร้าง และความแตกต่างของไอโซไซม์ จะเป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยต่อไป สำหรับการรายงานเรื่องไอโซไซม์ของ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นเท่าที่ผ่านมามีน้อยมาก (ตารางที่ 5) ในปี ค.ศ. 1990 Mattsson และคณะ (37) รายงานการแยก 6 subforms ของ CGTase จาก alkalophilic *Bacillus* ATCC 21783 โดยรูปแบบสำคัญมี pI 4.97 และ รูปแบบอื่นๆ อยู่ในช่วง pI 4.75-4.99 ทั้ง 6 รูปแบบมีกรดอะมิโน 5 ตัวจากปลาย N เหมือนกัน ขณะที่ *B. circulans* E 192 CGTase แยกโดย FPLC ใช้คอลัมน์ Mono Q ได้ 2 ไอโซไซม์ pI 6.7 และ 6.9 องค์ประกอบกรดอะมิโน 705 และ 716 ตัว ตามลำดับ โดยกรดอะมิโน 30 ตัวจากปลาย N เหมือนกันหมด (38) และรายงานสุดท้ายในปี 1994 Abelyan และคณะ (38) แยก CGTase ไอโซไซม์จาก *Bacillus* สายพันธุ์ INMIA-T6, -T42, และ -A 7/1 ได้ 2, 4 และ 2 ชนิด ตามลำดับ โดยแต่ละไอโซไซม์ต่างกัน

ตารางที่ 4 Summary of amino acid residues involved in the active sites of CGTases (11, 25-31)

Source	Amino acid residues at the active site	Reference
<i>Bacillus circulans</i> strain 251	Asp 229, Glu 257, Asp 328	Klein <i>et al.</i> , 1992 and Strokopytov, 1995
<i>Bacillus circulans</i> strain 251	Tyr 195	Penninga <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus circulans</i> E192	Tyr	Villette <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus</i> sp.1011	His 327, His 233, His 140	Nakamura <i>et al.</i> , 1993, 1994
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Trp 97	Ohnishi <i>et al.</i> , 1994
<i>Thermoanaerobacterium Thermosulfurigenes</i> EM 1	Asp 255, Glu 283, Asp 354	Wind <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus circulans</i> A11	Asp, Glu, His, Trp, Tyr	Tongsima, 1998

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 Multiple forms of CGTases (14, 37-39)

Source	Number of forms	Characteristics	References
Alkalophilic <u>Bacillus</u>	3	pH optima 4.6, 7.0, 9.5	Nagamura and Horikoshi et al, 1976
Alkalophilic <u>Bacillus</u>	6*	pI 4.97 (major form), other between 4.75-4.99, five amino acids at N-T are all the same	Mattsson et al, 1990
<u>B. circulans</u> E192	2*	pI 6.7 and 6.9, number of amino acids 705 and 716, 30 amino acids at N-T are the same	Bovetto et al. 1992
<u>Bacillus</u> sp. INMIA T6	2*	different sizes,	Abelyan et al, 1994
<u>Bacillus</u> sp. INMIA T42	4*	pH optimum,	
<u>Bacillus</u> sp. INMIA A7/1	2*	amino acid composition, and CD production ratio	

\* isozyme separation was reported

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้างที่องค์ประกอบกรดอะมิโนและลำดับผลิตภัณฑ์ CD ที่สร้าง อย่างไรก็ตาม รายงานเหล่านี้ยังไม่สามารถสรุปความแตกต่างชัดเจนและการทำงานของแต่ละไอโซไซม์ได้

จากการที่พบว่าแต่ละรูปแบบประกอบด้วยส่วนคาร์โบไฮเดรต ทำให้เชื่อว่าเอนไซม์นี้เป็นไกลโคโปรตีน จึงต้องการตรวจสอบว่ากระบวนการไกลโคซิเลชันมีผลต่อการเกิดรูปแบบของไอโซไซม์หรือไม่ อย่างไร จากรายงานของ Stratilova และคณะ (40) พบว่าไกลโคซิเลชันมีผลต่อการเกิดหลายรูปแบบของเอนไซม์ polygalacturonase จาก *Aspergillus* sp. และ Padmajanti และคณะ (41) ได้ศึกษาผลของไกลโคซิเลชันต่อแอกติวิตีของ recombinant isopullulanase (rec-IPU) จาก *Aspergillus oryzae* M-2-3 โดยทำปฏิกิริยา deglycosylation ด้วย endoglycosidase H พบว่า rec-IPU มีขนาดโมเลกุลลดลงหลังทำปฏิกิริยา และเมื่อตรวจสอบ แอกติวิตีพบว่าลดลงเหลือ 65 %

ในการศึกษาความสำคัญของไกลโคซิเลชัน มักนิยมนำโปรตีนหรือเอนไซม์ที่สนใจมาทำปฏิกิริยา deglycosylation แล้วตรวจสอบว่าแอกติวิตีหรือโครงสร้างเปลี่ยนไปหรือไม่ สำหรับ deglycosylation มีรายงานการใช้เอนไซม์ เช่น Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase F (Endo F), peptide:N-glycosidase F (PNGase F) หรือ endoglycosidase H (Endo H) ซึ่งสามารถตัด โอลิโกแซคคาไรด์ที่ต่อแบบ N-linked อยู่กับโปรตีนได้ (41-42) โดย PNGase F ย่อย glycans ได้ทุกชนิด ขณะที่ Endo F และ Endo H ย่อยพวก high-mannose และ hybrid oligosaccharides ได้หลายชนิด แต่ไม่ทุกชนิด นอกจากนี้มีรายงานว่า การ treat โปรตีนหรือเอนไซม์ด้วย PNGase F ในบางกรณี พบว่า หากทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์เสียสภาพก่อนจะช่วยให้ประสิทธิภาพการทำงานของ PNGase F ดีขึ้น นอกจากการใช้เอนไซม์ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ ยังมีการใช้สารเคมี เช่น trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) ในปฏิกิริยา deglycosylation ได้ด้วย (43) โดยสารเคมีจะสามารถตัดโอลิโกแซคคาไรด์ที่ต่อแบบ O-linked อยู่กับโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ และยังสามารถตัดโอลิโกแซคคาไรด์ที่ต่อแบบ N-linked ด้วย

งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาลักษณะโครงสร้างและวิเคราะห์ในระดับลึกกว่าเท่าที่เคยมีรายงาน โดยเน้นที่กรดอะมิโนสำคัญบริเวณเร่ง รวมทั้งลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N นอกจากนี้ยังต้องการวิเคราะห์ความสำคัญของไกลโคซิเลชันต่อแอกติวิตีและโครงสร้างของไอโซไซม์ และ เพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของไอโซไซม์

## วิธีการวิจัย

### 1. การเตรียมเอนไซม์ CGTase

เตรียม Starter inoculum โดยเลี้ยง *Bacillus circulans* A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium I ซึ่งเป็นอาหารอุดม pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 37 °C จนเซลล์ได้ความขุ่นประมาณ 0.3-0.5 หน่วยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm เวลาที่ใช้ปกติประมาณ 4-6 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 1% ลงใน Horikoshi cultivation medium สูตรดัดแปลง (7) ซึ่งมีแป้งข้าวเจ้า 1% เป็นส่วนประกอบและเป็นสารเหนียวทำให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ CGTase เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์แยกเซลล์ออกที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ได้ crude enzyme ในส่วนน้ำใส

### 2. การแยก CGTase ไอโซไซม์

นำ crude enzyme ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยการดูดซับด้วยแป้ง (starch adsorption) และเพิ่มความเข้มข้นด้วยการทำ ultrafiltration ก่อนผ่านเอนไซม์เข้าสู่เครื่อง Prep cell model 491 เพื่อแยก CGTase ออกเป็น 4 ไอโซไซม์ (23) ซึ่งใช้ระบบพอลิอะคริลลาไมล์เจล อิเล็กโทรโฟเรซิสแบบไม่ต่อเนื่อง สภาวะที่ใช้ คือ 7.5% separating gel, 5% stacking gel โดย Tris-glycine pH 8.3 เป็นอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ อัตราการไหล 1 ml/min และเก็บแฟรกชันละ 2.5 ml เพื่อตรวจสอบโปรตีน แอคติวิตีของเอนไซม์ CGTase และไอโซไซม์

### 3. การตรวจวัดโปรตีนและแอคติวิตี

ในขั้นตอนของการเตรียมเอนไซม์และการทำ CGTase ไอโซไซม์ให้บริสุทธิ์ ต้องมีการตรวจวัดโปรตีนและแอคติวิตี โดยใช้วิธีดังนี้

3.1 การตรวจวัดโปรตีน ใช้วิธีสร้างสารประกอบกับ Coomassie Blue G แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ตามวิธีของ Bradford (44)

#### 3.2 การตรวจวัดแอคติวิตีของ CGTase

วิธีที่ 1 Dextrinizing assay (iodine method) ดัดแปลงจากวิธีของ Fuwa (1954) (45) เป็นการวัดความสามารถของการย่อยแป้งของเอนไซม์ วิธีนี้รวดเร็วแต่ไม่จำเพาะต่อ CGTase เหมาะในการตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากและติดตามแอคติวิตีระหว่างการทำบริสุทธิ์

เติมสารละลายเอนไซม์ 5, 10, 20 และ 30 ไมโครลิตร ลงในสารละลายแป้ง (soluble starch, potato) 0.2 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH6.0 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีหยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไฮโดรคลอริก 0.2

โมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วเติม 0.02 เปอร์เซ็นต์ iodine reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับ ปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

หลอดควบคุม : ให้ใส่เอนไซม์ภายหลังการเติมกรดไฮโดรคลอริก

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินของ สารประกอบแบง-ไอโอดีนลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

วิธีที่ 2 Cyclodextrin-trichloroethylene assay (46) เป็นการติดตามปริมาณ ผลิตภัณฑ์ CD ที่เกิดจากปฏิกิริยาการเร่งของ CGTase โดยให้เกิดตะกอนกับ trichloroethylene

เจือจางสารละลายเอนไซม์ในอัตราส่วน 1: 2 แบบ serial (1:2, 1:4,....) ด้วย 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 เติมสารละลายเอนไซม์ดังกล่าว 1 มิลลิลิตรใน 5 มิลลิลิตรของสารละลาย แบง 2.0 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไตรคลอโรเอทิลีน 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีด่างคืบประมาณ 12 ชั่วโมง บันทึกผลการเกิดตะกอน CD-TCE complex เป็นค่า dilution limit (1:2<sup>n</sup>)

กำหนดให้ dilution limit เป็นค่าที่สารละลายเอนไซม์เจือจางมากที่สุดที่ยังสังเกตเห็น ตะกอนบริเวณรอยต่อของสารละลาย aqueous ชั้นบนและ TCE ชั้นล่าง

#### 4. การตรวจวัดปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method (47)

นำตัวอย่างเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร มาเติม 5% phenol (w/v) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และกรด ซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 484 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของกลูโคส

#### 5. พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (PAGE)

##### 5.1 ระบบไม่เสียสภาพ (Native PAGE)

ใช้ slab gels ในระบบ discontinuous ความเข้มข้นของ separating และ stacking gels เป็น 7.5 และ 5% (w/v) ตามลำดับ โดยใช้ Tris-glycine pH8.3 เป็นอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ ใช้กระแสไฟคงที่ 20 mA/slab ทำการ run จากขั้วลบไปขั้วบวก (24)

## 5.2 ระบบเสียดภาพ (SDS-PAGE) (48)

เตรียม discontinuous slab gels เช่นเดียวกับ 5.1 แต่เติม 0.1 % sodium dodecyl sulphate (SDS) ในส่วนผสมของทั้ง separating และ stacking gels และในอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ สำหรับสารตัวอย่างต้องทำให้เสียดภาพก่อนโดยการต้ม 5 นาทีใน sample buffer (Tris-HCl pH 6.8 ที่มี 2% SDS และ 5% mercaptoethanol) ทำการ run เช่นเดียวกับ 5.1

## 5.3 การย้อมโปรตีน

ใช้สีย้อม Coomassie blue โดยแช่เจลใน 0.1% Coomassie blue R-250 ที่ละลายใน 45%(v/v) เมทานอลและ 10%(v/v) กรดอะซิติก ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วทำการ destain ในสารละลาย 10% เมทานอลใน 10 % กรดอะซิติกจนพื้นเจลใส

## 5.4 การย้อมแอกติวิตี

ดัดแปลงจากวิธีของ Kobayashi (13) โดยแช่เจลในสารละลาย 10 มิลลิเมตรของสับสเตรท ที่ประกอบด้วย 2.0% soluble starch (potato) ใน 0.2 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่ 40 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ล้างเจลหลายครั้งด้วยน้ำกลั่น แล้วเติม 10 ml สารละลายไอโอดีน (0.2% I<sub>2</sub> ใน 2% KI) เพื่อย้อมสีที่อุณหภูมิห้อง สังเกตแถบแอกติวิตีโดยการตรวจสอบแถบใสบนพื้นเจลสีน้ำเงิน

## 6. การศึกษาเปรียบเทียบบริเวณเร่งของไอโซไซม์

### 6.1 การหากรดอะมิโนที่สำคัญต่อแอกติวิตีของไอโซไซม์

นำไอโซไซม์ที่แยกได้ทั้ง 4 รูปแบบ มาทำการดัดแปลงกรดอะมิโนที่มักมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยทั่วไปด้วยสารเคมีที่จำเพาะต่อกรดอะมิโน เช่น ดัดแปลงทริปโตเฟนด้วย *N*-bromosuccinimide ดัดแปลงไทโรซีนด้วย *N*-acetylimidazole ดัดแปลงฮิสติดีนด้วย diethylpyrocarbonate และดัดแปลงไลซีน เซรีน ซิสเตอีน แอสปาดิก และกลูตามิก เป็นต้น (49-51) โดยบ่มไอโซไซม์ 40 µg/ml กับสารเคมีที่มีความเข้มข้น 1 mM อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วตรวจวัดแอกติวิตีที่เหลือของไอโซไซม์เปรียบเทียบกับไอโซไซม์ที่ไม่ถูกดัดแปลง

### 6.2 การหากรดอะมิโนในบริเวณเร่งของไอโซไซม์

ใช้เทคนิค substrate protection โดยบ่มไอโซไซม์ ความเข้มข้น 40 µg/ml กับ สับสเตรท คือ β-CD ความเข้มข้น 6 mM ตามวิธีของ Delforge, 1997 (52) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 5-10 นาที ก่อนเติมสารเคมีดัดแปลงกรดอะมิโน วัดแอกติวิตีที่เหลือของไอโซไซม์เปรียบเทียบกับแอกติวิตีที่ไม่ถูกป้องกันโดยสับสเตรท



## 7. การหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของไอโซไซม์

แยกไอโซไซม์ของ CGTase ด้วย PAGE ทั้งแบบเสี่ยสภาพและไม่เสี่ยสภาพ แล้ว blot แถบโปรตีนของแต่ละไอโซไซม์จากเจลลงบน PVDF membrane ด้วย Mini Trans-Blot cell โดยใช้ Tris-glycine pH 8.3 ที่มี 10% เมธทานอล เป็นอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ ใช้ศักย์ไฟฟ้าคงที่ 50 โวลต์ นาน 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่น PVDF มาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ในเมธทานอล 2-3 นาที ก่อนที่จะย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue 1 นาที แล้ว destain ด้วย 50% เมธทานอลจนพื้น PVDF membrane เป็นสีขาว ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วส่งไปวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ปลาย N ด้วยวิธี Edman degradation ที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ National University of Singapore ประเทศสิงคโปร์

## 8. การศึกษาผลของไกลโคซิเลชันต่อโครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์

### 8.1 การทำ deglycosylation ด้วย Endo H

นำ CGTase ที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน (PE, Partially purified enzyme) ด้วยวิธี Starch adsorption (10) และไอโซไซม์ทั้ง 4 ที่แยกโดยเทคนิค Preparative gel electrophoresis (23) มาทำปฏิกิริยา deglycosylation ด้วย Endo H (41) โดยใช้ invertase และ ovalbumin เป็น positive control โดยนำ CGTase หรือ control protein 40 ไมโครกรัมผสมกับ Endo H ที่ความเข้มข้น 100 mU/ml ใน 50 mM sodium acetate buffer pH 5.5 แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง ตรวจวัดแอกติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ด้วยวิธี Dextrinizing activity (45) และวิเคราะห์โครงสร้างที่เปลี่ยนไปโดยฟอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งระบบเสี่ยสภาพ (SDS PAGE) และไม่เสี่ยสภาพ (native PAGE)

### 8.2 การทำ deglycosylation ด้วย PNGase F

นำ CGTase ที่ทำบริสุทธิ์บางส่วน (PE, Partially purified enzyme) ด้วยวิธี Starch adsorption (10) และไอโซไซม์ทั้ง 4 ที่แยกโดยเทคนิค Preparative gel electrophoresis (23) มาทำปฏิกิริยา deglycosylation ด้วย PNGase F (42) ใน 2 สภาวะคือ สภาวะเสี่ยสภาพ และ ไม่เสี่ยสภาพ โดยใช้ Human transferrin เป็น positive control

1) สภาวะเสี่ยสภาพ นำสารละลาย CGTase 5 mg/ml ใน 10% SDS มาต้มในน้ำเดือด 5 นาทีก่อนนำมาทำปฏิกิริยากับ PNGase F โดยในปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย CGTase 50 ไมโครกรัมใน 0.5 M sodium phosphate buffer pH7.2 ที่มี 50 mM EDTA, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol และ 2.5% triton-X100 ผสมกับ PNGase F ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจวัดแอกติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ด้วยวิธี

Dextrinizing activity assay (45) และวิเคราะห์โครงสร้างที่เปลี่ยนไปโดยพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งระบบเสียสภาพและไม่เสียสภาพ

2) สภาวะไม่เสียสภาพ นำ CGTase 50 ไมโครกรัมผสมกับ PNGase F ที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน 0.25 M sodium phosphate buffer pH8.6 ที่มี 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจวัดแอกติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ด้วยวิธี Dextrinizing activity assay (45) และวิเคราะห์โครงสร้างที่เปลี่ยนไปโดยพอลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งระบบเสียสภาพและไม่เสียสภาพ

### 8.3 การทำ deglycosylation ด้วย Trifluoromethanesulfonic acid (TFMS)

นำ CGTase ที่บริสุทธิ์บางส่วน (PE, Partial purified enzyme) ด้วยวิธี Starch adsorption (10) และไอโซไซม์ทั้ง 4 ที่แยกโดยเทคนิค Preparative gel electrophoresis (23) มาทำปฏิกิริยา deglycosylation ด้วย TFMS โดยใช้ peroxidase เป็น positive control โดยนำเอนไซม์ 10 ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร เติม 20%TFMS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง จากนั้นเติม 60%pyridine ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปโอะโซไลซ์ในน้ำกลั่นนาน 3 ชั่วโมง วิเคราะห์ โครงสร้างที่เปลี่ยนไปโดยเทคนิค พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสระบบเสียสภาพ (SDS PAGE) และวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพื่อตรวจสอบปริมาณของหมู่ไกลโคซิลที่เปลี่ยนไปโดยวิธี phenol sulfuric acid method (47)

## 9. การตรวจสอบเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของไอโซไซม์

นำไอโซไซม์ทั้ง 4 ที่แยกโดยเทคนิค Preparative gel electrophoresis (23) ปริมาณ 200 ไมโครกรัมโปรตีน มาทำให้แห้งโดย lyophilizer เติม 8 M urea ปริมาตร 60 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม 0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.0 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และ 0.1 mg/ml trypsin ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยใช้อัตราส่วนของ trypsin : CGTase เท่ากับ 1 : 80 (w/w) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วกรองสารละลายตัวอย่างด้วยแผ่นกรอง เมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC ด้วย reverse phase C<sub>18</sub> column (ขนาด 250 x 4.6 มม.) ซึ่ง equilibrate ด้วยสารละลาย A จากนั้นชะด้วย ส่วนผสมของสารละลาย A และ B ดังระบุข้างล่างนี้ โดยสารละลาย A คือ 0.1%(v/v) trifluoroacetic acid (TFA) ในน้ำ สารละลาย B คือ 75% (v/v) acetonitrile ที่มี 0.1%(v/v) TFA ในน้ำ อัตราเร็วในการชะ 1 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดการดูดกลืนแสงของเพปไทด์ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบ peptide profile ของไอโซไซม์ทั้ง 4

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	100	0
5	95	5
30	80	20
35	0	100
40	100	0



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ผลการวิจัย

ในการศึกษาเอนไซม์ในงานวิจัยนี้ ต้องทำเอนไซม์ให้มีความบริสุทธิ์สูงและแยกไอโซไซม์ของเอนไซม์ออกจากกันได้ก่อน จึงจะนำแต่ละไอโซไซม์ไปศึกษาลักษณะโครงสร้างตามที่ได้ตั้งเป้าหมายไว้ในวัตถุประสงค์ ซึ่งแบ่งเป็น การวิเคราะห์บริเวณเร่ง การวิเคราะห์ผลของไกลโคซิเลชันต่อแอกติวิตีและโครงสร้าง การตรวจสอบเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ และ การตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N

### ตอนที่ 1 การแยกไอโซไซม์ของ CGTase

#### การทำ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน

ทำไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus circulans* ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีการดูดซับด้วยแป้ง (starch adsorption) ตามวิธีของ Malai, 1994 (8) พบว่าสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 47 เท่า ให้ผลผลิต 95 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าแอกติวิตีจำเพาะ 2,182 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 6) เมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่เสียสภาพ และติดตามแถบโปรตีนด้วยการย้อม Coomassie Brilliant Blue R-250 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 หลังจากนั้นทำเอนไซม์ให้เข้มข้นโดยเทคนิค ultrafiltration เพื่อเตรียมเอนไซม์สำหรับการแยกไอโซไซม์ในลำดับต่อไป

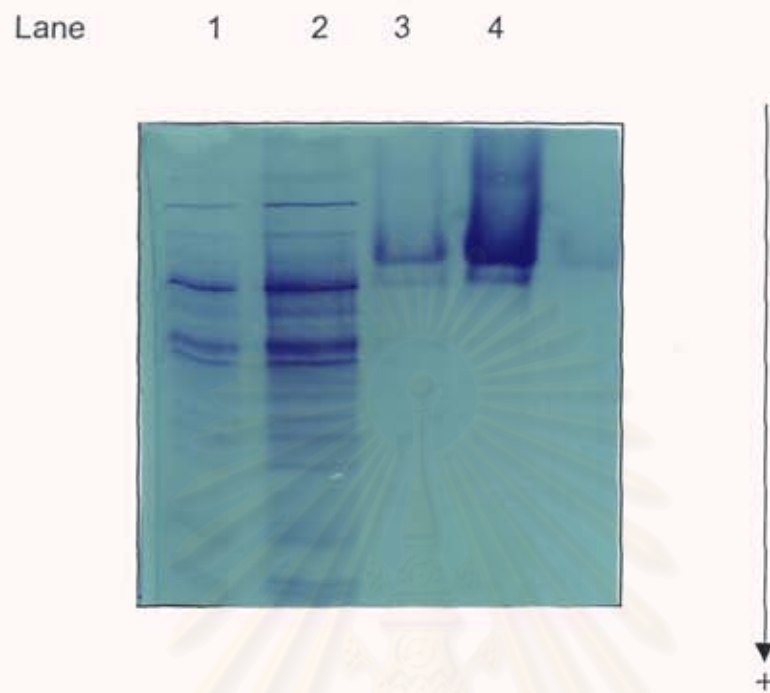
#### การแยกไอโซไซม์ของ CGTase

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนที่เตรียมได้มาแยกไอโซไซม์โดยผ่านเข้าสู่เครื่อง Prep cell model 491 ตามวิธีของ Kaskangam, 1998 (23) ซึ่งใช้ระบบพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่ต่อเนื่อง อะเอนไซม์โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-glycine pH 8.3 ด้วยอัตราการใช้ 1 มิลลิลิตร/นาที่ และเก็บแฟรกชันละ 2.5 มิลลิลิตร ติดตามเอนไซม์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีด้วยวิธี dextrinizing activity assay ผลการทดลองได้โครมาโตแกรมดังรูปที่ 4 เอนไซม์ CGTase ถูกชะออกมาในแฟรกชันที่ 1-140 นำทุกๆ 5 แฟรกชันมาติดตามแอกติวิตีของเอนไซม์โดยวิธี Amylolytic activity staining เพื่อแยกแต่ละไอโซไซม์ออกจากกัน จากการติดตามผลการทดลองพบว่าแยกไอโซไซม์ได้เป็น 5 แถบ แต่ละแถบถูกชะออกมาในหลายแฟรกชัน ดังนี้ แฟรกชัน 1-181 (band 5) แฟรกชัน 20-43 (band 4) แฟรกชัน 45-70 (band 3) แฟรกชัน 73-85 (band 2) และแฟรกชัน 110-140 (band 1) (รูปที่ 5) รวมแฟรกชันที่ให้ตำแหน่ง band ตรงกันไว้ด้วยกัน และตรวจสอบแอกติวิตีอีกครั้งด้วยวิธี Amylolytic activity staining เพื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของแต่ละไอโซไซม์บนแผ่นเจล (รูปที่ 6-a) ผลการทดลองพบว่า band 1-5 ให้ผลบวกกับ Amylolytic

ตารางที่ 6. Purification of CGTase from *Bacillus circulans* A11

Purification Step	Volume (ml)	Total Activity (Unit)*	Activity (U/ml)	Total Protein (mg)	Specific Activity (Unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)	CD-TCE (2 <sup>n</sup> )
Crude enzyme	2,400	12.5x10 <sup>4</sup>	52	2,712	46	1	100	2 <sup>8</sup>
Starch Adsorption	500	12.0x10 <sup>4</sup>	240	55	2,182	47	96	2 <sup>9</sup>
Ultrafiltration	40	64.8x10 <sup>3</sup>	1,620	24	2,700	58	52	2 <sup>15</sup>
Preparative gel electrophoresis								
Band 1	55	11.9x10 <sup>3</sup>	217	2.59	4,608	100	9.6	
Band 2	14	52.5x10 <sup>2</sup>	375	1.17	3,070	67	4.2	
Band 3	35	11.6x10 <sup>2</sup>	33	0.70	1,650	36	0.9	
Band 4	16	9.1x10 <sup>1</sup>	5.7	0.16	570	12.4	0.07	
Band 5	4	1.16x10 <sup>1</sup>	2.9	0.14	82.9	1.8	0.009	

\* dextrinizing activity



รูปที่ 3. Non - denaturing PAGE of CGTase from different steps of purification

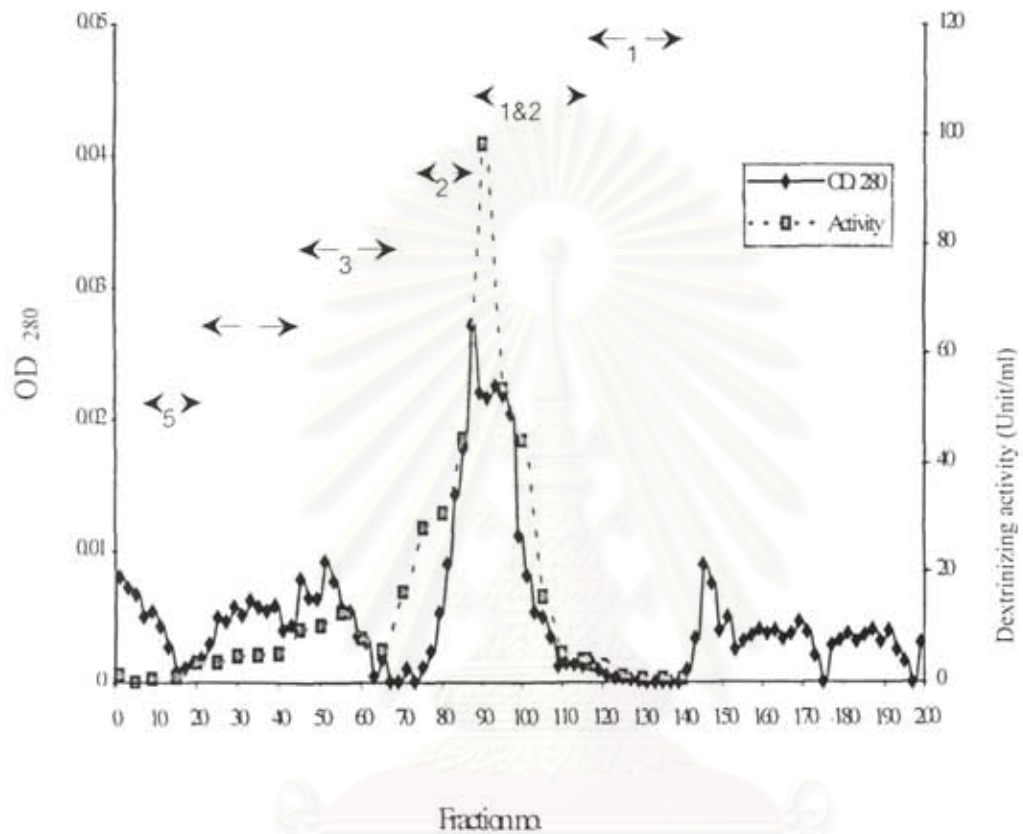
Coomassie blue staining

Lane 1. : Crude enzyme (20 $\mu$ g)

2. : Starch adsorbed enzyme (20 $\mu$ g)

3. : After ultrafiltration (25 $\mu$ g)

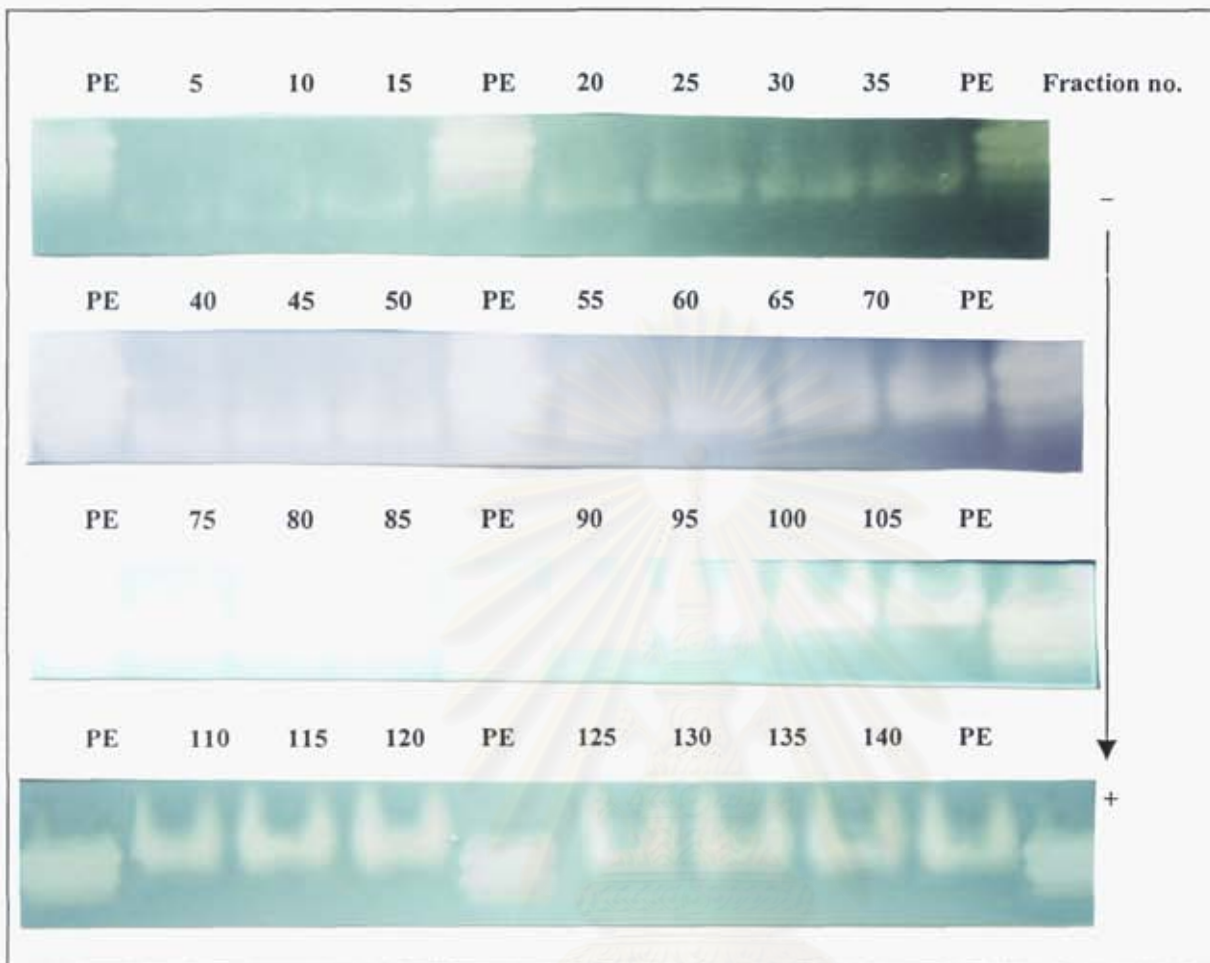
4. : Band 1 from preparative gel electrophoresis (2 $\mu$ g)



รูปที่ 4. Elution profile of CGTase isozymes from preparative gel electrophoresis

F 1-18 = band 5      F 20-43 = band 4      F 45-70 = band 3

F 73-85 = band 2      F 87-107 = band 1+2      F 110-140 = band 1



รูปที่ 5. Non-denaturing PAGE pattern of every 5 fractions of CGTase isozyms eluted from preparative gel electrophoresis.

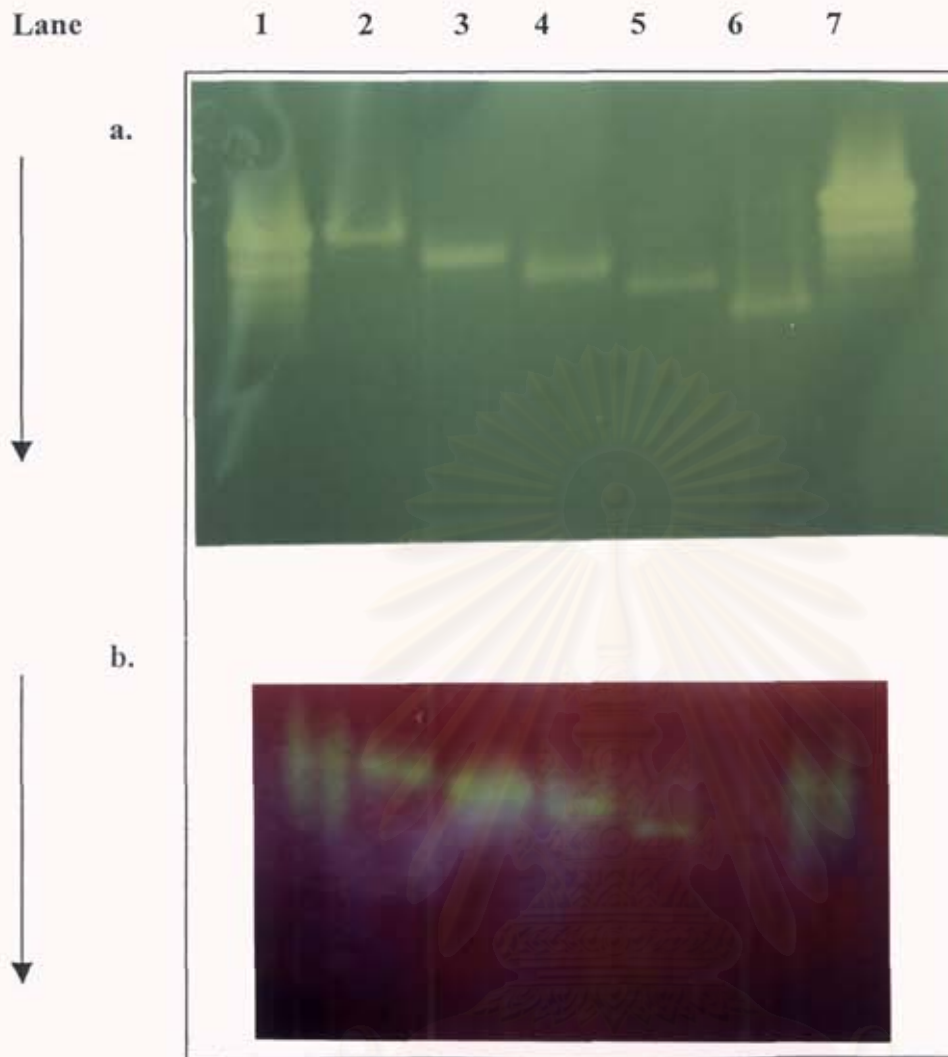
Staining was performed by amylolytic activity method (0.2 units of dextrinizing activity).

PE = Partially purified enzyme

F 1-18 = band 5      F 20-43 = band 4      F 45-70 = band 3

F 73-85 = band 2      F 87-107 = band 1+2      F 110-140 = band 1





รูปที่ 6. Non-denaturing PAGE of the enzyme bands 1 to 5 obtained from preparative gel electrophoresis.

- a. Amyolytic activity staining by iodine solution  
(0.2 units of dextrinizing activity)
- b. CD-forming activity staining  
(2.0 units of dextrinizing activity except for band 5, 20 units were applied)

Lane 1,7. : Partially purified enzyme

2. : Band 1

3. : Band 2

4. : Band 3

5. : Band 4

6. : Band 5

activity staining ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบเอนไซม์ย่อยแบ่งทั่วๆไป แต่เมื่อทดสอบโดยวิธี phenolphthalein methyl orange staining ซึ่งเป็นวิธีทดสอบสำหรับเอนไซม์ CGTase โดยเฉพาะ พบว่า จะให้ผลบวกใน band 1-4 (รูปที่ 6-b) ดังนั้น CGTase จึงมีเพียง 4 ไอโซไซม์ ต่อจากนั้นทำเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้นและไตอะไลซิสอีกครั้งด้วย 50 mM Acetate buffer ที่ประกอบด้วย 10mM  $\text{CaCl}_2$  pH6.0 ก่อนนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

## ตอนที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบบริเวณเร่งของไอโซไซม์

### การหารดอะมิโนที่สำคัญต่อแอกติวิตีของไอโซไซม์

นำไอโซไซม์ที่แยกได้ทั้ง 4 รูปแบบ มาทำการดัดแปลงกรดอะมิโนที่มักมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยทั่วไป ด้วยสารเคมีที่จำเพาะต่อกรดอะมิโน ตามวิธีในข้อ 6.1 ในส่วนบทวิธีการวิจัย ผลการทดลอง (ตารางที่ 7) พบว่า การดัดแปลงกรดอะมิโนซิสเตอีนด้วย NEM, IAM และ DTT ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ เมื่อดัดแปลงกรดอะมิโนฮิสติดีนและทริปโตเฟนด้วย DEP และ NBS ผลการทดลอง พบว่า แอกติวิตีของไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ สูญเสียเกือบจะทั้งหมด (แอกติวิตีคงเหลือ 0-13.6 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นผลของ DEP ต่อไอโซไซม์ 2 ทำให้แอกติวิตีเหลือ 41.1 เปอร์เซ็นต์) ส่วนการดัดแปลงคาร์บอกซิลิกอะมิโนแอซิดด้วย EDC พบว่าแอกติวิตีของไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ สูญเสียเพียงบางส่วน ในขณะที่การดัดแปลงไลซีนด้วย TNBS ดัดแปลงเซรีนด้วย PMSF และดัดแปลงไทโรซีนด้วย NAI พบว่ามีผลต่อไอโซไซม์ไม่มากนัก โดยมีเพียงแอกติวิตีของบางไอโซไซม์เท่านั้นที่สูญเสียไปเพียงบางส่วน

### การหารดอะมิโนในบริเวณเร่งของไอโซไซม์

การทดลองนี้ ใช้เทคนิค substrate protection โดยป้องกันบริเวณเร่งของแต่ละไอโซไซม์ด้วยสับสเตรท Methyl- $\beta$ -CD ที่มากเกินพอคือ 25 มิลลิโมลาร์ ก่อนเติมสารเคมีดัดแปลงกรดอะมิโน

### กรดอะมิโนไลซีน

การดัดแปลง  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$  ของกรดอะมิโนไลซีนในแต่ละไอโซไซม์ด้วย TNBS ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 40 °C 30 นาที ตามวิธีข้อ 6.1 ในส่วนบทวิธีการวิจัย ผลในตารางที่ 7 พบว่า แอกติวิตีของไอโซไซม์ 3 สูญเสียไป 31.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แอกติวิตีของไอโซไซม์ 1, 2 และ 4 ไม่สูญเสีย ถ้ากรดอะมิโนไลซีนเกี่ยวข้องที่บริเวณเร่งของไอโซไซม์ 3 การดัดแปลงไลซีนด้วย TNBS ในสภาวะที่มีและไม่มีสับสเตรทป้องกันควรให้ผลการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลอง พบว่า ในสภาวะที่ป้องกันบริเวณเร่งของไอโซไซม์ด้วยสับสเตรท แอกติวิตีของไอโซไซม์ 3 จะสูญเสียเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) ผลการทดลองนี้ แสดงว่ากรดอะมิโนไลซีนน่าจะอยู่ในบริเวณเร่งของไอโซไซม์ 3

ตารางที่ 7. Effect of various group – specific reagents on the activity of CGTase

isozymes

Group – specific reagents (1mM) <sup>*</sup>	Amino acid involved	% Residual dextrinizing activity of each isozyme			
		1	2	3	4
None	-	100	100	100	100
<i>N</i> -ethylmaleimide (NEM)	Cysteine	99.8	99.1	99.5	91.8
Iodoacetamide (IAM)	Cysteine	97.6	100	99.1	93.6
Dithiothreitol (DTT)	Cysteine	98.1	100	99.3	91.7
2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)	Lysine	100	92.2	68.5	92.8
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Serine	100	60.5	100	78.4
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	Carboxylic amino acids	67.1	75.0	43.6	69.4
Diethylpyrocarbonate (DEP)	Histidine	0	41.1	0	13.6
<i>N</i> -bromosuccinimide (NBS)	Tryptophan	0	0	11.4	6.5
<i>N</i> -acetylimidazole (NAI)	Tyrosine	69.9	100	89.5	100

\*Incubation with 25 µg/ml CGTase isozyme at 40°C, pH 6.0 for 30 minutes

ตารางที่ 8. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activity of CGTase isozyme 3 by TNBS

Compound added	% Residual activity		
	I	II	Average
1) None	100	100	100
2) 25mM Methyl- $\beta$ -CD	96.0	99.0	97.5
3) 25mM Methyl- $\beta$ -CD, then 1 mM TNBS	89.7	89.9	89.8
4) 1 mM TNBS	70.4	67.1	68.8

Numbers under I and II are duplicate values

### กรดอะมิโนเซรีน

การดัดแปลงเซรีนในแต่ละไอโซไซม์ของ CGTase ด้วย PMSF ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า แอคติวิตีของไอโซไซม์ 2 และ 4 สูญเสียไป 39.5 และ 21.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่แอคติวิตีของไอโซไซม์ 1 และ 3 ไม่สูญเสีย ถ้ากรดอะมิโนเซรีนเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งของไอโซไซม์ 2 และ 4 การดัดแปลงเซรีนด้วย PMSF ในสภาวะที่มีและไม่มีสับสเตรทป้องกันควรให้ผลการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลอง พบว่า ในสภาวะที่ป้องกันบริเวณเร่งของไอโซไซม์ด้วยสับสเตรท residual activity ของไอโซไซม์ 2 จะเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับสภาวะไม่ป้องกัน (ตารางที่ 9) ในขณะที่แอคติวิตีของไอโซไซม์ 4 ไม่เปลี่ยนแปลง ผลการทดลองที่ได้แสดงว่ากรดอะมิโนเซรีนเป็นกรดอะมิโนในบริเวณเร่งของไอโซไซม์ 2 แต่ไม่อยู่ในบริเวณเร่งของไอโซไซม์ 4

