ชื่อเรื่องการค้นคว้าแบบอิสระเชิงวิทยานิพนธ์ การติดฉลากสัมพรรคภาพของเม็ดวุ้นแม่เหล็ก และการทำเปอร์ออกซิเดสจากหัวแรดิช (Raphanus vulgaris Linn.) ให้บริสุทธิ์

ชื่อผู้เขียน น.ส. วันนี ปรีดาศักดิ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการสอนเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบการค้นคว้าแบบอิสระเชิงวิทยานิพนธ์

อ.ดร.ดาราวัตน์	ทองขาว	ประธานกรรมการ
รศ.ดร.สุรีย์	ฟูตระกูล	กรรมการ
ผศ.ดร.ภาวิณี	คณาสวัสดิ์	กรรมการ

บทคัดย่อ

การใช้เม็ดวุ้นแม่เหล็กจับจำเพาะในการทำสารให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการของโครมาโตกราฟีแบบสัมพรรคภาพ แต่ไม่ต้องทำการแยกสารในคอลัมน์เพราะสามารถใช้แม่เหล็กดูดไว้ได้นั้น ต้องทำการติดฉลากเม็ดวุ้นแม่เหล็กเองเพื่อให้มีสัมพรรคภาพกับสารที่ต้องการแยก การวิจัยนี้จึงทดลองตรึง Con A กับเม็ดวุ้นแม่เหล็ก และตรวจสอบประสิทธิภาพของ Con A ที่ตรึงได้โดยนำไปแยกเปอร์ออกซิเดสจากสิ่งสกัดของหัวแรดิช เพื่อเสนอแนวทางที่เหมาะสมสำหรับการตรึงโปรตีนกับเม็ดวุ้นแม่เหล็กต่อไป

วิธีตรึงที่ทดลองมี 6 วิธีคือ วิธี Tresyl chloride วิธี Tosyl chloride วิธี Carbonyldiimidazole Cyanogen bromide วิธีที่ 1 วิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 ตัวค้ำจุนที่ทดลองตรึงมี 3 ชนิดคือ Sepharose 4B เม็ดวุ้น และเม็ดวุ้นแม่เหล็ก จากการทดลองตรึง Con A กับ Sepharose 4B โดยวิธี Tresyl chloride เมื่อใช้ Con A ที่เตรียมเองจากถั่วแจ็คเปรียบเทียบกับ Con A ที่ซื้อจากบริษัท Sigma พบว่า Con A ซื้อแยกเปอร์ออกซิเดสได้มากกว่า Con A เตรียม 3 เท่า จากการทดลองตรึง Con A ซื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กับเม็ดวุ้นแม่เหล็กโดยวิธีต่าง ๆ เปรียบเทียบกับการตรึง Con A ซื้อกับเม็ดวุ้นหรือ Sepharose 4B ในแต่ละวิธีแล้วพบว่า ตัวค้ำจุนทั้งสามชนิดให้ผลที่ใกล้เคียงกันมาก นอกจากนี้ Con A-Sepharose 4B ที่ซื้อจากบริษัท Sigma ซึ่งทำการตรึงโดยวิธี Cyanogen bromide สามารถแยกเปอร์ออกซิเดสออกจากสิ่งสกัดของหัวแรดิชได้ประมาณ 34 % ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ในขณะที่ Con A-Sepharose 4B ที่ตรึงเองโดยวิธี Cyanogen bromide สามารถแยกเอนไซม์ได้ประมาณ 5 % และความบริสุทธิ์ต่ำกว่า 1 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบวิธีตรึง Con A กับตัวค้ำจุนโดย Cyanogen bromide ทั้งสามวิธีพบว่าวิธีที่ 3 ใช้ปริมาณ Cyanogen bromide น้อยที่สุด และวิธีทำสะดวกที่สุด เพราะไม่ต้องปรับ pH ขณะกระตุ้น ได้ปริมาณ Con A ติดกับตัวค้ำจุนมาก และมี Con A หลุดน้อยขณะใช้งาน การตรึง Con A กับตัวค้ำจุนโดยวิธี Sulfonyl chloride พบว่าราคา Tresyl chloride ที่ต้องใช้แพงกว่า Tosyl chloride 45 เท่า แต่วิธี Tresyl chloride แยกเปอร์ออกซิเดสได้มากกว่าวิธี Tosyl chloride 5 เท่า และมากกว่าวิธีตรึงอื่น ๆ ด้วย สำหรับ Con A ที่ตรึงโดยวิธี Carbonyldiimidazole หลุดจากตัวค้ำจุนในขณะใช้งานน้อยที่สุด ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่า Con A สามารถตรึงกับเม็ดวุ้นแม่เหล็กได้ดีด้วยวิธี Tresyl chloride วิธี Carbonyldiimidazole หรือ Cyanogen bromide วิธีที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Research Title Affinity Labelling of Magnetic Agar Beads and Purification of Radish (Raphanus vulgaris Linn.) Peroxidase

Author Ms.Wannee Preedasak

M.S. Teaching Chemistry

Examining Committee :

Lecturer Dr.Dararat Tongkao Chairman

Assoc.Prof.Dr.Suree Phutrakul Member

Assist.Prof.Dr.Pawinee Kanasawud Member

Abstract

Application of affinity-labelled magnetic agar beads in biomolecular purification is affinity chromatography in batch operation by magnet sorting. Ligand immobilization in the magnetic agar beads has to be prepared according to specifically bind the desired molecules. Experiments were carried out to immobilize Con A in the beads and binding capacity of the immobilized Con A was investigated by peroxidase separation from radish (Raphanus vulgaris Linn.) crude extract. Data obtained might indicate suitable methods for protein immobilization in the beads.

Six immobilization methods, those were Tresyl chloride method, Tosyl chloride method, Carbonydiimidazole method,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Cyanogen bromide method 1, 2 and 3, were performed. Three types of beads, those were Sepharose 4B, agar beads and magnetic agar beads, were used. Comparison of Con A prepared from Jack beans and Con A purchased from Sigma after immobilization in Sepharose 4B by the Tresyl chloride method showed that the commercial Con A separated three times more peroxidase activity than the prepared Con A. Comparison among the commercial Con A immobilized in the magnetic agar beads, the agar beads and Sepharose 4B by each of the methods mentioned showed the three types of beads behaved more or less the same through the processes. Con A-Sepharose 4B immobilized by cyanogen bromide and purchased from Sigma separated 34 % of the peroxidase from crude extract with three fold increase in the enzyme purity. However, Con A-Sepharose 4B immobilized in our laboratory separated only 5 % of the enzyme with decrease in purity.

Comparison among the three methods of cyanogen bromide showed that the method 3 required least amount of cyanogen bromide, easiest techniques such as no pH adjustment during activation, and yielded more immobilized, Con A less amount of Con A leaked during the separation. Comparison among the Sulfonyl chloride methods showed tresyl chloride was 45 times more expensive than tosyl chloride, while Con A immobilized by the Tresyl chloride method separated five times more peroxidase activity than the Tosyl chloride method, and more than the other methods as well. Con A immobilized by the Carbonyldiimidazole method seemed to leak from the beads during the separation at

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

least of all tested. Therefore, it can be concluded that the Con A was satisfactorily immobilized in the magnetic agar beads by the Tresyl chloride, Carbonyldiimidazole or Cyanogen bromide method 3.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved