

50401207 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : เมทิลทรานสเฟอร์ไรส/ไฮโดรเลส/แอมเพอร์โรเมตริก/ไบโอเซนเซอร์

อนิรุทธ เอกคุณธรรม: การพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยใช้เอนไซม์เมทิลทรานสเฟอร์ไรส/ไฮโดรเลสจากโคลน mpd ลูกผสม. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ, อ. ดร.วนิดา วัฒนการุณ. และ ผศ. ดร. พิทยา หลิวเสรี. 170 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวัดยาฆ่าแมลงในกลุ่มออการ์โนฟอสเฟต โดยการนำรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เมทิลทรานสเฟอร์ไรส/ไฮโดรเลส ซึ่งสามารถย่อยสลายสารในกลุ่มนี้ได้เป็นพาราไนโตรฟีนอล มาสร้างเป็นไบโอเซนเซอร์ รีคอมบิแนนท์เอนไซม์นี้ถูกแยกบริสุทธิ์จาก *Escherichia coli* ที่มียีน *mpd* โคลนอยู่ในพลาสมิด pGEX 4T-2 จากนั้นศึกษาคุณลักษณะโดยทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์และความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดคือ 25 °C โดยที่กิจกรรมเอนไซม์ยังคงเสถียร แม้เวลาจะผ่านไป 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C และกิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 50 และ 45 % เมื่อเวลาผ่านไป 5 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดคือ 9 โดยที่กิจกรรมเอนไซม์ค่อนข้างเสถียร คือยังมีกิจกรรมคงอยู่ถึง 80-90 % เมื่อเวลาผ่านไป 8-15 ชั่วโมง ที่พีเอช 6-7 เมื่อทำการศึกษาผลของไอออนโลหะและสารเคมีต่อกิจกรรมเอนไซม์ พบว่า Cd^{2+} , Co^{2+} , and Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 mM จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 226, 131 และ 128 % ตามลำดับ ส่วน SDS, DTT และ EDTA มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้มาตรึงบนคาร์บอนนาโนทิวป์โดยอาศัยแรงระหว่างประจุ ซึ่งสามารถใช้ตรวจวัดยาฆ่าแมลงโดยการตรวจหาปฏิกิริยาออกซิเดชันของพาราไนโตรฟีนอลที่เป็นผลผลิตจากการย่อยสลายของเอนไซม์ด้วยวิธีแอมเพอร์โรเมตริก ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ไบโอเซนเซอร์นี้สามารถตรวจวัดปริมาณเมทิลทรานสเฟอร์ไรส, พาราไฮดรอกซี, และพาราออกซอนในช่วง 10-90, 20-240, และ 3.3-40 nM โดยให้ค่า detection limits เท่ากับ 10, 20, และ 3.3 nM ตามลำดับ ไบโอเซนเซอร์นี้ให้ค่าการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำสูงสำหรับเมทิลทรานสเฟอร์ไรส, พาราไฮดรอกซี, และพาราออกซอน คือ 616, 301, และ 1547 nA/uM ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการวัดซ้ำของไบโอเซนเซอร์โดยทำการวัดเมทิลทรานสเฟอร์ไรสทั้งหมด 15 ครั้ง ได้ค่า RSD เท่ากับ 9.19 % ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไบโอเซนเซอร์นี้สามารถวัดซ้ำได้ โดยสามารถตอบสนองได้ไวภายในเวลา 10 วินาที

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ 1. 2. 3.

50401207 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS : METHYL PARATHION HYDROLASE/AMPEROMETRIC/BIOSENSOR

ANIRUT EKKHUNTHAM : DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR PESTICIDE
DETECTION USING METHYL PARATHION HYDROLASE FROM RECOMBINANT MPD CLONE.

THESIS ADVISORS: ASST. PROF. JESDAWAN WICHITWECHKARN, Ph.D., WANIDA
WATTANAKAROON, Ph.D., AND ASST. PROF. PITTAYA LIEWSAREE, Ph.D. 170 pp.

A highly sensitive detection of organophosphate (OP) compounds was developed. Recombinant methyl parathion hydrolase (MPH) capable of hydrolyzing OP to *p*-nitrophenol (PNP) was used to develop a biosensor. This recombinant enzyme was purified from *Escherichia coli* harboring *mpdB* gene cloned into expression plasmid pGEX-4T-2, and characterized. The effects of temperature and pH on the enzyme activity and stability were analyzed. Its optimum temperature was 25°C. The enzyme activity was unchanged for 48 h at 4°C, and remained above 50% within 5 h and about 45% throughout 48 h at 25°C. Its optimum pH was 9.0, and the enzyme was stable at pH 6-7, with 80-90% activity remaining for 8-15 h. The effects of metal ions and certain reagents on enzyme activity were also investigated. It was found that Cd²⁺, Co²⁺, and Zn²⁺ ions at the concentration of 1 mM enhanced the activity to about 226 %, 131 %, and 128 %, respectively. Sodium dodecyl sulfate (SDS) dramatically reduced the enzyme activity, while dithiothreitol (DTT) and ethylenediaminetetraacetate (EDTA) had slight negative effect. After that the MPH was immobilized on multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) via electrostatic self-assembly, and the detection was performed by direct oxidation of biocatalytically liberated PNP using amperometry. Under the optimized conditions, the biosensor exhibited responses to methyl parathion (MP), parathion, and paraoxon with the linear ranges of 10-90 nM, 20-240 nM, and 3.3-40 nM, and the detection limits of 10 nM, 20 nM, and 3.3 nM, respectively. The biosensor also provided high sensitivities to MP, parathion, and paraoxon at 616 nA/μM, 301 nA/μM, and 1547 nA/μM, respectively. Reproducibility assay using repetitive standards (n=15) of 200 nM showed the RSD of 9.19%, indicating high reproducibility. The response time was 10 s.

Department of Biotechnology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2009
Student's signature
Thesis Advisors' signatures 1. 2. 3.