### คาร์บอกซิลิกอะมิโนแอซิด

การดัดแปลงหมู่คาร์บอกซิลของคาร์บอกซิลิกอะมิโนแอซิดด้วย EDC ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า แอคติวิตีของไอโซไซม์ 1, 2, 3 และ 4 สูญเสียไป 41.7, 29.0, 41.5 และ 32.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ถ้าคาร์บอกซิลิกอะมิโนแอซิดเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งของไอโซไซม์ 1, 2, 3 และ 4 การดัดแปลงคาร์บอกซิลิกอะมิโนแอซิดด้วย EDC ในสภาวะที่มีและไม่มีสับสเตรทป้องกันควรให้ผลการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลอง พบว่า ในสภาวะที่ป้องกันบริเวณเร่งของไอโซไซม์ด้วยสับสเตรท residual activity ของไอโซไซม์ 1, 2, 3 และ 4 จะเพิ่มขึ้น 8-17 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) แสดงว่าคาร์บอกซิลิกอะมิโนแอซิดเป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องในบริเวณเร่งของไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ แต่อาจอยู่ในตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อแอคติวิตีแตกต่างกัน

### กรดอะมิโนไทโรซีน

การดัดแปลงไทโรซีนในแต่ละไอโซไซม์ของ CGTase ด้วย NAI ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า มีเพียงแอคติวิตีของไอโซไซม์ 1 และ 3 เท่านั้นที่สูญเสียไปบางส่วน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NAI เป็น 30 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 40 °C 30 นาที แอคติวิตีของไอโซไซม์ทั้ง 4 ไอโซไซม์ สูญเสียไป 79.0, 22.9, 61.6 และ 51.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ถ้ากรดอะมิโนไทโรซีนเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งของไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ การดัดแปลงไทโรซีนด้วย NAI ในสภาวะที่มีและไม่มีสับสเตรทป้องกันควรให้ผลการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลอง พบว่า ในสภาวะที่ป้องกันบริเวณเร่งของไอโซไซม์ด้วยสับสเตรท residual activity ของไอโซไซม์ 2, 3 และ 4 จะเพิ่มขึ้น 13-17 เปอร์เซ็นต์ และในไอโซไซม์ 1 residual activity ของไอโซไซม์จะเพิ่มขึ้นถึง 46 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) แสดงว่า กรดอะมิโนไทโรซีนเกี่ยวข้องกับบริเวณเร่งของไอโซไซม์ทั้ง 4 ไอโซไซม์ โดยเฉพาะในไอโซไซม์ 1 ไทโรซีนน่าจะอยู่ในตำแหน่งที่สำคัญมากต่อแอคติวิตีของ ไอโซไซม์

ตารางที่ 9. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes 2 and 4 by PMSF

Compound added	% Residual activity		
	I	II	Average
1) None			
-Isozyme 2	100	100	100
-Isozyme 4	100	100	100
2) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD			
-Isozyme 2	94.0	91.7	92.9
-Isozyme 4	92.4	94.0	93.2
3) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD, then 1 mM PMSF			
-Isozyme 2	83.0	84.5	83.8
-Isozyme 4	80.2	80.3	80.3
4) 1 mM PMSF			
-Isozyme 2	61.8	64.7	63.3
-Isozyme 4	78.1	79.4	78.8

Numbers under I and II are duplicate values

ตารางที่ 10. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes by EDC

Compound added	% Residual activity		Average
	I	II	
1) None			
-Isozyme 1	100	100	100
-Isozyme 2	100	100	100
-Isozyme 3	100	100	100
-Isozyme 4	100	100	100
2) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD			
-Isozyme 1	88.9	84.5	86.7
-Isozyme 2	94.0	94.4	94.2
-Isozyme 3	83.7	80.3	82.0
-Isozyme 4	94.8	95.7	95.3
3) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD, then 1 mM EDC			
-Isozyme 1	78.3	72.1	75.2
-Isozyme 2	80.4	81.0	80.7
-Isozyme 3	72.7	70.4	71.6
-Isozyme 4	71.3	79.8	75.6
4) 1 mM EDC			
-Isozyme 1	59.9	56.6	58.3
-Isozyme 2	70.0	72.0	71.0
-Isozyme 3	64.1	52.8	58.5
-Isozyme 4	63.6	71.0	67.3

Numbers under I and II are duplicate values

ตารางที่ 11. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes by NAI

Compound added	% Residual		activity
	I	II	Average
1) None			
-Isozyme 1	100	100	100
-Isozyme 2	100	100	100
-Isozyme 3	100	100	100
-Isozyme 4	100	100	100
2) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD			
-Isozyme 1	97.6	100	98.8
-Isozyme 2	95.7	94.8	95.3
-Isozyme 3	97.6	96.6	97.1
-Isozyme 4	97.7	93.5	95.6
3) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD, then 30 mM NAI			
-Isozyme 1	69.4	64.5	67.0
-Isozyme 2	90.0	89.2	89.6
-Isozyme 3	54.2	55.2	54.7
-Isozyme 4	62.4	65.2	63.8
4) 30 mM NAI			
-Isozyme 1	20.6	21.3	21.0
-Isozyme 2	77.6	76.5	77.1
-Isozyme 3	38.8	37.9	38.4
-Isozyme 4	47.2	50.0	48.6

Numbers under I and II are duplicate values



### กรดอะมิโนทริปโตเฟน

การดัดแปลงทริปโตเฟนในแต่ละไอโซไซม์ของ CGTase ด้วย NBS ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า แอคติวิตีของไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ สูญเสียไปทั้งหมดหรือเกือบจะทั้งหมดในบางไอโซไซม์ แต่เมื่อลดความเข้มข้นของ NBS เป็น 0.05 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 40 °C 30 นาที ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองของ Tongsima, 1998 (11) แอคติวิตีของไอโซไซม์ทั้ง 4 ไอโซไซม์ สูญเสียไป 89.7, 92.0, 74.9 และ 85.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12) ถ้ากรดอะมิโนทริปโตเฟนเกี่ยวข้องที่บริเวณเร่งของไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ การดัดแปลงทริปโตเฟนด้วย NBS ในสถานะที่มีและไม่มีสับสเตรทป้องกันควรให้ผลการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลอง พบว่า ในสถานะที่ป้องกันบริเวณเร่งของไอโซไซม์ด้วยสับสเตรท residual activity ของไอโซไซม์ 1 และ 2 เพิ่มขึ้น 60-68 เปอร์เซ็นต์ และ residual activity ของไอโซไซม์ 3 และ 4 เพิ่มขึ้นเพียง 17 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12) แสดงว่า กรดอะมิโนทริปโตเฟนน่าจะอยู่ในบริเวณเร่งของทั้ง 4 ไอโซไซม์ โดยเฉพาะในไอโซไซม์ 1 และ 2 ทริปโตเฟนอยู่ในตำแหน่งที่มีความสำคัญต่อแอคติวิตีของไอโซไซม์มาก

### กรดอะมิโนฮิสติดีน

การดัดแปลงหมู่อิมิดาโซลของฮิสติดีนใน CGTase แต่ละไอโซไซม์ด้วย DEP ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า แอคติวิตีของไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ สูญเสียไปเกือบจะทั้งหมด เมื่อทำการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DEP ในการดัดแปลงไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.325-2.0 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองตามตารางที่ 13 พบว่า แอคติวิตีของไอโซไซม์ 1, 2, 3 และ 4 สูญเสียไป 50.4, 49.1, 50.0 และ 59.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถ้ากรดอะมิโนฮิสติดีนเกี่ยวข้องที่บริเวณเร่งของไอโซไซม์ทั้ง 4 ไอโซไซม์ การดัดแปลงฮิสติดีนด้วย DEP ในสถานะที่มีและไม่มีสับสเตรทป้องกันควรให้ผลการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลอง พบว่า ในสถานะที่ป้องกันบริเวณเร่งของไอโซไซม์ด้วยสับสเตรท residual activity ของไอโซไซม์ 1, 2, 3 และ 4 จะเพิ่มขึ้น 24.6, 17.0, 42.0 และ 35.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่ากรดอะมิโนฮิสติดีนอยู่ในบริเวณเร่งของทั้ง 4 ไอโซไซม์

ตารางที่ 12. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes by NBS

Compound added	% Residual activity		Average
	I	II	
1) None			
-Isozyme 1	100	100	100
-Isozyme 2	100	100	100
-Isozyme 3	100	100	100
-Isozyme 4	100	100	100
2) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD			
-Isozyme 1	94.4	96.1	95.3
-Isozyme 2	95.6	95.8	95.7
-Isozyme 3	93.7	94.4	94.1
-Isozyme 4	91.4	93.0	92.2
3) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD, then 0.05 mM NBS			
-Isozyme 1	73.4	70.3	71.9
-Isozyme 2	73.2	78.6	75.9
-Isozyme 3	40.9	42.3	41.6
-Isozyme 4	42.2	44.6	43.4
4) 0.05 mM NBS			
-Isozyme 1	8.6	11.9	10.3
-Isozyme 2	8.9	7.1	8.0
-Isozyme 3	23.4	26.8	25.1
-Isozyme 4	11.5	16.6	14.1

Numbers under I and II are duplicate values

ตารางที่ 13. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activities of CGTase isozymes by DEP

Compound added	% Residual		activity
	I	II	Average
1) None			
-Isozyme 1	100	100	100
-Isozyme 2	100	100	100
-Isozyme 3	100	100	100
-Isozyme 4	100	100	100
2) 25 mM Methyl- $\beta$ -CD			
-Isozyme 1	99.5	97.6	98.6
-Isozyme 2	94.0	90.4	92.2
-Isozyme 3	100	98.3	99.2
-Isozyme 4	100	100	100
3)			
-25 mM Methyl- $\beta$ -CD, then 0.325 mM DEP ; Isozyme 1	77.5	70.8	74.2
-25 mM Methyl- $\beta$ -CD, then 2 mM DEP ; Isozyme 2	66.3	68.1	67.2
-25 mM Methyl- $\beta$ -CD, then 0.75 mM DEP ; Isozyme 3	93.5	88.7	91.1
-25 mM Methyl- $\beta$ -CD, then 2 mM DEP ; Isozyme 4	78.9	74.2	76.6
4)			
-0.325 mM DEP ; Isozyme 1	50.3	48.9	49.6
-2 mM DEP ; Isozyme 2	48.3	53.4	50.9
-0.75 mM DEP ; Isozyme 3	50.0	48.9	49.5
-2 mM DEP ; Isozyme 4	42.1	40.9	41.5

Numbers under I and II are duplicate values

### ตอนที่ 3 ผลของไกลโคซิเลชันต่อโครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์

ในการตรวจสอบว่าไกลโคซิเลชันมีความสำคัญต่อโครงสร้างและแอกติวิตีของเอนไซม์หรือไม่อย่างไร ได้ทำการทดลองโดยการใส่เอนไซม์ที่มีความสามารถตัดสายโกลิโกแซคคาไรด์ (deglycosylation) ที่ต่อแบบ N-linked อยู่กับโปรตีน 2 ชนิด คือ เอนไซม์ PNGase F และ Endo H บ่มกับเอนไซม์ CGTase ทั้งในรูปแบบ partially purified (PE) และรูปเอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกเป็น 4 ไอโซไซม์แล้ว ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยวัดแอกติวิตีที่เหลือของ CGTase และวิเคราะห์โครงสร้างที่เปลี่ยนไปโดยติดตามรูปแบบโปรตีนบนพอลิอะคริลามิเดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งในระบบเสียสภาพและไม่เสียสภาพ

ในการตรวจสอบความสำคัญของ O-linked glycosylation ได้ทำการทดลองโดยใช้สารเคมีที่สามารถตัดโกลิโกแซคคาไรด์ที่ต่อแบบ N-linked ได้ด้วย คือ Trifluoromethanesulfonic acid (TFMS) บ่มกับ CGTase ในรูปบริสุทธิ์บางส่วน (PE) และไอโซไซม์ทั้ง 4 แล้วตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยติดตามรูปแบบโปรตีนบนพอลิอะคริลามิเดเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสระบบเสียสภาพ (SDS PAGE) และได้ทดลองวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วย

#### ผลของ Endo H

จากการวัดแอกติวิตีของ CGTase เมื่อบ่มด้วย 100 mU/ml Endo H (treatment) และไม่ได้บ่ม (control) พบว่า Endo H ไม่มีผลต่อแอกติวิตีของ CGTase ในรูป PE, ไอโซไซม์ 2 และ 4 (ตารางที่ 14) แต่มีผลทำให้แอกติวิตีของไอโซไซม์ 3 ลดลง 17%

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค native PAGE พบว่าเอนไซม์ Endo H 100 mU/ml ไม่ทำให้การวิ่งบนแผ่นเจลของ CGTase ทั้งในรูป PE และไอโซไซม์ทั้ง 4 เปลี่ยนไป (รูปที่ 7 - เปรียบเทียบ lane 1 กับ 2 สำหรับไอโซไซม์ 1, lane 3 กับ 4 สำหรับไอโซไซม์ 2, lane 5 กับ 6 สำหรับไอโซไซม์ 3, lane 7 กับ 8 สำหรับไอโซไซม์ 4 และ lane 9 กับ 10 สำหรับ PE) เมื่อใช้ positive control คือ ovalbumin บ่มกับ Endo H พบว่า mobility ของ ovalbumin ไม่เปลี่ยนแปลง ไม่ว่าจะใช้ในรูปเสียสภาพ (denatured) หรือไม่เสียสภาพ (nondenatured) (รูปที่ 10 - เปรียบเทียบ lane 1 กับ 2, 3 และ lane 4 กับ 5, 6)

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS PAGE ผลการทดลองคล้ายกับการวิเคราะห์โดย native PAGE คือ เอนไซม์ Endo H ไม่มีผลต่อ mobility ของ CGTase ในรูป PE รวมทั้ง CGTase แต่ละไอโซไซม์ (รูปที่ 8 - เปรียบเทียบ lane 2 กับ 3 สำหรับไอโซไซม์ 1, lane 4 กับ 5 สำหรับไอโซไซม์ 2, lane 6 กับ 7 สำหรับไอโซไซม์ 3, lane 8 กับ 9 สำหรับไอโซไซม์ 4 และ lane 10 กับ 11 สำหรับ PE) ในขณะที่การ treat invertase (positive control) ด้วย Endo H ที่ความเข้มข้น 50-200 mU/ml ในสถานะเดียวกับที่ treat CGTase กับ Endo H ไม่ทำให้ mobility ของ invertase เปลี่ยนไป

ตารางที่14 Dextrinizing activity of CGTase after deglycosylation by Endo H

Sample	Endo H (mU/ml)	Dextrinizing activity (U/ml)		
		control	treatment	%decrease
PE	100	803.4	808.8	-
Isozyme 1	100	350.4	348.9	-
Isozyme 2	100	115.6	117.3	-
Isozyme3	100	79.5	66.0	17.0
Isozyme 4	100	44.3	45.0	-

The activity values are averaged from two separate measurements

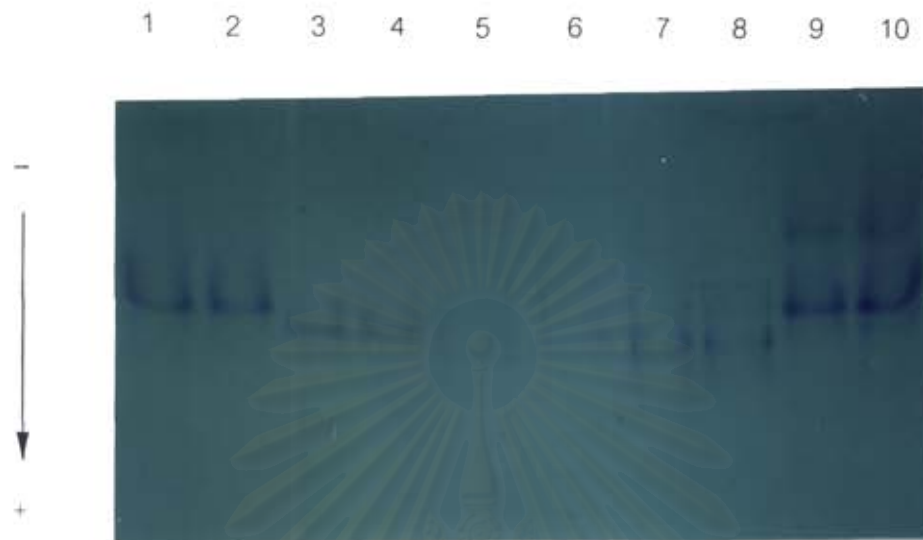
PE : partially purified CGTase

ตารางที่15 Dextrinizing activity of CGTase after deglycosylation by PNGase F

Sample	PNGase F (mU/ml)	Dextrinizing activity (U/ml)		
		control	treatment	%decrease
PE	3,000	708.2	705.2	-
Isozyme 1	6,000	180.5	183.6	-
Isozyme 2	6,000	61.9	60.1	-
Isozyme3	6,000	70.0	49.9	28.7
Isozyme 4	6,000	31.7	23.4	26.2

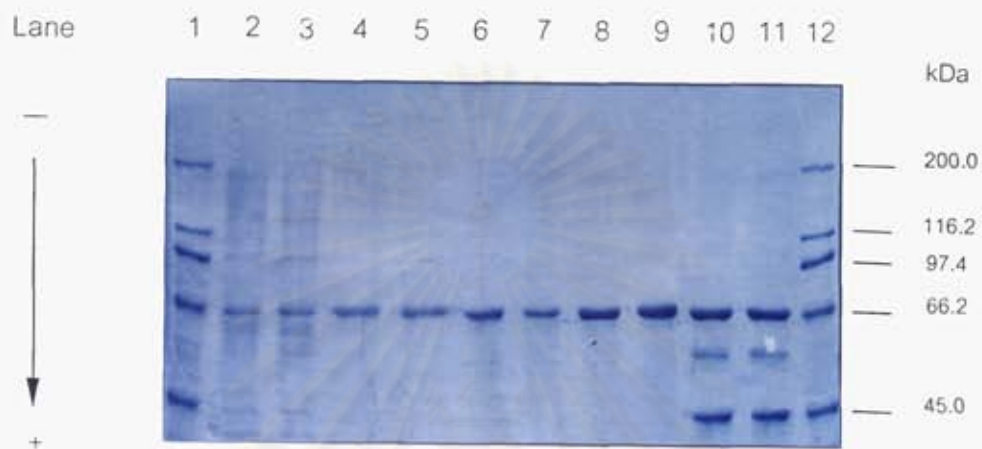
The activity values are averaged from two separate measurements

PE : partially purified CGTase



รูปที่ 7 Native PAGE of CGTase treated with 100 mU/ml Endo H

- |         |                   |
|---------|-------------------|
| lane 1  | isozyme 1         |
| lane 2  | treated isozyme 1 |
| lane 3  | isozyme 2         |
| lane 4  | treated isozyme 2 |
| lane 5  | isozyme 3         |
| lane 6  | treated isozyme 3 |
| lane 7  | isozyme 4         |
| lane 8  | treated isozyme 4 |
| lane 9  | PE                |
| lane 10 | treated PE        |
- (PE = partially purified enzyme)



รูปที่ 8 SDS-PAGE of CGTase treated with 100 mU/ml Endo H

lane 1,12 Protein molecular weight marker [myosin (200.0 kDa,  $\beta$ -galactosidase (116.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), and ovalbumin (45.0 kDa)]

lane 2 isozyme 1

lane 3 treated isozyme 1

lane 4 isozyme 2

lane 5 treated isozyme 2

lane 6 isozyme 3

lane 7 treated isozyme 3

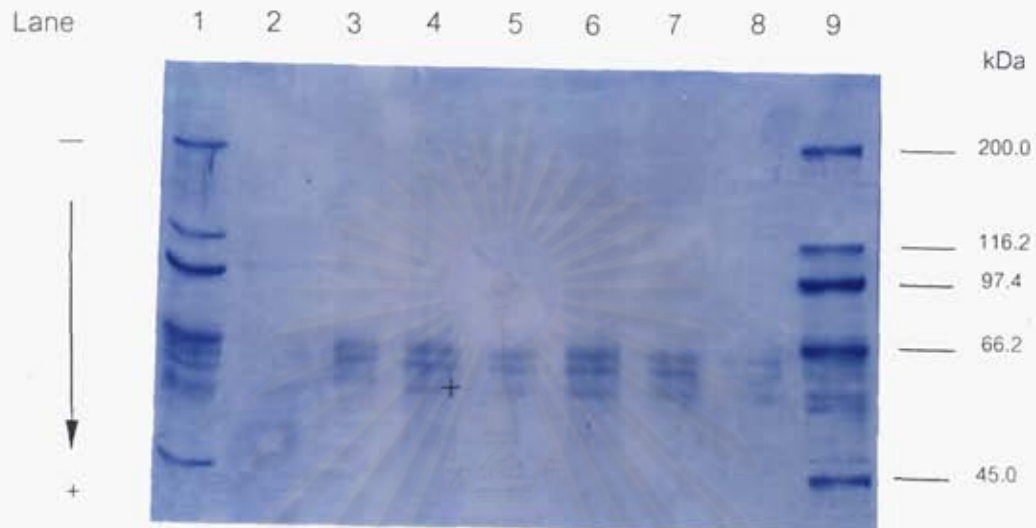
lane 8 isozyme 4

lane 9 treated isozyme 4

lane 10 PE

lane 11 treated PE

(PE = partially purified enzyme)



รูปที่ 9 SDS-PAGE of invertase treated with Endo H

lane 1,9 Protein molecular weight marker [myosin (200.0 kDa,  $\beta$ -galactosidase (116.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), and ovalbumin (45.0 kDa);

lane 2 invertase

lane 3 nondenatured invertase treated with Endo H 50 mU/ml

lane 4 nondenatured invertase treated with Endo H 100 mU/ml

lane 5 nondenatured invertase treated with Endo H 200 mU/ml

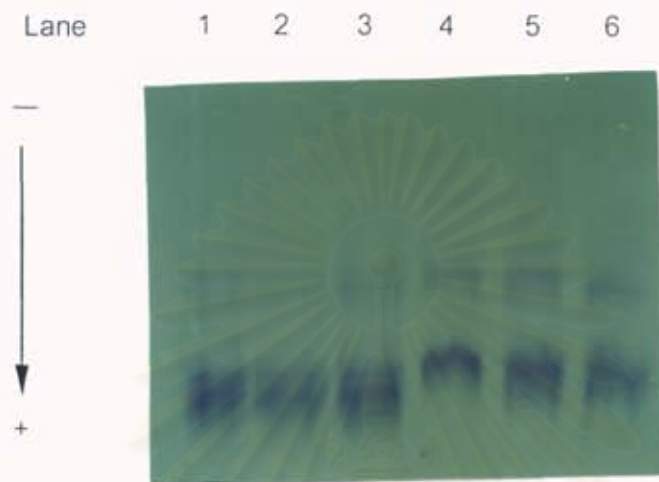
lane 6 denatured invertase treated with Endo H 50 mU/ml

lane 7 denatured invertase treated with Endo H 100 mU/ml

lane 8 denatured invertase treated with Endo H 200 mU/ml

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 10 Native PAGE of ovalbumin treated with Endo H

lane 1	nondenatured ovalbumin
lane 2	nondenatured ovalbumin treated with Endo H 100 mU/ml
lane 3	nondenatured ovalbumin treated with Endo H 500 mU/ml
lane 4	denatured ovalbumin
lane 5	denatured ovalbumin treated with Endo H 100 mU/ml
lane 6	denatured ovalbumin treated with Endo H 500 mU/ml

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไม่ว่าจะใช้ invertase ในรูปเสียสภาพหรือไม่เสียสภาพ (รูปที่ 9 – เปรียบเทียบ lane 2 กับ 3, 4 และ 5 และ lane 2 กับ 6, 7 และ 8) แต่เมื่อ treat ovalbumin ด้วย Endo H ที่ความเข้มข้น 100-500 mU/ml พบว่า mobility ของ ovalbumin เปลี่ยนไป ไม่ว่าจะใช้ ovalbumin ในรูปเสียสภาพหรือไม่เสียสภาพ (รูปที่ 11 – เปรียบเทียบ lane 2 กับ 3, 4 และ lane 5 กับ 6, 7)

#### ผลของ PNGase F

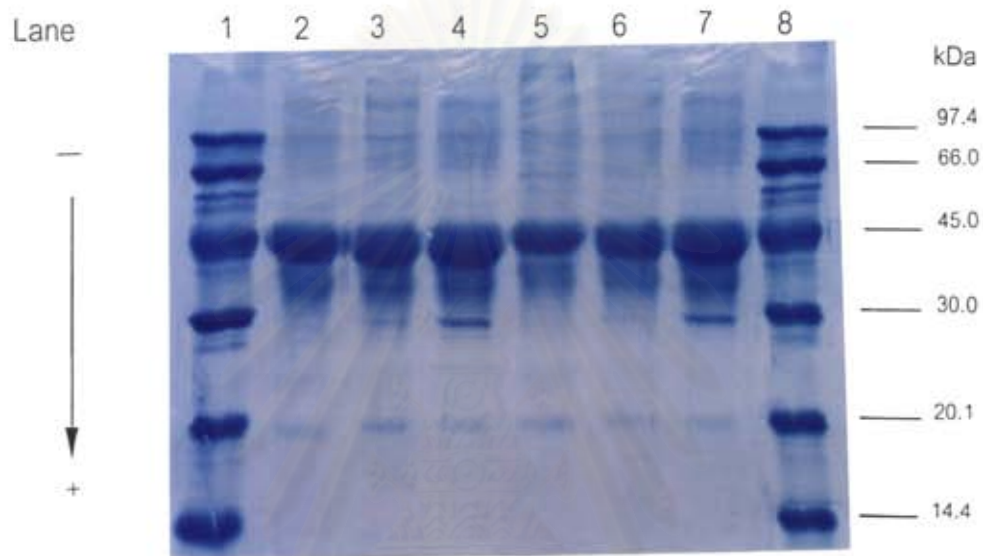
จากการวัดแอกติวิตีของ CGTase โดยใช้ Dextrinizing activity assay เปรียบเทียบเมื่อต้มด้วย PNGase F (treatment) กับไม่ได้ต้ม (control) พบว่า PNGase F ไม่ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ในรูป PE ลดลง เมื่อใช้ 3000 mU/ml PNGase F (ตารางที่ 15) เมื่อตรวจสอบผลต่อ CGTase บริสุทธิ์ในรูปแยกออกเป็น 4 ไอโซฟอร์ม พบว่า PNGase F ทำให้แอกติวิตีของไอโซฟอร์ม 3 และ 4 ลดลงประมาณ 16- 28%

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค native PAGE พบว่าเอนไซม์ PNGase F 6000 mU/ml ไม่ทำให้การวิ่งบนแผ่นเจลของ CGTase ในฟอร์ม PE ทั้งในรูปไม่เสียสภาพและเสียสภาพ เปลี่ยนไป (รูปที่ 12 – เปรียบเทียบ lane 3 กับ 4 และ lane 7 กับ 8) ผลนี้แสดงว่า CGTase ในรูปเสียสภาพและไม่เสียสภาพให้ผลไม่ต่างกัน ดังนั้นเมื่อแยก CGTase ออกเป็น 4 ไอโซฟอร์ม แล้ว treat ด้วย PNGase F จึงใช้เฉพาะไอโซฟอร์มสภาพธรรมชาติ (รูปที่ 14) ผลการทดลองพบว่า PNGase F ก็ไม่ทำให้การวิ่งบนแผ่นเจลของแต่ละไอโซฟอร์มเปลี่ยนไปเช่นกัน (รูปที่ 14 – เปรียบเทียบ lane 3 กับ 4 สำหรับไอโซฟอร์ม 1, lane 5 กับ 6 สำหรับไอโซฟอร์ม 2, lane 7 กับ 8 สำหรับไอโซฟอร์ม 3 และ lane 9 กับ 10 สำหรับไอโซฟอร์ม 4) ในการทดลองได้ใช้ human transferrin (HTF) เป็น positive control ซึ่งการวิเคราะห์โดย native PAGE ไม่เห็นผลการเปลี่ยนแปลง mobility ชัดเจนเหมือนใน SDS PAGE

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS PAGE ผลการทดลองคล้ายกับการวิเคราะห์โดย native PAGE คือ เอนไซม์ PNGaseF ไม่มีผลต่อ mobility ของ CGTase ที่บริสุทธิ์บางลอน (PE) (รูปที่ 13 – เปรียบเทียบ lane 4 กับ 5 และ lane 8 กับ 9) รวมทั้ง CGTase แต่ละไอโซฟอร์ม (รูปที่ 15 – เปรียบเทียบ lane 4 กับ 5 สำหรับไอโซฟอร์ม 1, lane 6 กับ 7 สำหรับไอโซฟอร์ม 2, lane 8 กับ 9 สำหรับไอโซฟอร์ม 3 และ lane 10 กับ 11 สำหรับไอโซฟอร์ม 4) ในขณะที่การ treat HTF ด้วย PNGase F ที่ความเข้มข้น 3000 mU/ml ซึ่งต่ำกว่าที่ใช้ treat CGTase ทำให้ mobility ของ HTF เปลี่ยนไปอย่างชัดเจนไม่ว่าจะใช้ HTF ในรูปเสียสภาพหรือไม่เสียสภาพ (รูปที่ 13 – เปรียบเทียบ lane 2 กับ 3 และ lane 6 กับ 7)

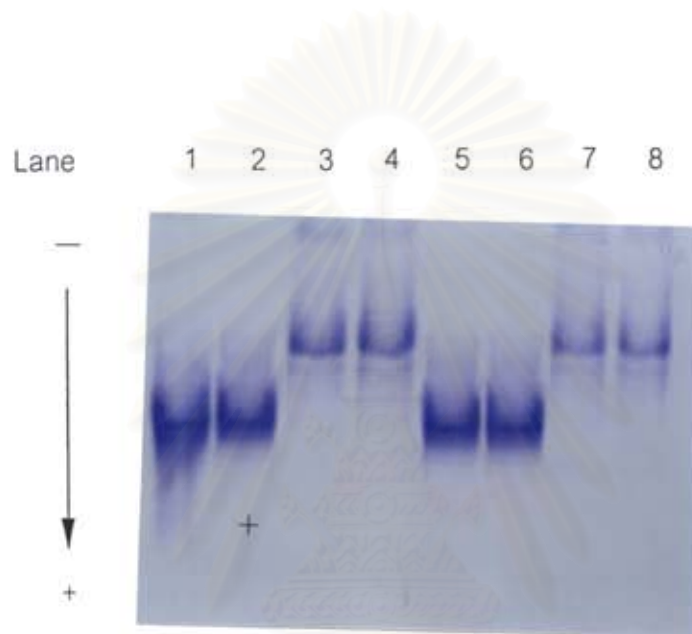
#### ผลของ TFMS

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS PAGE พบว่า TFMS ไม่ทำให้การวิ่งบนแผ่นเจลของ CGTase ทั้งในรูป PE และไอโซฟอร์มทั้ง 4 เปลี่ยนไป (รูปที่ 16 – เปรียบเทียบ lane 2 กับ 3



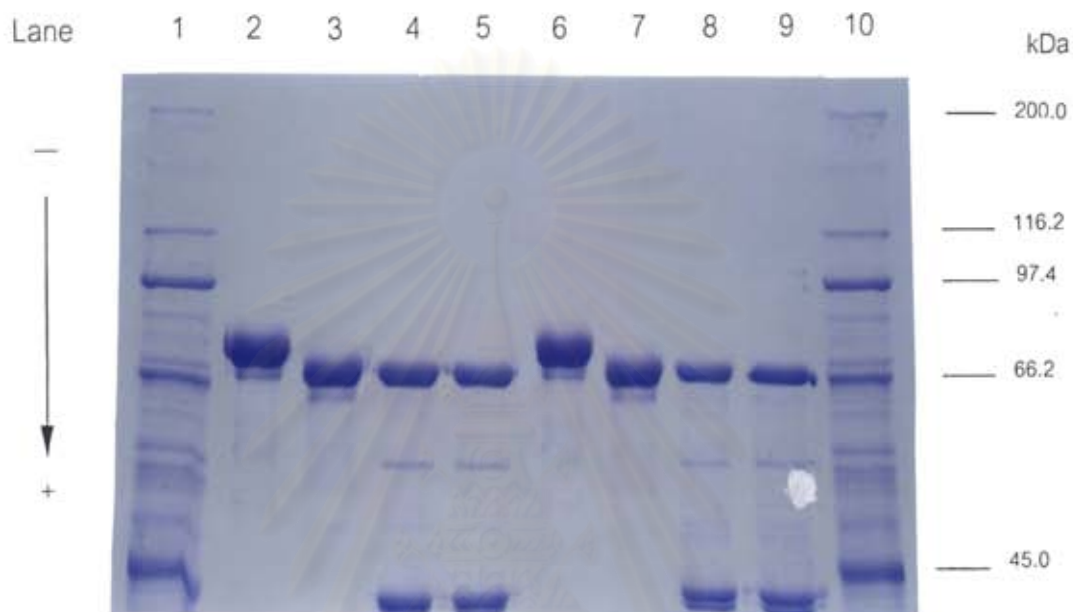
รูปที่ 11 SDS-PAGE of ovalbumin treated with Endo H

- lane 1,8 Protein molecular weight marker [phosphorylase b (97.4 kDa), albumin 66.0 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), carbonic anhydrase (30.0 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa)]
- lane 2 nondenatured ovalbumin
- lane 3 nondenatured ovalbumin treated with Endo H 100 mU/ml
- lane 4 nondenatured ovalbumin treated with Endo H 500 mU/ml
- lane 5 denatured ovalbumin
- lane 6 denatured ovalbumin treated with Endo H 100 mU/ml
- lane 7 denatured ovalbumin treated with Endo H 500 mU/ml



รูปที่ 12 Native PAGE of human-transferrin and CGTase (PE) treated with PNGase F

- |        |   |
|--------|---|
| lane 1 | nondenatured human-transferrin (positive control)               |
| lane 2 | nondenatured human-transferrin treated with PNGase F 3000 mU/ml |
| lane 3 | nondenatured PE   |
| lane 4 | nondenatured PE treated with PNGase F 6000 mU/ml                |
| lane 5 | denatured human-transferrin (positive control)                  |
| lane 6 | denatured human-transferrin treated with PNGase F 3000 mU/ml    |
| lane 7 | denatured PE  |
| lane 8 | denatured PE treated with PNGase F 6000 mU/ml                   |
- (PE = partially purified enzyme)



รูปที่ 13 SDS-PAGE of human-transferrin and CGTase (PE) treated with PNGase F

lane 1,10 Protein molecular weight marker [myosin (200.0 kDa,  $\beta$ -galactosidase (116.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), and ovalbumin (45.0 kDa)]

lane 2 nondenatured human-transferrin (positive control)

lane 3 nondenatured human-transferrin treated with PNGase F 3000 mU/ml

lane 4 nondenatured PE

lane 5 nondenatured PE treated with PNGase F 6000 mU/ml

lane 6 denatured human-transferrin (positive control)

lane 7 denatured human-transferrin treated with PNGase F 3000 mU/ml

lane 8 denatured PE

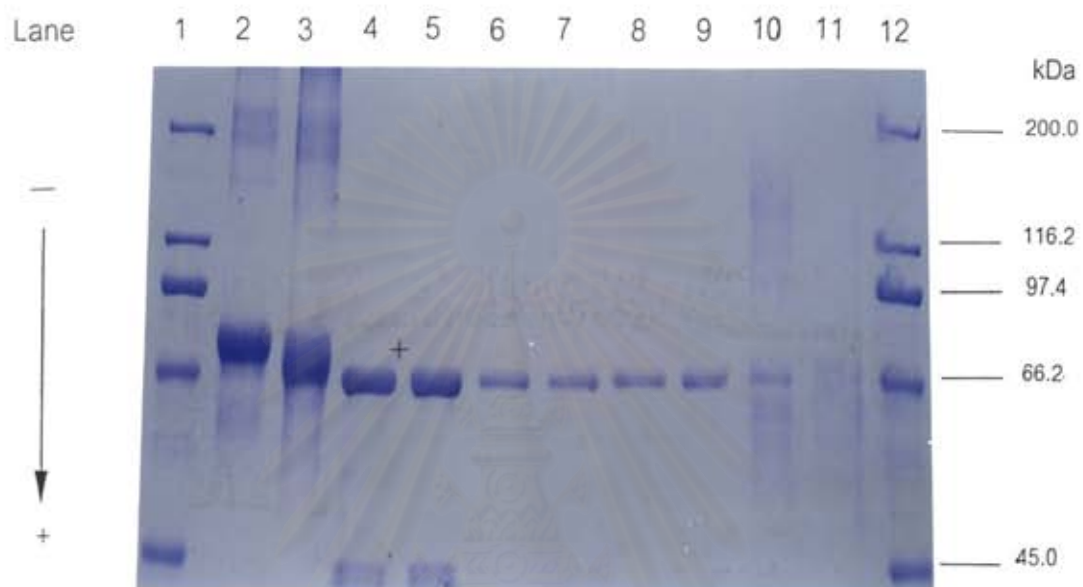
lane 9 denatured PE treated with PNGase F 6000 mU/ml

(PE = partially purified enzyme)



รูปที่ 14 Native PAGE of human-transferrin and CGTase isozymes treated with PNGase F

- |         |   |
|---------|---|
| lane 1  | nondenatured human-transferrin (positive control)               |
| lane 2  | nondenatured human-transferrin treated with PNGase F 3000 mU/ml |
| lane 3  | nondenatured isozyme 1  |
| lane 4  | nondenatured isozyme 1 treated with PNGase F 6000 mU/ml         |
| lane 5  | nondenatured isozyme 2  |
| lane 6  | nondenatured isozyme 2 treated with PNGase F 6000 mU/ml         |
| lane 7  | nondenatured isozyme 3  |
| lane 8  | nondenatured isozyme 3 treated with PNGase F 6000 mU/ml         |
| lane 9  | nondenatured isozyme 4  |
| lane 10 | nondenatured isozyme 4 treated with PNGase F 6000 mU/ml         |



รูปที่ 15 SDS-PAGE of human-transferrin and CGTase isozymes treated with PNGase F

lane 1,12 Protein molecular weight marker [myosin (200.0 kDa,  $\beta$ -galactosidase (116.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), and ovalbumin (45.0 kDa)]

lane 2 nondenatured human-transferrin (positive control)

lane 3 nondenatured human-transferrin treated with PNGase F 3000 mU/ml

lane 4 nondenatured isozyme 1

lane 5 nondenatured isozyme 1 treated with PNGase F 6000 mU/ml

lane 6 nondenatured isozyme 2

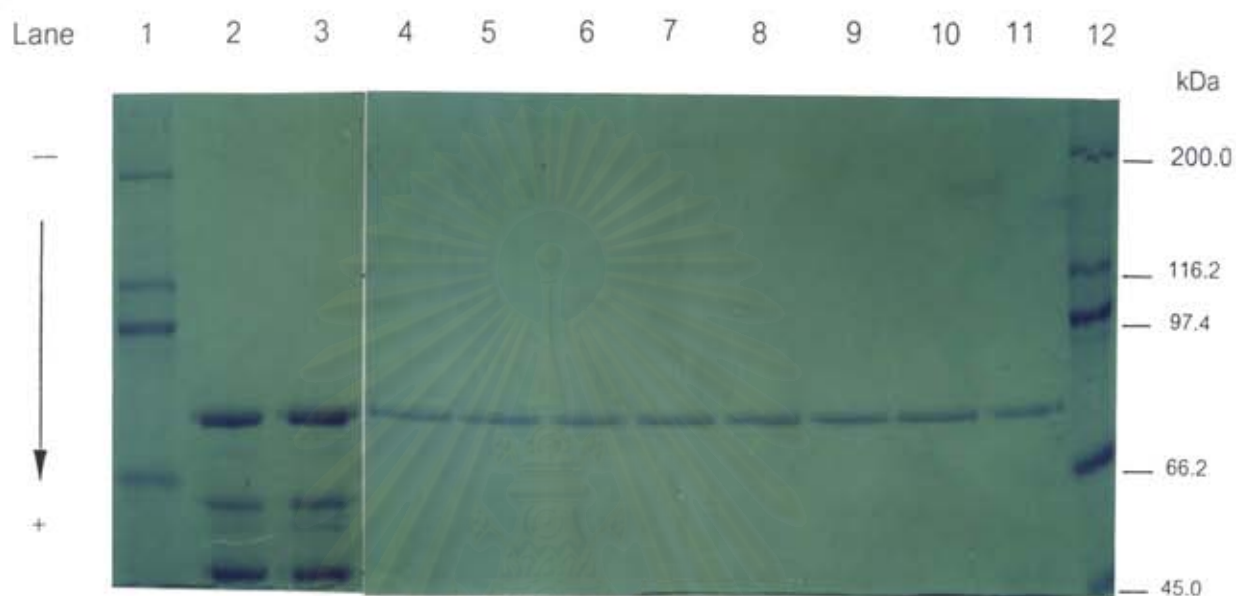
lane 7 nondenatured isozyme 2 treated with PNGase F 6000 mU/ml

lane 8 nondenatured isozyme 3

lane 9 nondenatured isozyme 3 treated with PNGase F 6000 mU/ml

lane 10 nondenatured isozyme 4

lane 11 nondenatured isozyme 4 treated with PNGase F 6000 mU/ml



รูปที่ 16 SDS-PAGE of CGTase treated with TFMS

- lane 1,12 Protein molecular weight marker [myosin (200.0 kDa,  $\beta$ -galactosidase (116.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), and ovalbumin (45.0 kDa)]
- lane 2 PE
- lane 3 treated PE
- lane 4 isozyme 1
- lane 5 treated isozyme 1
- lane 6 isozyme 2
- lane 7 treated isozyme 2
- lane 8 isozyme 3
- lane 9 treated isozyme 3
- lane 10 isozyme 4
- lane 11 treated isozyme 4

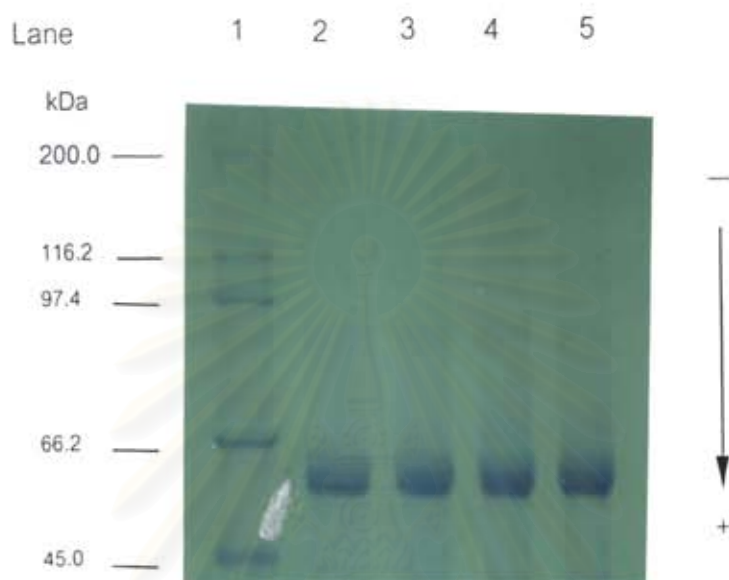


สำหรับ PE, lane 4 กับ 5 สำหรับไอโซไซม์ 1, lane 6 กับ 7 สำหรับไอโซไซม์ 2, lane 8 กับ 9 สำหรับไอโซไซม์ 3 และ lane 10 กับ 11 สำหรับไอโซไซม์ 4) ในการทดลองได้ใช้โปรตีน 2 ชนิดซึ่งมีรายงานว่า มี O-kinked oligosaccharides คือเอนไซม์ peroxidase จากรากมันสำปะหลัง (ในรูปแบบบริสุทธิ์บางส่วน) และ royal jelly protein (ในรูปแบบที่มีความบริสุทธิ์สูง) บ่มกับ TFMS เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 24 ชั่วโมง แล้ว run SDS PAGE ซึ่งพบว่ามองไม่เห็นการเปลี่ยนแปลง mobility ของโปรตีนทั้งสอง (รูปที่ 17)

เมื่อไม่สามารถมองเห็นความแตกต่างรูปแบบการวิ่งของ CGTase บน SDS-PAGE ผู้วิจัยจึงทดลองวัดปริมาณน้ำตาลของ CGTase ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการบ่มกับ TFMS ที่เวลาต่างๆ พบว่า ปริมาณน้ำตาลของ CGTase ทั้งในรูป PE และไอโซไซม์ทั้ง 4 ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อใช้โปรตีนที่ใช้เป็น control บ่มกับ TFMS พบว่า ปริมาณน้ำตาลของ peroxidase และ royal jelly protein ลดลง 40 และ 20 % ตามลำดับ หลังจากบ่มนาน 4 ชั่วโมง (รูปที่ 18)

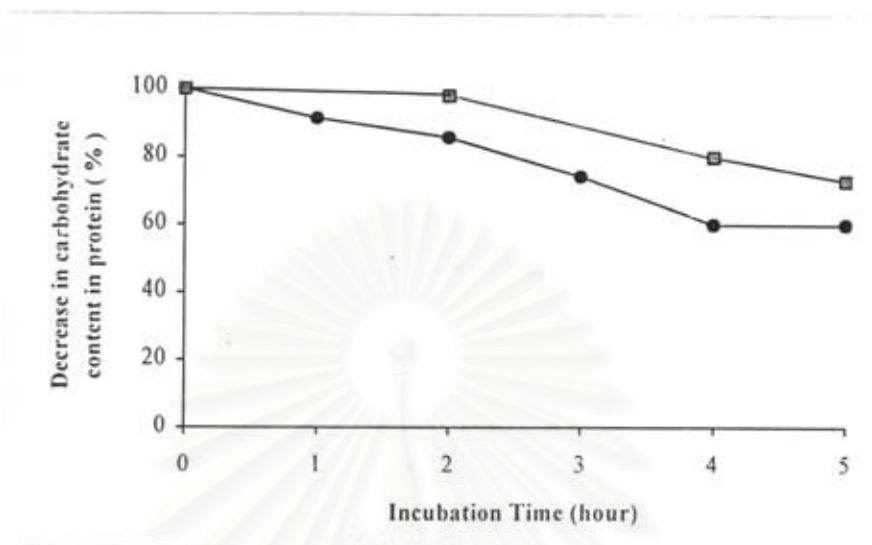


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 SDS-PAGE of royal jelly protein treated with TFMS

- lane 1 Protein molecular weight marker [myosin (200.0 kDa,  $\beta$ -galactosidase (116.2 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), and ovalbumin (45.0 kDa)]
- lane 2 royal jelly protein
- lane 3 treated royal jelly protein (2 hr)
- lane 4 treated royal jelly protein (4 hr)
- lane 5 treated royal jelly protein (24 hr)



รูปที่18 Decrease in carbohydrate content in proteins after incubation with TFMS for different time period.

●—● Peroxidase      ■—■ Royal jelly protein

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### ตอนที่ 4 การตรวจสอบเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของไอโซไซม์

เมื่อย่อยไอโซไซม์ทั้ง 4 ด้วยเอนไซม์ trypsin แล้วตรวจสอบเพปไทด์ที่เกิดขึ้นด้วย reverse phase  $C_{18}$  HPLC คอลัมน์ ตามวิธีการทดลองในข้อ 9 ในบทวิธีการวิจัย ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 19 a-d ซึ่งเป็น profile ของเพปไทด์ที่เกิดจากการย่อยไอโซไซม์ 1 ถึง 4 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบพีคที่เกิดขึ้นในช่วง 30 นาที จะเห็นว่า ทุก profile มีพีคสูงมาก 4 พีค (ประมาณ 400-1000 milliAbsorbance Unit, mAU) ที่ประมาณ retention time ( $R_t$ ) 2.8 ถึง 4.3 นาที ซึ่งคาดว่า เป็น solvent peaks ขณะที่ทุกไอโซไซม์มีเพปไทด์พีคที่อยู่ในช่วง 10-100 mAU ประมาณ 12 พีคในระหว่าง  $R_t$  6.4-27.6 นาที ซึ่งส่วนใหญ่ถูกชะออกมาที่  $R_t$  เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน ความแตกต่างของแต่ละ ไอโซไซม์ที่สังเกตได้ เป็นเพียงความสูงของพีคที่แตกต่างกันมากบ้างน้อยบ้าง ตารางที่ 16 เป็นการสรุปเพปไทด์พีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 10 –100 mUA ของแต่ละไอโซฟอร์ม เพื่อความชัดเจนในการเปรียบเทียบ ได้ให้ตัวเลขซึ่งแสดงระดับความสูงของพีค โดยแบ่งเป็น 5 ระดับคือ สูงสุดเป็น +5 และ ต่ำสุดเป็น +1

จากการวิเคราะห์พีค พบว่าไอโซไซม์ 3 มีพีคสำคัญที่ความสูง (การดูดกลืนแสง) อยู่ในระดับ +4 เพิ่มขึ้นมา 1 พีค คือ ที่  $R_t$  10.8 นาที ซึ่งเมื่อตรวจสอบพีคนี้ ในไอโซไซม์อื่นก็พบว่า มีเช่นกัน แต่เป็นพีคเล็กมากๆ มีความสูงไม่เกิน 10 mUA

ในการตรวจสอบเพปไทด์พีค ได้ทดลองบันทึกสัญญาณต่อจากการชะ 30 นาที พบว่าทุกไอโซไซม์มีพีคกว้างในช่วง 34-36 นาที และพีคแถบสูงที่ 36.6 นาทีเหมือนกัน (รูป 19-e) โดยมีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 300-400 mUA

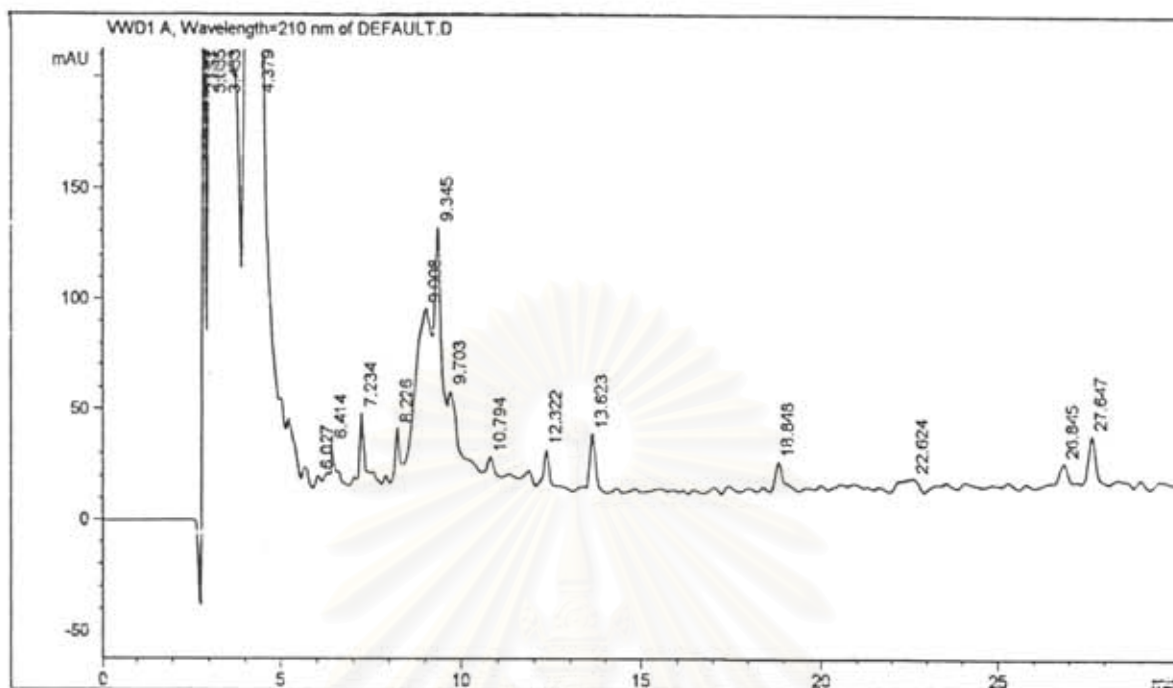
รูปที่ 19 HPLC chromatograms from reverse phase  $C_{18}$  column of the peptides of CGTase isozymes resulting from digestion with trypsin

a-d; digested products of isozymes 1 to 4, respectively. (recording time 30 min)

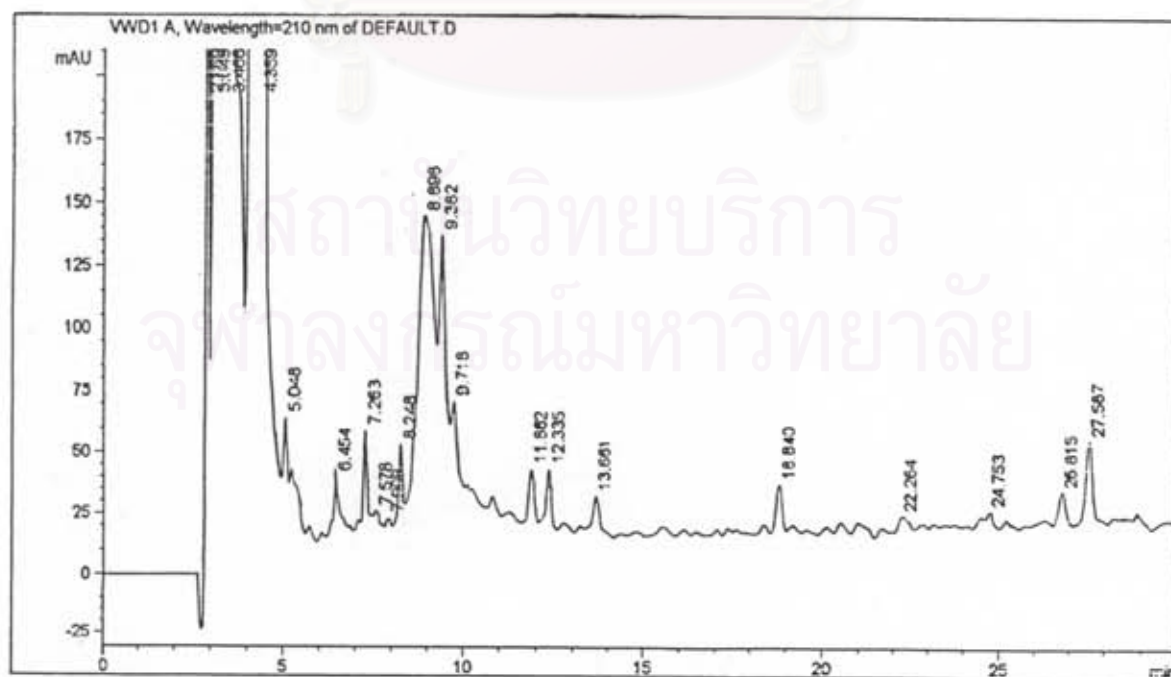
e; digested products of isozyme 3 (recording time 40 min)



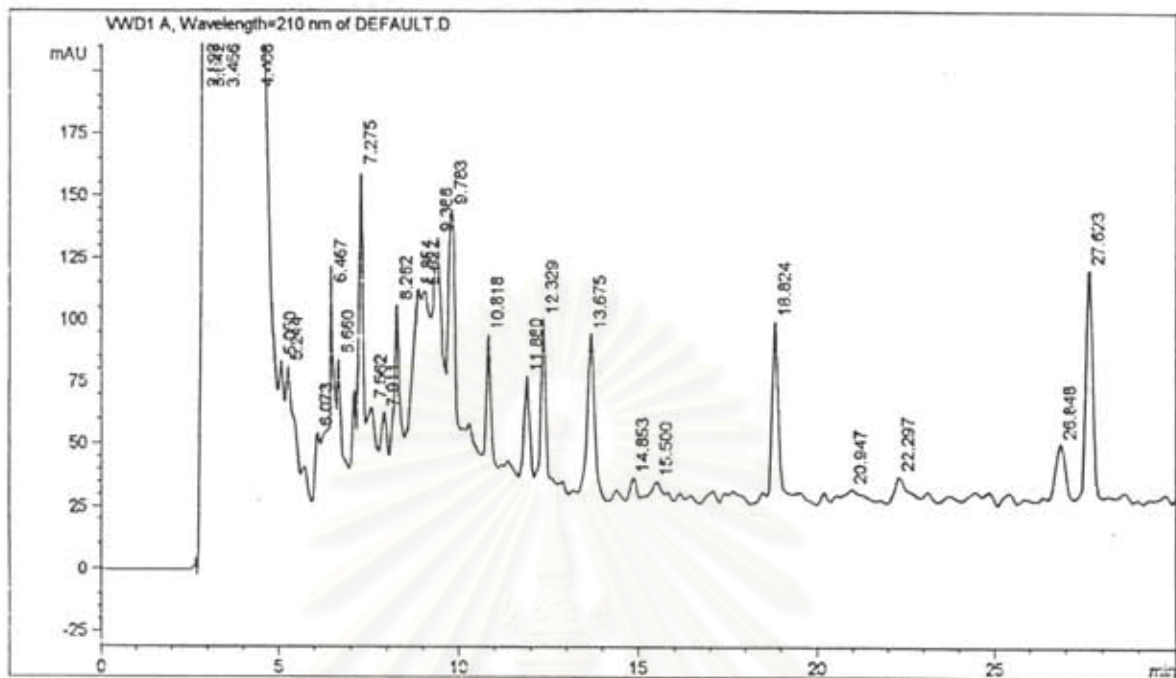
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



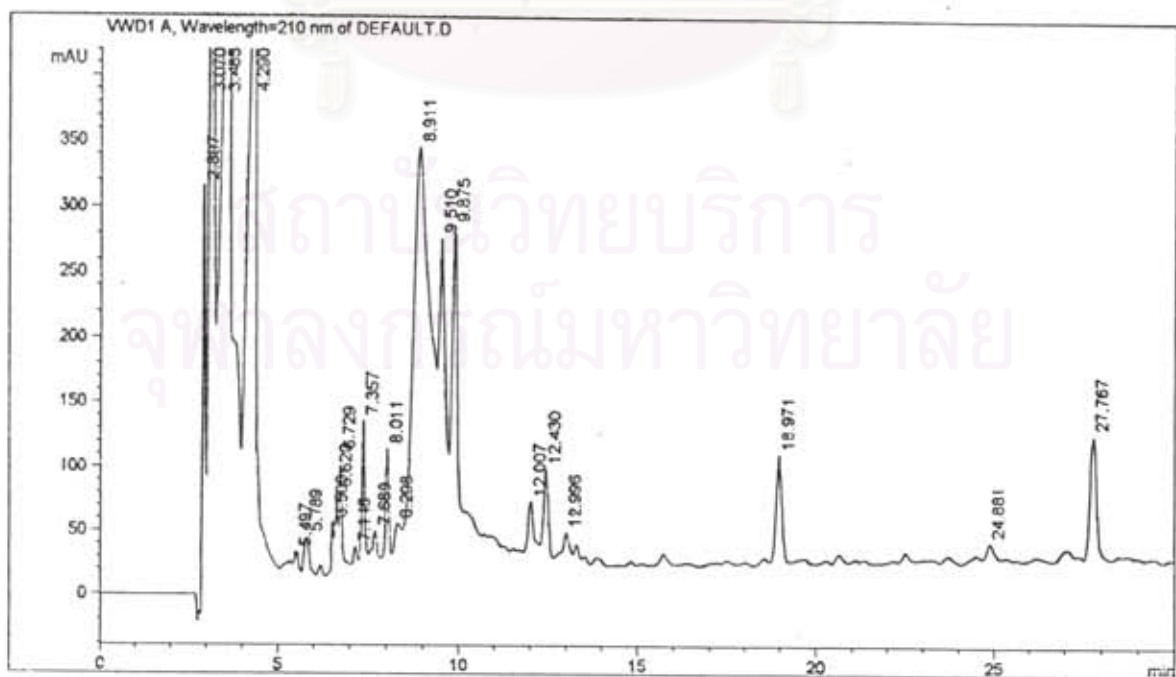
a. digested products of isozyme 1 (recording time 30 min)



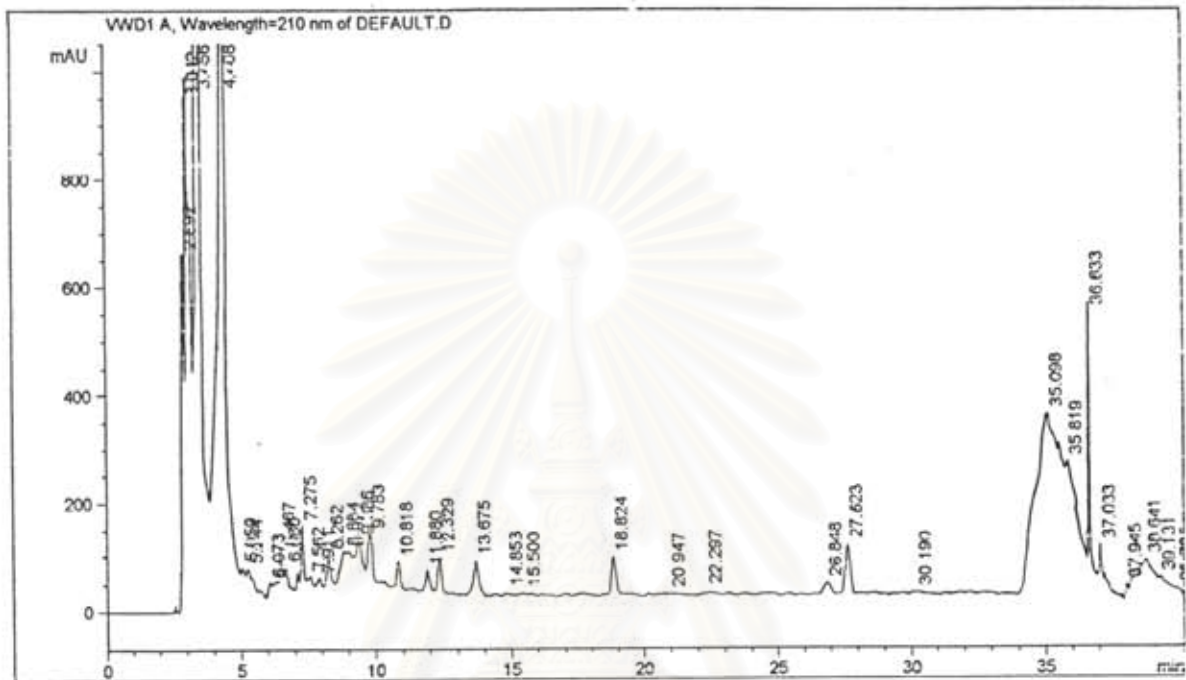
b. digested products of isozyme 2 (recording time 30 min)



c. digested products of isozyme 3 (recording time 30 min)



d. digested products of isozyme 4 (recording time 30 min)



e. digested products of isozyme 3 (recording time 40 min)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 16 Summarization of notable peptide peaks from digested products of CGTase isozymes

Isozyme	$R_t$ of peptide peaks (minutes)												
1	6.4	7.2	8.2	9.0	9.3	9.7	10.7	12.3	13.6	18.8	26.8	27.6	
	+3	+3	+3	+4	+5	+3	↓	+2	+3	+2	+1	+3	
2	6.4	7.2	8.2	8.8	9.3	9.7	11.8	12.3	13.6	18.8	16.8	27.5	
	+2	+2	+2	+5	+4	+3	+3	+3	+2	+3	+2	+3	
3	6.4	7.2	8.2	9.0	9.3	9.7	10.8	11.8	12.3	13.6	18.8	16.8	27.6
	+4	+5	+4	+4	+4	+4	+4	+3	+4	+4	+4	+3	+5
4	6.7	7.3	8.0	8.9	9.5	9.8	12.0	12.4	13.2	18.9	27.0	27.7	
	+3	+3	+3	+5	+4	+4	+1	+2	↓	+3	↓	+3	

Number under  $R_t$  values indicate peak height, highest at +5 to lowest at +1

↓ means very low peak height, lower than 10 mAU

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ตอนที่ 5 การหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของไอโซไซม์

ผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของไอโซไซม์ทั้ง 4 สรุปไว้ในตารางที่ 17 ผลนี้ได้จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์ที่ blot จากการแยกบนแผ่นเจลแบบไม่เสียสภาพ จากผลที่ได้ พบว่าไอโซไซม์ 1 และ 2 มีกรดอะมิโนตำแหน่งต้นๆ (ลำดับที่ 1 ถึง 8) มากกว่า 1 ชนิด บางตำแหน่งเช่น ลำดับที่ 1 ถึง 2 ของไอโซไซม์ 1 มีกรดอะมิโนที่อยู่ใน sequence หลัก ถึง 3 ชนิด ขณะที่ไอโซไซม์ 2 ก็มีกรดอะมิโน ลำดับที่ 1 ถึง 4 ใน sequence หลัก 2-3 ชนิด เช่นกัน ผลนี้ แสดงว่า ไอโซไซม์ 1 และ 2 ที่แยกได้ ประกอบด้วย โปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N แตกต่างกัน 2-3 ชนิด และเมื่อเปรียบเทียบไอโซไซม์ 1 กับ 2 พบว่า กรดอะมิโนใน 4 ตำแหน่งจากปลาย N เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันมาก

ส่วนลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของไอโซไซม์ 3 และ 4 พบว่ามีกรดอะมิโนหลักชนิดเดียว และเมื่อเปรียบเทียบไอโซไซม์ 3 และ 4 กับ 1 และ 2 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนที่พบในไอโซไซม์ 3 และ 4 เหมือนหรือคล้ายกันกับที่พบในไอโซไซม์ 1 และ 2 มาก

เมื่อผลที่ได้จากการใช้ไอโซไซม์ที่ blot จากแผ่นเจลแบบไม่เสียสภาพ ให้ผลการทดลองที่ไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยได้เปลี่ยนวิธีใหม่ โดย run แต่ละไอโซไซม์บน SDS-PAGE แล้ว blot แลบบโปรตีนจากแผ่นเจลแบบเสียสภาพ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของทุกไอโซไซม์ มีลำดับกรดอะมิโน 5 ตัวแรกเหมือนกัน คือ Ala-Pro-Asp-Thr-Ser ซึ่งเหมือนกับ unfractionated enzyme CGTase ก่อนการแยกเป็นไอโซไซม์แต่ละชนิดด้วย preparative gel electrophoresis (ผลการทดลองดังแสดงในภาคผนวก F)

ตารางที่ 17 N-terminal amino acid residues of CGTase isozymes

Residue number	CGTase Isozyme			
	1	2	3	4
1	Asp, Gly, Ala(Leu)	Asp,Leu(Gly,Ala)	Gly, Leu (Asp,Ala)	Leu (Gln, Gly)
2	Thr, Pro, Val (Phe)	Ala, Asn, Val	Asn (Pro, Val)	Ala (Asn, Val)
3	Thr (Lys, Val)	Thr, Gln, Lys(Val)	Lys	Gln (Lys, Thr)
4	Leu (Asn, Phe)	Leu, Pro, Asn	Thr (Asn, Leu)	Asn (Pro)
5	Thr (Lys, Val)		Lys, Thr(Val)	Lys (Thr)
6	Val		Val (Lys)	Val,Pro
7	Gln (Lys, Glu)			
8	Gln, Glu, Val(Asn)			
9	Lys, Val			
10	Phe			

Residues in brackets are of minor sequences

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การอภิปรายผล

*Bacillus circulans* A11 ซึ่งต่อมา reclassified เป็น *Paenibacillus* sp. A11 โดยเทคนิคการวิเคราะห์ยีนของ 16S rRNA (53) เป็นแบคทีเรียที่แยกจากดินในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ในปริมาณสูงเมื่อถูกชักนำด้วยแป้ง (5-6) โดย CGTase นี้ให้  $\beta$ -CD เป็นผลิตภัณฑ์หลักโดยมีอัตราส่วน  $\alpha : \beta : \gamma$  CD เท่ากับ 1:4.6:1.6 (10) หลังจากการทำเอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่า เอนไซม์นี้มี 4 ไอโซไซม์ คือ ไอโซไซม์ 1-4 (11) การศึกษาเรื่องรูปแบบไอโซไซม์ของ CGTase นั้น มีรายงานไม่มากนักเนื่องด้วยเอนไซม์มีปริมาณน้อย และมีความแตกต่างด้านคุณสมบัติที่จะเป็นประโยชน์ต่อการแยกแต่ละไอโซไซม์ออกจากกันน้อย จึงต้องใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงโดยเฉพาะด้านการแยกความแตกต่างของประจุ ที่เคยมีรายงาน ได้แก่ anion exchange HPLC (54) หรือ FPLC (38) เทคนิค isoelectric focusing (37) และ affinity chromatography (39) สำหรับกลุ่มของผู้วิจัย ได้ใช้ preparative gel electrophoresis ซึ่งสามารถแยกไอโซไซม์ทั้ง 4 ออกจากกันได้ (23) โดยไอโซไซม์ 1 เป็นไอโซไซม์หลัก คือ มีปริมาณมาก เมื่อสังเกตจากความเข้มของแถบสี Coomassie จากการวิเคราะห์ด้วย native PAGE รองลงมาคือ ไอโซไซม์ 2, 3 และ 4 ตามลำดับจากการเปรียบเทียบคุณสมบัติเบื้องต้น ทั้ง 4 ไอโซไซม์มีขนาดเท่ากัน คือ 72 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (23) แต่มีประจุสุทธิต่างกัน คือมีค่า pI 4.73, 4.49, 4.40 และ 4.31 ตามลำดับ มีอัตราส่วนผลิตภัณฑ์ไม่เหมือนกัน โดยไอโซไซม์ 1 และ 2 ให้อัตราส่วน  $\alpha : \beta : \gamma$  CD เท่ากับ 9.5:18:5 ส่วนไอโซไซม์ 3 และ 4 ให้อัตราส่วน  $\alpha : \beta : \gamma$  CD เท่ากับ 5:18 :6 และจากการวิเคราะห์ทั้ง 4 รูปแบบโดยการย้อม PAS (periodic schif) พบว่าเป็นไกลโคโปรตีน และเมื่อตรวจสอบปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก ได้ปริมาณต่างกัน คือ 20.5, 18.7, 14.4 และ 46.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาเปรียบเทียบไอโซไซม์ในระดับโมเลกุลให้ละเอียดยิ่งขึ้น เพื่อเข้าใจลักษณะโครงสร้างและการทำงานที่ต่างกัน

### การวิเคราะห์บริเวณเร่ง

การหาข้อมูลบริเวณเร่งของไอโซไซม์ ในงานนี้ ได้ใช้วิธีการตัดแปรด้วยสารเคมีจำเพาะและการป้องกันบริเวณเร่งด้วยลบลเตรทก่อนการตัดแปร โดยใช้สารตัดแปรกรดอะมิโนต่างๆ ที่มักพบว่าเกี่ยวข้องในการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ทั่วไป ได้แก่ กรดอะมิโนที่มีคาร์บอกซิลิก ฮิสติดีน ทริปโตเฟน ไทโรซีน โลซีน เซรีน และซิสเตอีน ซึ่งในจำนวนกรดอะมิโนเหล่านี้ 4 ตัวแรกมีรายงานว่า สำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของ CGTase จากแบคทีเรียต่างชนิด (25-31)

ขั้นตอนแรกเป็นการหากรดอะมิโนจำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยา โดยการดัดแปรหมู่จำเพาะของกรดอะมิโนด้วยสารเคมี หากหลังการดัดแปร มีการสูญเสียแอกติวิตี อาจคาดการณ์ได้ว่า กรดอะมิโนนั้นๆ จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยา ในขั้นตอนที่สอง เพื่อพิสูจน์ว่ากรดอะมิโนเหล่านั้นอยู่ในบริเวณเร่งหรือไม่ ใช้เทคนิคการป้องกันบริเวณเร่งด้วยซับสเตรท (substrate protection) ก่อนการดัดแปรหมู่จำเพาะ หากการป้องกันบริเวณเร่งมีผลให้เอนไซม์คงแสดงแอกติวิตีได้ ประเมินได้ว่ากรดอะมิโนนั้นๆ อยู่ในบริเวณเร่ง (49) นอกจากซับสเตรท อาจใช้สารที่เป็น competitive inhibitor, end product หรือสารอื่นที่มีโครงสร้างคล้ายซับสเตรท ในการป้องกันบริเวณเร่ง ในงานวิจัยนี้ ใช้ methyl- $\beta$ -CD ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของซับสเตรท  $\beta$ -CD ที่ความเข้มข้น 25 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากกว่าค่า  $K_m$  ของ methyl- $\beta$ -CD ต่อ CGTase (unfractionated) ประมาณ 12 เท่า (11)

ผลการทดลอง บ่มแต่ละไอโซไซม์กับสารเคมีดัดแปรหมู่จำเพาะต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 mM (ตารางที่ 7) พบว่า กรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อไอโซไซม์ทั้ง 4 ของ CGTase คือ ทริปโตเฟน ฮิสติดีน และกรดอะมิโนในกลุ่มคาร์บอกซิลิก โดย NBS ซึ่งดัดแปรทริปโตเฟน ทำให้แอกติวิตีของไอโซไซม์ 1 และ 2 สูญเสียไปทั้งหมด ขณะที่ DEP ซึ่งดัดแปรฮิสติดีน ยับยั้งแอกติวิตีทั้งหมดของไอโซไซม์ 1 และ 3 และเมื่อปรับความเข้มข้นของสารดัดแปรที่ใช้ พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้แอกติวิตีลด 50 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 30 นาที ของ NBS เป็นประมาณ 0.05 mM (ตารางที่ 12) ซึ่งต่ำกว่าความเข้มข้นของ DEP (ประมาณ 0.325-2 mM, ตารางที่ 13) แสดงว่าทริปโตเฟนและฮิสติดีนมีความสำคัญต่อแอกติวิตีของ CGTase ไอโซไซม์มาก (ทริปโตเฟนสำคัญต่อไอโซไซม์ 1, 2 และ 4 มากกว่าไอโซไซม์ 3 ขณะที่ ฮิสติดีนสำคัญต่อไอโซไซม์ 1 และ 3 มากกว่า 2 และ 4) และ ทริปโตเฟนอาจสำคัญมากกว่าฮิสติดีนโดยคาดการณ์จากความเข้มข้นที่ใช้ (อย่างไรก็ดี ไม่สามารถยืนยันได้ชัดเจน เนื่องจาก pH ที่ใช้ในการดัดแปรหมู่ฟังก์ชัน ใช้ pH 6.0 เท่ากัน ซึ่ง reactivity ของสารเคมีแต่ละชนิด ในการทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชันจะมากน้อยต่างกัน) (49) สำหรับกรดอะมิโนในกลุ่มคาร์บอกซิลิกซึ่งใช้สาร EDC ในการดัดแปร พบว่าสำคัญรองลงมาจากทริปโตเฟนและ ฮิสติดีน และความสำคัญที่มีต่อแอกติวิตีของไอโซไซม์ทั้ง 4 ไม่ต่างกัน สำหรับไทโรซีน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 30 mM (ตารางที่ 11) ก็พบว่าไม่มีผลต่อแอกติวิตีของทุกไอโซไซม์ โดยมีผลต่อไอโซไซม์ 1 และ 3 มากกว่า 2 และ 4 เมื่อทำการป้องกันบริเวณเร่งของซับสเตรทก่อนการดัดแปรกรดอะมิโน ทริปโตเฟน ฮิสติดีน กรดอะมิโนในกลุ่มคาร์บอกซิลิก และไทโรซีน พบว่า กรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด เกี่ยวข้องอยู่ในบริเวณเร่งของทุกไอโซไซม์

ด้วยการวิเคราะห์ลักษณะเดียวกัน ในการดัดแปรไลซีน และ เซรีน พบว่า ไอโซไซม์ 3 มีไลซีน ขณะที่ ไอโซไซม์ 2 และ 4 มีเซรีน เพิ่มอยู่ในบริเวณเร่งอีกด้วย ในขณะที่ซีสเทอีน ไม่มีความสำคัญต่อแอกติวิตีของทุกไอโซไซม์

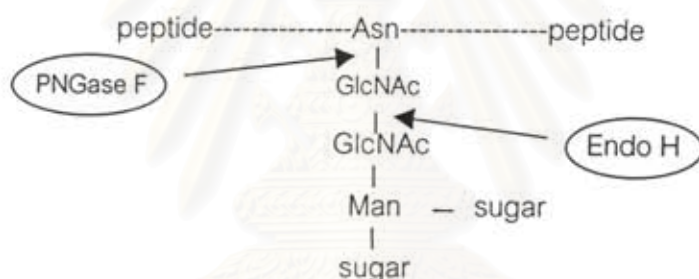
เมื่อเปรียบเทียบบริเวณเร่งของไอโซไซม์นี้กับเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียชนิดอื่น (37-39) พบว่า บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วย กรดอะมิโนสำคัญหลายตัวเหมือนกัน ซึ่งน่าจะเป็นเพราะ CGTase เร่งปฏิกิริยาด้วยกลไกหลายแบบ คือ disproportionation, coupling และ hydrolysis (1) มีรายงานหลายฉบับเรื่องกรดอะมิโนสำคัญในบริเวณเร่งของ CGTase จากแหล่งต่างๆ ดังสรุปใน ตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ในงานวิจัยนี้ มีความแตกต่างจากที่เคยมีรายงาน โดยพบเซรีนใน บริเวณเร่งของไอโซไซม์ 2 และไลซีน ในบริเวณเร่งของไอโซไซม์ 3

### ผลของไกลโคซิเลชันต่อแอกติวิตีและโครงสร้างของไอโซไซม์

การเกิดรูปแบบไอโซไซม์ของ CGTase จาก *Bacillus circulans* A11 ยังไม่ชัดเจนว่า เป็นผลเนื่อง มาจากการถอดรหัสยีนต่างกัน ทำให้ทั้ง 4 รูปแบบมีลำดับกรดอะมิโนต่างกัน หรือเป็นผลจากการเกิด post-translational modification ของเอนไซม์หลังการสังเคราะห์ ซึ่งการดัดแปลงขั้นตอนนี้อาจเกิด จากกระบวนการ glycosylation, phosphorylation หรือ proteolytic digestion เป็นต้น ผู้วิจัยให้ความสนใจศึกษาปฏิกิริยา glycosylation เนื่องจาก Kaskangam (23) รายงานว่าแต่ละไอโซไซม์ของ CGTase มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่างกัน ประกอบกับ CGTase เป็น extracellular enzyme ซึ่งเป็น กลุ่มของโปรตีนที่ต้องผ่านกระบวนการ processing หลังการสร้างเพื่อถูกส่งออกนอกเซลล์ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการเกิดไกลโคซิเลชันของโปรตีนใน prokaryotes ไม่มากนักเมื่อเทียบกับรายงานใน eukaryotes (55)

จากการทดลองใช้เอนไซม์ Endo H ซึ่งมีรายงานว่าย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่ต่อกับโปรตีนด้วย N-linked เมื่อ glycans เป็น high mannose หรือ hybrid oligosaccharide บางชนิด (42) โดยตัดที่ พันธะดังแสดงในรูปที่ 20 เมื่อบ่มกับ CGTase ในรูป PE และไอโซไซม์ พบว่า ไม่ทำให้แอกติวิตีของ PE, ไอโซไซม์ 1, 2 และ 4 เปลี่ยนไป แต่ทำให้แอกติวิตีของไอโซไซม์ 3 เปลี่ยนไปเพียง 17% (ตารางที่ 14) เมื่อวิเคราะห์ผลต่อโครงสร้าง โดยการตรวจสอบรูปแบบการวิ่งบน PAGE พบว่าไม่เห็นผลเปลี่ยนแปลง (รูปที่ 7-8) ในการทำปฏิกิริยากับ Endo H นี้ได้ใช้ invertase ซึ่งมีรายงานว่าถูก Endo H ตัดได้ และมีการเปลี่ยนการวิ่งใน PAGE (56) เป็น positive control แต่ผู้วิจัยไม่สามารถตรวจวัดการเปลี่ยน รูปแบบการวิ่งใน PAGE ได้ ไม่ว่าจะใช้ invertase ในสภาพธรรมชาติ หรือในสภาพ denatured (รูปที่ 9) เนื่องจากมีรายงานว่าบางครั้งโปรตีนในรูป denatured จะมี susceptibility ต่อ Endo H ต่ำกว่า โปรตีนในรูปธรรมชาติ (42) ต่อมาจึงได้ทดลองใช้ ovalbumin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สาย oligosaccharide ที่ต่อแบบ N-linked มีลักษณะเดียวกับ invertase ซึ่งพบว่า deglycosylation ของ ovalbumin ด้วย Endo H ทำให้รูปแบบการวิ่งของโปรตีนบน SDS-PAGE เปลี่ยนไปทั้งในสภาวะที่ใช้ ovalbumin ในรูป denatured และ nondenatured

เมื่อทำ deglycosylation ด้วย Endo H แล้วไม่เห็นผลการเปลี่ยนรูปแบบการวิ่งของ CGTase ไอโซไซม์ ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนชนิดของเอนไซม์ โดยได้ใช้เอนไซม์ PNGase F ซึ่งสามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่ต่อกับโปรตีนด้วย N-linked ตรงพันธะดังแสดงในรูปที่ 20 ไม่ว่า glycans นั้นจะมีโครงสร้างอย่างไร กล่าวคือ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทกว้างกว่า Endo H (42) เมื่อบ่มกับ CGTase ในรูป PE และในรูปไอโซไซม์ทั้ง 4 พบว่า แอคติวิตีของ CGTase ไอโซไซม์ 3 และ 4 ลดลง 26-28 % (ตารางที่ 15) แสดงว่า PNGase F ตัดแซคคาไรด์ที่ต่อแบบ N-linked ที่ Asn ของเอนไซม์ CGTase ได้บ้าง และการกระทำนี้ทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีลดลง ผลนี้ทำให้วิเคราะห์ ได้ว่าแต่ละไอโซไซม์น่าจะมีโครงสร้างต่างกัน จึงมี susceptibility ต่อ PNGase F ต่างกัน สำหรับผลต่อ CGTase ในรูป PE ซึ่งประกอบด้วย ไอโซไซม์ทั้ง 4 รูปแบบ โดยมีปริมาณของไอโซไซม์ 1>2>3>4 ตามลำดับ เนื่องจาก ไอโซไซม์ 1 และ 2 เป็นรูปแบบที่มีมากใน PE ดังนั้น ผลของ PNGase F ต่อ PE จึงคล้ายกับผลต่อไอโซไซม์ 1 และ 2



รูปที่ 20 Action of Endo H and PNGase F

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างโดยเทคนิค PAGE ซึ่งการ run native PAGE จะให้ข้อมูลด้านประจุสุทธิ ขณะที่การ run SDS-PAGE ให้ข้อมูลด้านขนาดของโมเลกุล ผลในรูปที่ 12-15 ซึ่งสรุปได้ว่าการทำ deglycosylation ด้วย PNGase F ไม่ทำให้โครงสร้างของ CGTase ทั้งในรูป PE และรูปไอโซไซม์เปลี่ยน หรือหากเปลี่ยนก็น้อยมากซึ่งไม่สามารถตรวจพบด้วยเทคนิคนี้ โดยการให้ 7-7.5 %gel อย่างไม่ก็ติ ผู้วิจัยได้ใช้ human transferrin เป็น positive control และพบว่าการทดลองในสภาวะเดียวกันกับ CGTase โดยใช้ PNGase F เพียง 3,000 mU/ml (ขณะที่ใช้ 6,000 mU/ml ในกรณี CGTase ) ก็สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงในขนาดของโปรตีน (รูปที่ 13 และ 15) แต่ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงประจุสุทธิ (รูปที่ 12 และ 14) นอกจากนี้ได้ทดลองใช้ HTF และ CGTase ในรูป denatured ด้วย แต่ผลที่ได้ในการทดลองนี้ไม่แตกต่างกับการใช้โปรตีนในสภาพธรรมชาติ

เมื่อใช้สาร TFMS ซึ่งนิยมใช้ในการวิเคราะห์ผลของ O-glycosylation ในโปรตีน (57) พบว่า TFMS ไม่มีผลต่อรูปแบบการวิ่งของ CGTase ทั้งในรูป PE และไอโซไซม์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ในขณะที่

ที่ positive control 2 ชนิด ที่ใช้คือเอนไซม์ peroxidase (จากรากมันสำปะหลังในรูปบริสุทธิ์บางส่วน) และ royal jelly protein (จากน้ำนมผึ้งในรูปบริสุทธิ์สูง) ก็ไม่แสดงผลการเปลี่ยน mobility เช่นกัน ซึ่งผลของ peroxidase ไม่ตรงกับรายงานของ Sornwatana (58) แม้ว่าผู้วิจัยจะใช้สภาวะในการบ่มโปรตีนกับ TFMS เหมือนกับรายงานเดิมก็ตาม อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี ผู้วิจัยได้ทดลองวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต (น้ำตาล) ในโปรตีนหลังการบ่มด้วย TFMS ที่เวลาต่างๆ พบว่า น้ำตาลใน peroxidase และ royal jelly protein ลดลง 40 และ 20 เปอร์เซ็นต์ หลังการบ่ม 4 ชั่วโมงกับ TFMS ในขณะที่ปริมาณใน CGTase (ทั้งในรูป PE และ ไอโซไซม์) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ผลนี้อาจวิเคราะห์ได้ว่าไม่มี O-glycosylation ใน CGTase หรือหากมีก็เป็นสัดส่วนที่น้อยมาก การตัด O-linked ด้วย TFMS ไม่เห็นผลการลดลงของคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุล และการเปลี่ยนขนาดของโปรตีนบน SDS-PAGE ได้

จากการวิเคราะห์ผลของ deglycosylation ของ CGTase ทั้งในรูป PE และไอโซไซม์ด้วยเอนไซม์ Endo H, PNGase F และสารเคมี TFMS ผู้วิจัยคาดการณ์ว่ากระบวนการไกลโคซิเลชัน ไม่มีผลต่อการเกิดรูปแบบของไอโซไซม์ของ CGTase หรืออีกนัยหนึ่ง ก็คือ ไอโซไซม์ของ CGTase ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เติมต่อในโปรตีนในระหว่างกระบวนการไกลโคซิเลชัน สำหรับการศึกษารูปแบบไกลโคซิเลชันของ CGTase ยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อน แต่มีรายงานว่า ไกลโคซิเลชันมีผลต่อการเกิดหลายรูปแบบของเอนไซม์ polygalacturonase และ isopullulanase ในรา และ peroxidase ในพืช (40-41, 58) เป็นต้น

### การวิเคราะห์เพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของ CGTase ไอโซไซม์

ในการแยกเพปไทด์ของแต่ละไอโซไซม์ที่เกิดจากการย่อยด้วย trypsin ใช้คอลัมน์  $C_{18}$  reverse phase แล้วจะด้วยการปรับสัดส่วนของ solvent 2 ชนิด โดย solvent A (0.1% TFA) มีโพลาไรตี้น้อยกว่า solvent B (0.1%TFA : acetonitrile ในอัตราส่วน 1: 3 ) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Delforge (52) การปรับสัดส่วนเริ่มจากใช้ solvent A อย่างเดียว แล้วลด solvent A ขณะที่เพิ่ม solvent B ดังระบุในบทวิธีการทดลองข้อ 3 แสดงว่า solvent ที่ใช้จะมีโพลาไรตี้น้อยลงเรื่อยๆ จึงวิเคราะห์ได้ว่าพีคที่ถูกชะออกมา ก่อน ( $R_t$  น้อย) เป็นแฟรกเมนต์ที่มีโพลาไรตี้สูงกว่าพีคที่ถูกชะออกมาทีหลัง ( $R_t$  มาก) ดังนั้นจึงอธิบายได้ว่าพีคที่สูงมาก 4 พีคแรก ในช่วง  $R_t$  2.8 ถึง 4.3 นาที เป็น solvent peak ส่วนเพปไทด์ที่มีโพลาไรตี้ต่ำกว่า solvent จึงตามออกมาหลังจากนั้น และวิเคราะห์ได้ว่าเพปไทด์ที่กว้างที่ 34-36 นาที และมีค่าการดูดกลืนแสง 300-400 mUA ในรูป 19e เป็นพีครวมของเพปไทด์หลายแฟรกเมนต์ที่มีโพลาไรตี้ต่ำและแยกออกจากกันไม่ได้ด้วยคอลัมน์และสัดส่วนของ solvent ที่ใช้ชะในการทดลองนี้ จะเห็นว่าสัดส่วนของ solvent B เพิ่มในอัตราเร็วมากในช่วง 30-35 นาที (บทวิธีการทดลองข้อ 9) หากจะแยกพีคในช่วง 34-36 นาที ควรต้องลดความชันของการเพิ่ม solvent B ในช่วงหลัง 30 นาที



เมื่อเปรียบเทียบเพปไทด์ที่แยกพิคได้ดีและมีปริมาณพอสมควร (โดยวิเคราะห์พิคที่สูงเกิน 10 mAU) ผลการทดลองดังสรุปในตารางที่ 16 สรุปได้ว่าแต่ละไอโซไซม์มีชนิดของเพปไทด์ไม่ต่างกัน เนื่องด้วยได้พิคที่มี  $R_f$  ไม่ต่างกัน แต่มีความสูงของพิคซึ่งแสดงถึงปริมาณของเพปไทด์แตกต่างกัน ผลนี้วิเคราะห์ได้ว่า ไอโซไซม์ทั้ง 4 น่าจะมีลำดับกรดอะมิโนไม่ต่างกัน คือเป็นโปรตีนเดียวกัน แต่อาจมีการเปลี่ยนโซ่ข้าง (side chain) ของกรดอะมิโนบางตัวที่ไม่ใช่ไลซีนและอาร์จินีน ด้วยกลไก post-translational modification โดยที่เอนไซม์ trypsin ซึ่งจะตัดพันธะเพปไทด์ด้านปลาย C ของไลซีนและอาร์จินีน (55) จะตัดที่ตำแหน่งดังกล่าวเหมือนกันในทุกไอโซไซม์ ทำให้ได้แฟรกเมนต์ที่มีโพลาริตีไม่ต่างกัน ( $R_f$  เท่ากัน) แต่การที่ความสูงของพิคต่างกันในแต่ละไอโซไซม์อาจเป็นเพราะมีการพับตัว (folding) ของโปรตีนต่างกัน เนื่องจากการเปลี่ยนในโซ่ข้างของกรดอะมิโนบางตัว ทำให้ access ของ trypsin ต่อตำแหน่งที่จะตัดเกิดได้คือน้อยไม่เท่ากัน หากเกิดได้ดี ก็จะได้พิคสูง คือ เพปไทด์แฟรกเมนต์นั้นในปริมาณมาก เป็นต้น

#### การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N

ผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N หากวิเคราะห์จากไอโซไซม์ที่ blot จากแผ่นเจลแบบไม่เสียสภาพ พบว่าไม่สามารถสรุปผลได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะความไม่บริสุทธิ์ของสารตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์ หรือความซับซ้อนของโครงสร้าง เมื่อเปลี่ยนวิธีการเตรียมสารตัวอย่างที่จะส่งไปวิเคราะห์ปลาย N โดยการ run แต่ละไอโซไซม์ที่แยกได้จาก preparative gel electrophoresis บน SDS gel แล้ว blot จากแผ่นเจลนี้ พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่วิเคราะห์ได้ของทุกไอโซไซม์เหมือนกันหมด คือ APDTS และเหมือนกับ unfractionated CGTase (ก่อนการแยกไอโซไซม์) อีกด้วย ซึ่งผลนี้เหมือนกับผลที่ Laloknam (10) รายงานเมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ปลาย N ของ unfractionated CGTase โดยการ blot สารตัวอย่างจาก SDS gel และสอดคล้องกับลำดับกรดอะมิโนที่แปรจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CGTase gene ที่ Rimphanitchayakit (60) รายงาน ผู้วิจัยคาดว่า SDS น่าจะทำให้ความซับซ้อนของโครงสร้างของไอโซไซม์ลดลงและเพิ่ม sensitivity ยังผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับ reagent เมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ปลาย N

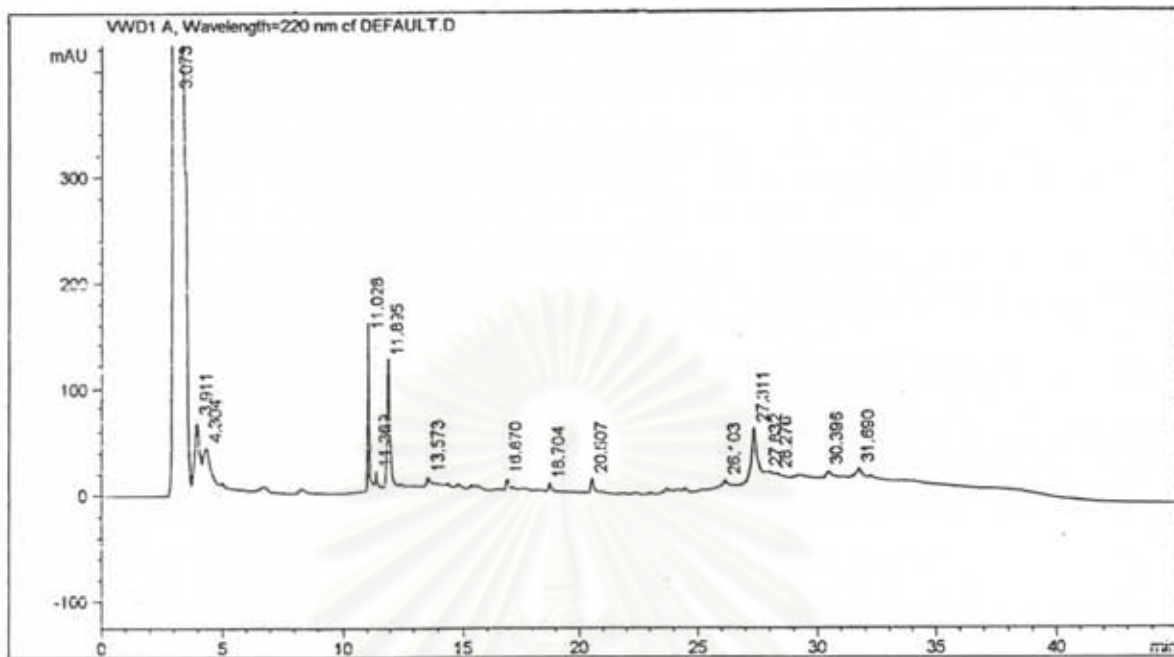
ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาข้อมูลช่วยในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น โดยได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบในไอโซไซม์ โดยเทคนิค HPLC ชนิด reverse phase ด้วยคอลัมน์  $C_4$  การทดลองนี้ ทำโดยการนำแต่ละไอโซไซม์ที่แยกได้จาก preparative gel electrophoresis มาฉีดคอลัมน์  $C_4$  แล้วจะด้วยการปรับสัดส่วนของ solvent 2 ชนิด ระหว่าง solvent A (0.1% TFA) และ solvent B (65% acetonitrile ใน 0.1%TFA) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 21 ซึ่งสรุปได้ว่า ทั้ง 4 ไอโซไซม์มีพิคหลักที่สำคัญ 2 พิค ที่  $R_f$  10.9-11.0 และ 11.8-11.9 นาที ความแตกต่างอยู่ที่อัตราส่วนของพิคทั้ง 2

รูปที่ 21 HPLC chromatograms from reverse phase  $C_4$  column of protein constituents in CGTase isozymes.

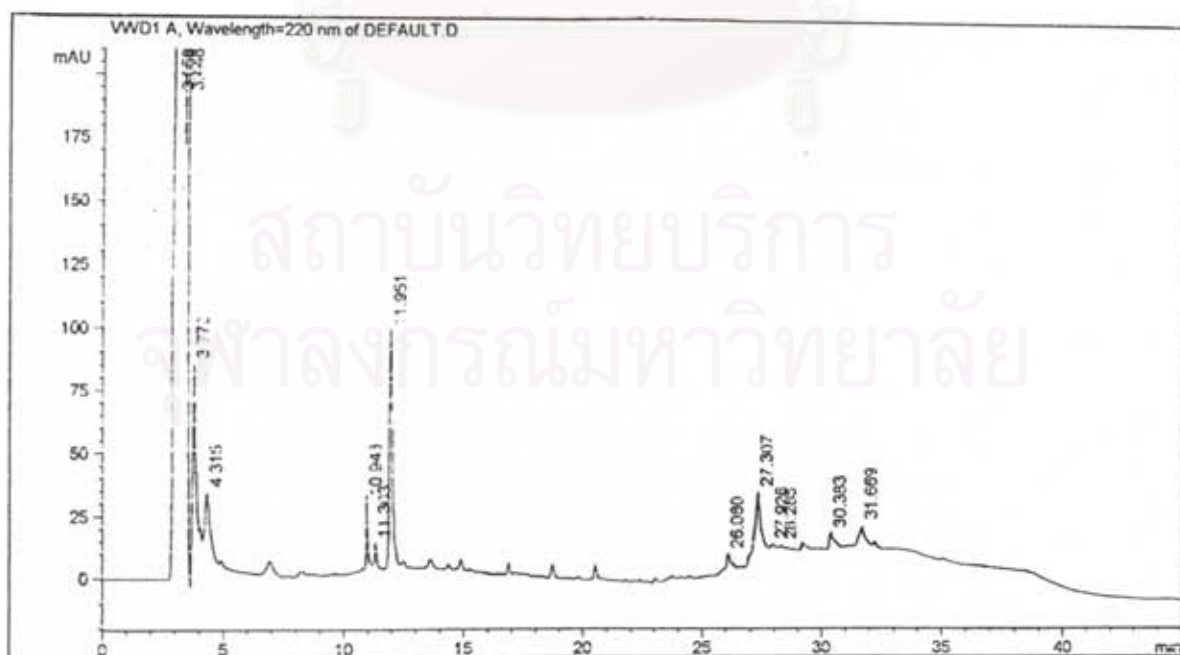
a-d; protein constituents of isozymes 1 to 4, respectively. (recording time 40 min)



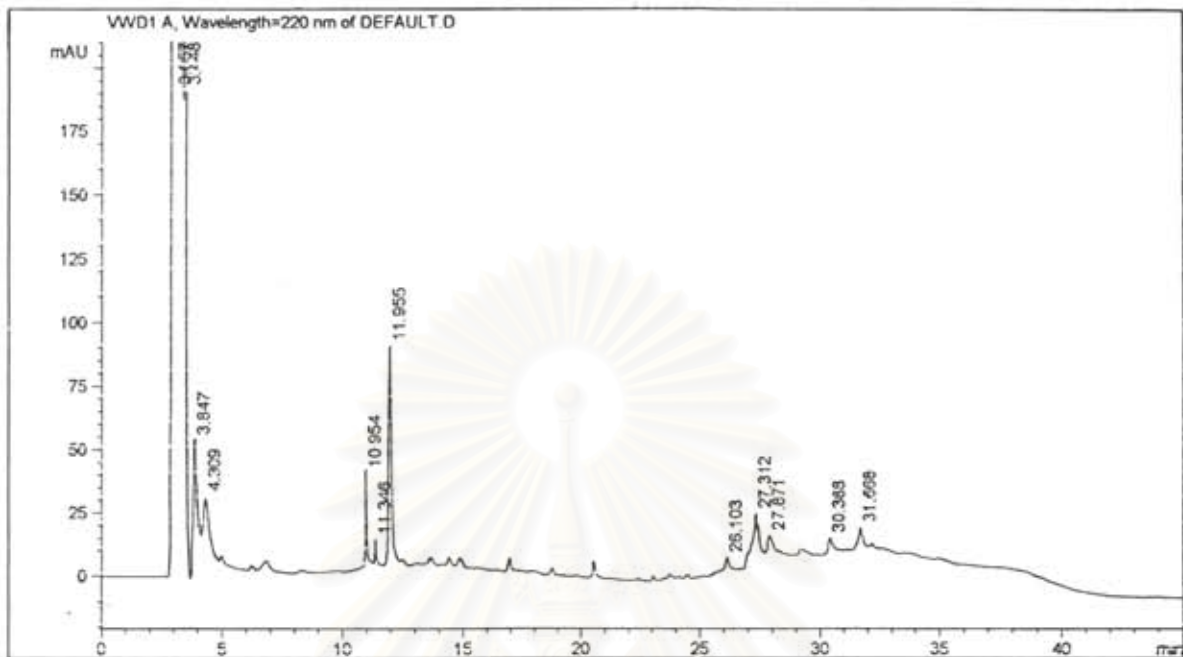
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



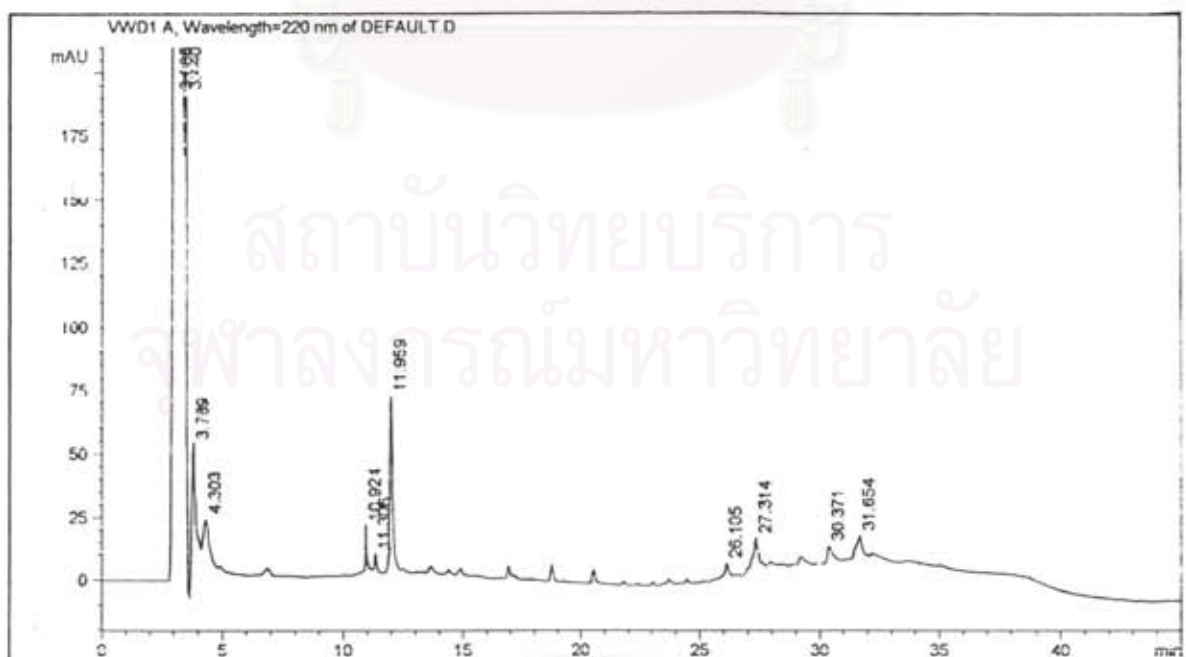
a. isozyme 1



b. isozyme 2



c. isozyme 3



d. isozyme 4

ตารางที่ 18 Ratio of major peaks from analysis of CGTase isozymes by reverse phase C<sub>4</sub> column.

Isozyme	R <sub>t</sub> as min/(peak area)		Peak area ratio I : II
	peak I	peak II	
1	11.028 (1.5520)	11.895 (3.0039)	1 : 1.94
2	10.943 (0.6774)	11.951 (3.1544)	1 : 4.66
3	10.954 (0.5422)	11.955 (2.7552)	1 : 5.08
4	10.924 (0.5728)	11.959 (2.7558)	1 : 4.81

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในแต่ละไอโซไซม์ (ตารางที่ 18) ซึ่งผู้วิจัยประเมินว่า น่าจะทำให้แต่ละไอโซไซม์มีประจจุสุทธิต่างกัน ทำให้เกิดรูปแบบการวิ่งต่างกันบนพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ โดยทั้ง 2 พืช น่าจะเป็น CGTase โปรตีนเดียวกัน ยืนยันโดยผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N และการวิเคราะห์เพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ แต่แต่ละพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงในโซ่ข้างของกรดอะมิโนบางตัว ยังผลให้มี polarity และประจจุสุทธิต่างกัน หากสามารถทำการทดลองต่อไปโดยนำทั้ง 2 พืชจากคอลัมน์ C<sub>4</sub> ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างต่อไป รวมทั้งหาวิธีทดสอบแอกติวิตีของ CGTase น่าจะให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่า แต่ละพืชต่างกันอย่างไร ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในการเกิดหลายรูปแบบของเอนไซม์ CGTase นี้

นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนของแต่ละไอโซไซม์ ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของแต่ละไอโซไซม์ ได้ผลดังตารางที่ 19 ซึ่งแสดงว่าส่วนประกอบกรดอะมิโนของไอโซไซม์ 1-4 ไม่น่าจะต่างกัน ความแตกต่างเป็น mole% ที่น้อยที่สุดคือ ทรโรนีน (Thr) มีค่า 0.5 ขณะที่ความแตกต่างมากที่สุดคือ 4.1 mole% ในปริมาณกลูตามิก/กลูตามีน (Glu) ซึ่งความแตกต่างขนาดนี้ไม่ถือว่าสูงมาก อาจเกิดจาก technical error ได้ ผลนี้เป็นไปในแนวเดียวกับผลเดิมที่รายงานโดย Kaskangam (23) ถึงแม้ค่าส่วนประกอบกรดอะมิโนจะแตกต่างกันบ้าง ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากความบริสุทธิ์ของไอโซไซม์และสภาวะของเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 Amino acid composition of CGTase isozymes

Amino acid	Content (mol %)			
	Isozyme1	Isozyme2	Isozyme3	Isozyme4
Asp	8.78	10.92	9.02	9.56
Ser	9.22	7.19	8.39	5.96
Glu	13.52	14.00	16.42	12.25
Gly	15.45	11.86	14.07	21.46
His	3.59	2.24	2.18	3.09
Arg	4.55	4.89	4.29	4.04
Thr	6.25	6.65	6.15	6.35
Ala	10.31	10.43	10.62	8.50
Pro	5.00	5.42	4.68	4.85
Tyr	2.07	2.41	1.90	1.72
Val	5.60	6.63	6.65	6.83
Lys	3.08	3.49	3.68	3.73
Ile	3.66	4.01	3.12	3.08
Leu	5.82	6.19	6.09	5.63
Phe	3.10	3.65	2.73	2.95

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของ CGTase ไอโซไซม์ในภาพรวม

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยรวม ประมวลได้ว่า ไอโซไซม์ของ CGTase ของ *Bacillus circulans* A11 เกิดจากอัตราส่วนที่ต่างกันของพีคหลัก 2 พีค ซึ่งวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ C<sub>4</sub> reverse phase HPLC ซึ่งทั้ง 2 พีคเป็น CGTase ที่เป็นโปรตีนเดี่ยว ผลจากงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยคาดการณ์ว่า การเกิดรูปแบบของ CGTase น่าจะเกิดจากการถ่ายทอดและแปรรหัสมาจากยีนเดี่ยวมากกว่าเกิดจากยีนต่างกัน และกระบวนการ post-translational modification ที่ทำให้เกิดหลายรูปแบบ ไม่ใช่ไกลโคซิเลชัน แต่ น่าจะเกิดโดยการเปลี่ยนแปลงโซ่ข้างของกรดอะมิโนบางตำแหน่ง หลังจากที่โปรตีนถูกสังเคราะห์ขึ้น เนื่องด้วยผลงานวิจัยนี้พบว่า

1. กรดอะมิโนสำคัญในบริเวณเร่งของแต่ละไอโซไซม์ ในภาพรวมไม่ต่างกัน หากไอโซไซม์เกิดจากหลายยีน คือ เป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกัน กรดอะมิโนสำคัญในบริเวณเร่งควรมีความแตกต่างกันมากกว่านี้
2. ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N 5 ตำแหน่งของทุกไอโซไซม์ไม่ต่างกัน และมีลำดับที่เหมือนกับใน unfractionated CGTase ด้วย
3. ส่วนประกอบกรดอะมิโนของแต่ละไอโซไซม์ ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน
4. จำนวนและชนิดของเพปไทด์ที่เกิดจากการย่อย CGTase ไอโซไซม์ด้วย trypsin ไม่แตกต่างกัน
5. เมื่อทำ deglycosylation CGTase ไอโซไซม์ ไม่มีผลต่อขนาดและประจุสุทธิของไอโซไซม์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

จากการวิจัยเอกสาร ไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อนว่า การเกิดหลายรูปแบบของเอนไซม์ CGTase เกิดจากกลไกใด (37-39) งานวิจัยนี้จึงเป็นความสนใจของผู้วิจัยที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป เพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับพีคหลัก 3 พีค จากคอลัมน์ reverse phase C<sub>4</sub> และศึกษาความเป็นไปได้ว่า post-translational modification ของ CGTase น่าจะเกิดจากปฏิกิริยาใดที่มีโอกาสเกิดบ่อยในเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ prokaryotes ปฏิกิริยาที่สนใจศึกษาต่อไป ได้แก่ deamination, phosphorylation และ acetylation เป็นต้น



## ข้อสรุป

1. กรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่งและมีความสำคัญต่อแอกติวิตีของ CGTase ไอโซไซม์ทั้ง 4 ได้แก่ ทริปโตเฟน ฮิสติดีน ไทโรซีน และกรดอะมิโนในกลุ่มคาร์บอกซิลิก นอกจากนี้ ไอโซไซม์ 2 และ 4 ยังมีเซรีน และไอโซไซม์ 3 ยังมีไลซีนอยู่ในบริเวณเร่งอีกด้วย
2. ซีสเทอีนเป็นกรดอะมิโนที่ไม่มีความสำคัญต่อแอกติวิตีของทุกไอโซไซม์
3. การทำ deglycosylation ด้วยเอนไซม์ Endo H และ PNGase F ไม่มีผลต่อขนาดและประจุสุทธิของทุกไอโซไซม์ แต่มีผลทำให้แอกติวิตีของไอโซไซม์ 3 และ 4 ลดลงประมาณ 17-28%
4. การทำ chemical deglycosylation ด้วย TFMS ไม่มีผลต่อขนาดของทุก CGTase ไอโซไซม์
5. จำนวนและชนิดของเปปไทด์ที่เกิดจากการย่อยไอโซไซม์ทั้ง 4 ด้วยเอนไซม์ trypsin ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณของเปปไทด์บางชนิดที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกัน
6. ลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของทุกไอโซไซม์เหมือนกัน และเหมือนกับของ unfractionated CGTase
7. องค์ประกอบกรดอะมิโนในทุกไอโซไซม์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน
8. ไอโซไซม์ของ CGTase เกิดจากอัตราส่วนที่ต่างกันของโปรตีนหลัก 2 พืชที่มีโพลาริตีต่างกัน

## ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีหลายรูปแบบนั้น หากแต่ละรูปแบบเกิดจากการถ่ายทอดและการแปลรหัสจากยีนต่างกัน จะเรียกหลายรูปแบบนั้นว่าไอโซไซม์ แต่หากการมีหลายรูปแบบเกิดจาก post-translational modification ของโปรตีน (ซึ่งเกิดจากยีนเดียว) ผู้เชี่ยวชาญในสาขาจะใช้คำว่า ไอโซฟอร์มหรือสับฟอร์ม (subform) (59) สำหรับหลายรูปแบบของเอนไซม์ CGTase จากผลการวิจัยที่ได้สนับสนุนว่าเกิดจากยีนเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยด้านการโคลนยีนนี้โดยกลุ่มวิจัยของเรา ซึ่งพบว่า ไม่มีหลักฐานจากการทดลองว่าการสร้างเอนไซม์นี้เกิดจาก ยีนโครงสร้าง CGTase มากกว่า 1 ยีน (60) ผู้วิจัยจึงเสนอว่าน่าจะเรียกรูปแบบของเอนไซม์นี้ว่า ไอโซฟอร์ม

อนึ่ง แบคทีเรีย *Bacillus circulans* A11 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้รับการพิสูจน์สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ด้านลักษณะสัณฐาน สรีรวิทยา และชีวเคมี โดยเฉพาะการเจริญในอาหารที่มีส่วนประกอบ การผลิตกรด หรือ ผลิตภัณฑ์ต่างกัน เป็นต้น เมื่อกลุ่มผู้วิจัยได้ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ยีน 16S

rRNA พบว่า สายพันธุ่นี้มีความคล้ายคลึงกับกลุ่ม *Paenibacillus* (ซึ่งเป็นจีโนมที่ถูกแยกออกจากกลุ่มบาซิลลัส) มากกว่า *Bacillus circulans*

งานที่ผู้วิจัยจะทำต่อไป คือ ทำการทดลองเพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ว่ากลไก post-translational modification แบบใดที่มีผลทำให้เกิดหลายรูปแบบของเอนไซม์ CGTase และหาข้อมูลเพิ่มเติมว่า CGTase ทุกไอโซไซม์เป็นโปรตีนเดียวที่เกิดจากยีนเดียว นอกจากนี้ ยังสนใจที่จะศึกษาต่อไปว่าเซลล์แบคทีเรียควบคุมการเกิดไอโซไซม์ได้อย่างไร



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## เอกสารอ้างอิง

1. Horikoshi, K., and Akiba, T. (1982) In Alkalophilic Microorganisms, 104-110, 147-157. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
2. French, D., and Rundle, R.E. (1942) J. Am. Chem. Soc. 64, 165-172.
3. Amaizo (1993) Cyclodextrin Mimeograph, USA.
4. Ensuiko (1993) Cyclodextrin Products Mimeograph, Japan.
5. Pongsawasdi, P., and Yagisawa, M. (1987) J. Ferment. Technol. 65, 463-467.
6. วัลยา เตชะชัยกุล (2534) วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. Rutchorn, U., Mongkolkul, P., Limpaseni T., Kamolsiriporn S. and Pongsawasdi, P. (1992) Minutes of Sixth Int. Symp. on Cyclodextrins (Hedges, A.R., ed.) 34-38. Editions de Sante, Paris.
8. Malai, T. (1994) Master's Thesis (Biotechnology) Graduate School, Chulalongkorn University.
9. Kuttiaracheewa, W., and Pongsawasdi, P. (1995) Biopolymers and Bioproducts : Structure, Function and Application (Svasti, J.ed.), 320-326, Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok.
10. Laloknam, S. (1997) Master's Thesis (Biochemistry) Graduate School, Chulalongkorn University.
11. Tongsimma, A.(1998) Master's Thesis (Biochemistry) Graduate School, Chulalongkorn University.
12. Szjetli, J. (1988) In Cyclodextrin Technology, Chapter I, Kluwer Academic Publisher, Natherland.
13. Kobayashi, S., Kainuma, K., and Suzuki, S. (1978) Carbohydr. Res. 61, 229-238
14. Nakamura, N., and Horikoshi, K.(1976) Agric. Biol. Chem. 40, 1785-1791
15. Bender, H. (1977) Arch. Microbiol. III, 271-282
16. Yamamoto, M. Takano, T., and Horikoshi, K. (1972) Agric. Biol. Chem. 36, 1819-1823.
17. Englbrecht, A., Harrer, G., Lebert, M. and Schmid, G. (1990) Proc. Fifth Int. Symp. On Cyclodextrins (Duchene, D., ed..) 25-31, Editions de Sante, Paris.
18. Kitahata, S., Tsuyama, N., and Okada, S. (1974) Agric.Biol.chem. 38, 387-393

19. Depinto, J.A. and Campbell, L.L. (1968) *Biochemistry* 7, 121-125.
20. Kitahata, S., and Okada, S. (1975) *Agric.Biol.Chem.* 28, 2413-2417.
21. Kitahata, S., and Okada, S. (1982) *Denpun Kagaku* 29, 7-12.
22. Yagi, Y., Sato, M., and Ishikura, T. (1986) *J. Jpn.Soc.Starch Sci.* 2, 144-151.
23. Kaskangam (1998) Master's Thesis, Graduate School, Chulalongkorn University.
24. Rojtinnakorn, J., Kim, P., Laloknam, S., Tongsimma, A., Kamolsiripichaiporn, S., Limpaseni, T., and Pongsawasdi, P. (2001) *Science Asia* 27, 105-112.
25. Klein, C., Hollender, J., Bender, J. and Schulz, G.E. (1992) *Biochemistry* 31, 8740-8746.
26. Strokopytov, B., Penninga, D., Rozaboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B.W., (1995) *Biochemistry* 34, 2234-2240.
27. Penninga, D., Strokopytov, B., Rozeboom, J.H., Lawson, C.L., Dijkstra, B.W., Bergsma, J., and Dijkhuizen, L. (1995) *Biochemistry* 34, 3368-3376.
28. Villette, J.R., Helbecque, N., Albani, J.R., Sicard, P.J., and Bouquelet, S.,J-L. (1993) *Appl. Biochem.* 17, 205-216.
29. Nakamura, A., Haga, K., and Yamane, K. (1993) *Biochemistry* 32, 6624-6631.
30. Ohnishi, M., Abe, M., Azuma, T., Kubota, M., and Rokushika, S. (1994) *Starch* 46, 272-275
31. Wind, H.D., Liebl, W., Buitelaar, R.M., Penninga, D., Spreinat, A., Dijkhuizen, L., and Bahl, H. (1995) *Env. Micro.* 1257-1265.
32. นุชจรี แสงจันทร์ (2537) รายงาน Senior Project ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
33. จารุณี ควรพิบูลย์ (2540) รายงาน Senior Project ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
34. Rodart, P. (2001) Master's Thesis (Biotechnology), Graduate School, Chulalongkorn University.
35. Jongmeevasana, P. (2000) Master's Thesis (Biotechnology), Graduate School, Chulalongkorn University.
36. Rojtinnakorn, J. (1994) Master's Thesis, Graduate School, Chulalongkorn University.
37. Mattsson, P., Meklin, S., and Korpela, T. (1990) *J. Biochem. Biophys. Methods* 20 (3), 237-276.

38. Bovetto, L.J., Backer, D. P., Villette, J. R., Sicard, P. J., and Bouguellet, S. J.- L. (1992) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15 (1), 48 - 58.
39. Abelyan, V. A., Yamamoto, T., and Afrikyan, E. G. (1994) *Biochemistry (Moscow)* 59 (6), 573 – 579.
40. Stratilova, E., Mislovicova, D., Kacurakova, M., Machova, E., Kolarova, E., Markovic, O., and Jornvall, H.(1998) *J.Prot.Chem.* 17(2): 173-179.
41. Padmajanti, A., Tonozuka, T. and Sakano, Y.(2000) *J.Appl.Glycosci.*47(3&4) : 287-292.
42. Tarentino, A.L., Gomaz, C.M. and Plummer, Jr.T.H.(1985) *J. Biochem.* 24 : 4665-4671.
43. Edge, A.S.B., C.R. Faltynek, L. Hof, L.E.J. Reicheert, and P. Weber.(1981) *Anal.Biochem.*118 : 131-137.
44. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248 – 254.
45. Fuwa, H. (1954) *J. Biochem.* 41, 583 – 603.
46. Nomoto, M., Chen, C. C., and Sheu, D. C. (1986) *Agric. Biol. Chem.* 50, 2701 – 2707.
47. Dubois, M. Grills, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956) *Anal.Chem.* 28, 350-356.
48. Bollag, D.M., and Edelstein, S.J. (1991) *Gel electrophoresis under Denaturing Condition.* Protein Methods, John Wiley& Sons, Inc., New York.
49. Mean, G.E., and Feeney, R.E. (1971) *Chemical Modification of Proteins*, Holden day, Inc.
50. Lundblan, R.L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2<sup>nd</sup>ed. CrC Press, Inc.
51. Mile, E.W. (1977) *Methods Enzymol.* 47, 431-442.
52. Delforge, D., Devresse, B., Dieu, M., Delaive, E., Beeuman, J. V., and Remacle, J. (1997) *JBC* 272, 2276 - 2284.
53. Kuanpibool, J. (2001) Personal communication.
54. Makela, M., Mattsson, P., Schinina, M.E., and Korpela, T. (1988) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10, 414-427.
55. Nelson, D.L., and Cox, M.M.(2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., Worth Publishers.
56. Trimble, R.B. and Maley, F.(1984) Optimizing hydrolysis of N-linked high-mannose oligosaccharides by endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H.*Anal.Biochem.*141:515-522.
57. Tams, J.W., and Welinder, K.A. (1995) *Anal. Biochem.* 228, 48-55.

58. Sornwatana, T. (2001) Master's Thesis (Biotechnology), Graduate School, Chulalongkorn University.
59. Moss, D.W. (1982) Isoenzymes, Chapman and Hall Ltd., U.K., Chapter 1.
60. Rimphanitchayakit, V., Tonozuka, T., and Sakano, Y. (2000) Proceedings of The 1<sup>st</sup> Conference on Science and Technology University-Industry Linkages under TJTP, Ak sornsobhon Co., Ltd., Bangkok, 175-181.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก

### ภาคผนวก A : อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### Medium I ประกอบด้วย

Beef extract	0.5	%
Polypeptone	1.0	%
Yeast extract	0.2	%
NaCl	0.2	%
Soluble starch (potato)	1.0	%

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 ด้วย 1 N HCl

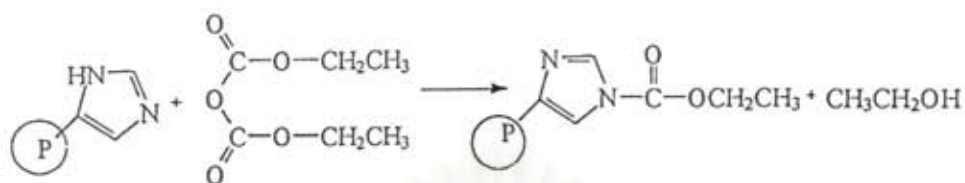
#### Horikoshi's medium ดัดแปลงโดย Rutchorn (7) ประกอบด้วย

Polypeptone	0.5	%
Yeast extract	0.5	%
$K_2HPO_4$	0.1	%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02	%
$Na_2CO_3$	0.75	%
Rice starch (local grade)	1.0	%

Final pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมตามสูตรนี้ จะเป็น pH 10.0

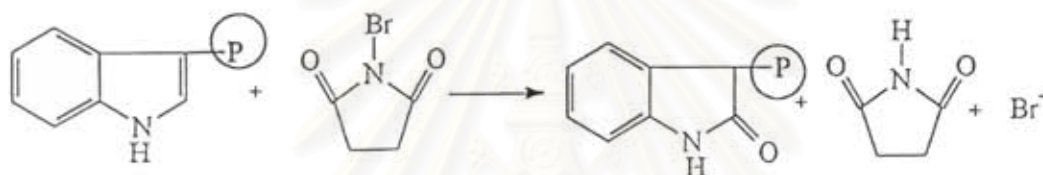
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก B : ปฏิกริยาการดัดแปรกรดอะมิโนด้วยสารเคมีจำเพาะ



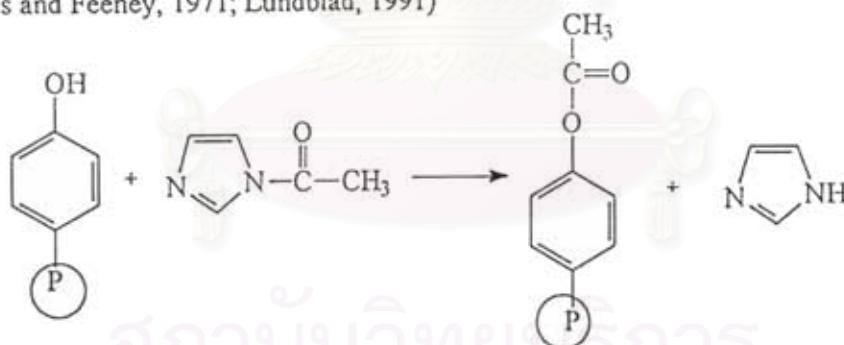
Reaction 1 Modification reaction of DEP with histidine residue in protein (P)

(Means and Feeney, 1971; Lundblad, 1991)



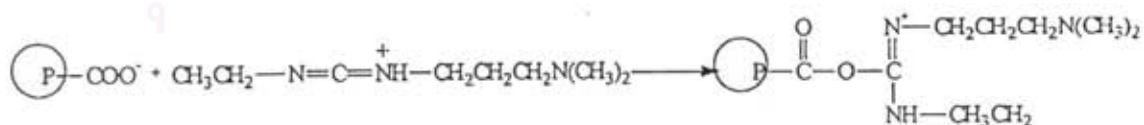
Reaction 2 Modification reaction of NBS with tryptophan residue in protein (P)

(Means and Feeney, 1971; Lundblad, 1991)



Reaction 3 Modification reaction of NAI with tyrosine residue in protein (P)

(Means and Feeney, 1971; Lundblad, 1991)

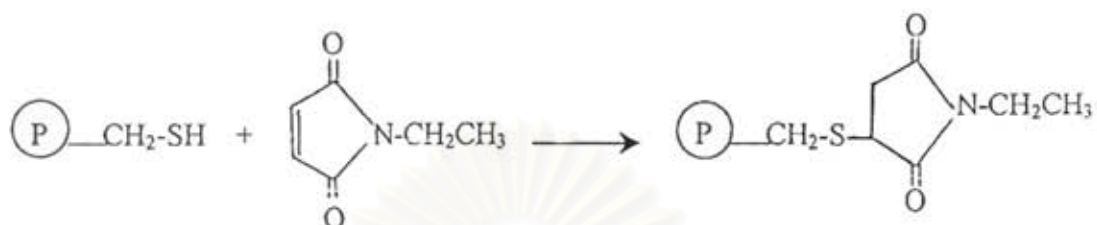


Reaction 4 Modification reaction of EDC with carboxyl residue in protein (P)

(Means and Feeney, 1971; Lundblad, 1991)

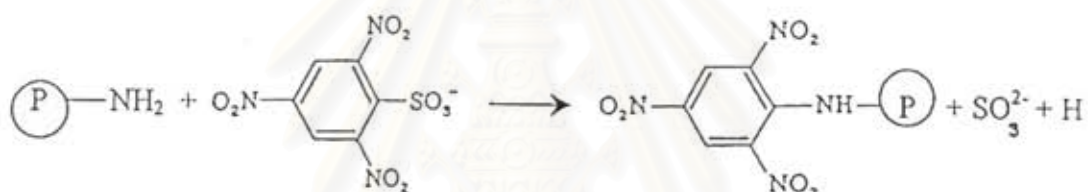


ภาคผนวก B : ปฏิกริยาการดัดแปรกรดอะมิโนด้วยสารเคมีจำเพาะ (ต่อ)



**Reaction 5** Modification reaction of NEM with cysteine residue in protein (P)

(Means and Feeney, 1971 ; Lundblad, 1991)



**Reaction 6** Modification reaction of TNBS with lysine residue in protein (P)

(Means and Feeney, 1971 ; Lundblad, 1991)



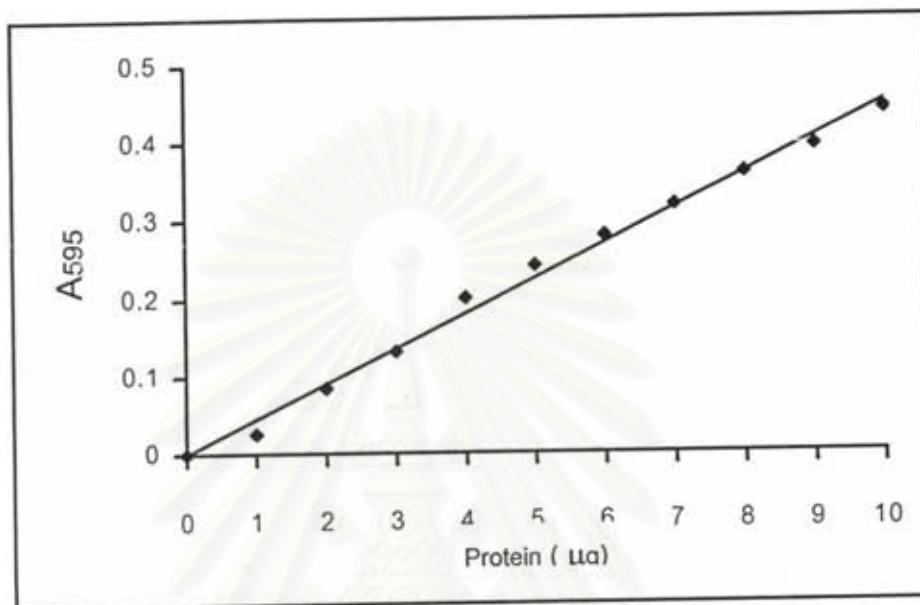
**Reaction 7** Modification reaction of PMSF with serine residue in protein (P)

(Means and Feeney, 1971 ; Lundblad, 1991)

ภาคผนวก C : ตัวย่อของกรดอะมิโน

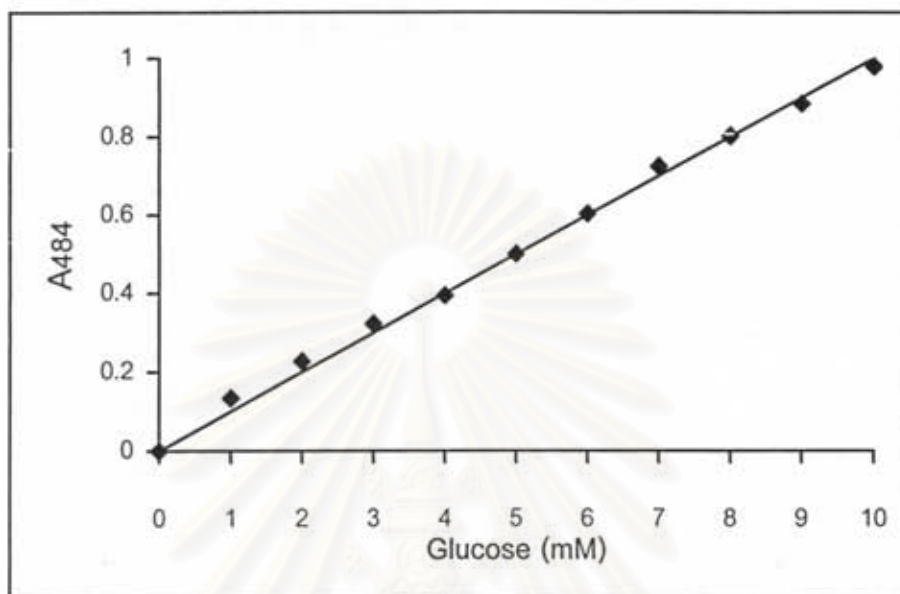
Amino acid	3 Letter-Abbreviation	1 Letter-Abbreviation
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartic acid	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glutamic acid	Glu	E
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Unknown	-	X

ภาคผนวก D : กราฟมาตรฐานการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก E : กราฟมาตรฐานการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก F : ผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N ของ CGTase ไอโซไซม์  
(ตัวอย่างได้จากการ blot โปรตีนจากแผ่นเจลแบบเสียสภาพ)

THE NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE

Department of Biological Sciences  
PROTEIN & PROTEOMICS CENTRE

Protein Micro-sequencing Services

SUMMARY REPORT OF ANALYSIS

Date of Report: 11/9/02	Sample submitted by: Wanida
Sample Name: PE	Our reference Name Wanida -PE Rep

Cycle No.	Main Residues	Minor Residues
1.	Blank	
2.	Standard	
3.	A	
4.	P	
5.	D	
6.	T	
7.	S	
8.	V	
9.	S	
10.	N	
11.	K	

Sequence Called:	Ala-Pro-Asp-Thr-Ser-Val.-Ser--Asn-Lys.
------------------	--

SUMMARY REPORT OF ANALYSIS

Date of Report: 7/8/02	Sample submitted by: Wanida
Sample Name: Isoform 1	Our reference Name Wanida -Isoform

Cycle No.	Main Residues	Minor Residues
1.	Blank	
2.	Standard	
3.	A/G	
4.	P	
5.	D	
6.	T	
7.	S	
8.	V	
9.	S? V?	
10.	N; S?	
11.	K	
12.	Q	

Sequence Called:	Ala - Pro - Asp - Thr - Ser - Val - Ser(?) - Asn - Lys - Gln.... (analyzed up to 10 residues)
------------------	--

SUMMARY REPORT OF ANALYSIS

Date of Report: 21/9/02	Sample submitted by: Wanida
Sample Name: Isoform 2 ; Isoform 3 Isoform 4	Our reference Name Wanida -Isoform2 Wanida -Isoform3 Wanida -Isoform4

Cycle No.	Main Residues	Minor Residues
1.	Blank	
2.	Standard	
3.	A	
4.	P	
5.	D	
6.	T	
7.	S	

Sequence Called:	The three samples has the same sequence called : Ala- Pro- Asp-Thr- Ser
Remarks	The presence of glycine could be due to buffer used in running gel.