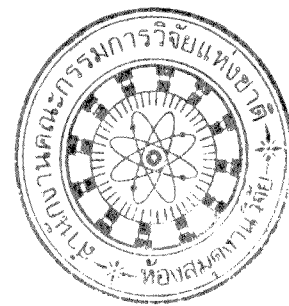


บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง



3.1 น้ำยาและสารเคมี

3.1.1 BCA assay kit (Pierce, Rockford, USA)

3.1.2 IEF pH gradient strip 7.3 cm. pH 3-10 (GE Healthcare, Sweden)

3.1.3 น้ำยาและสารเคมีอื่น ๆ ใช้ของบริษัทต่าง ๆ คือ Sigma (USA), Fluka (USA), GE Healthcare (Sweden), Carlo Erba (Italy), Merck (Germany)

3.2 น้ำยาง

น้ำยางจะเก็บจากขั้วของลูกขนุนที่พบได้ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา โดยจะทำการเก็บเก็บใส่ในขวดแก้วปากกว้างที่สะอาด เมื่อเก็บเสร็จแล้วจะนำน้ำยางมาเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

3.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

น้ำยางที่เก็บได้จากส่วนขั้วของลูกขนุน นำมาปั่นแยกด้วยเครื่อง high speed centrifuge หลังจากปั่นนำส่วนน้ำที่ได้มา dialysis ด้วย 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5 แล้วนำไปปั่นด้วย high speed centrifuge จะได้ส่วนตะกอนแยกออกจากส่วนน้ำใส นำส่วนใสไปทำให้บริสุทธิ์ (purify) ด้วย cation exchange chromatography โดยใช้ step gradient salt elution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0-0.5 M ใน 25 mM Tris-HCl pH 8.8 หลังจากนั้นนำส่วนโปรตีนที่สกัดในความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 0 M ไป purify ต่อด้วย anion exchange chromatography (Q sepharose) โดยใช้ step gradient salt elution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ในช่วง 0-0.5 M ใน buffer 25 mM Tris-HCl pH 8.8 โปรตีนที่ได้เมื่อแยกด้วย 12.5% gel SDS-PAGE electrophoresis (Laemmli, 1970) พบว่า fraction ของโปรตีน AMP48 ที่ได้ประกอบด้วยแถบโปรตีน (protein bands) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) 48 kDa

3.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยน้ำยา BCA assay kit ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ นำสารละลายโปรตีน 0.1 ml ผสมกับสารละลาย BCA working reagent 2 ml นำไป incubate ที่ 37°C นาน 30 นาที หาความเข้มข้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 562 nm โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

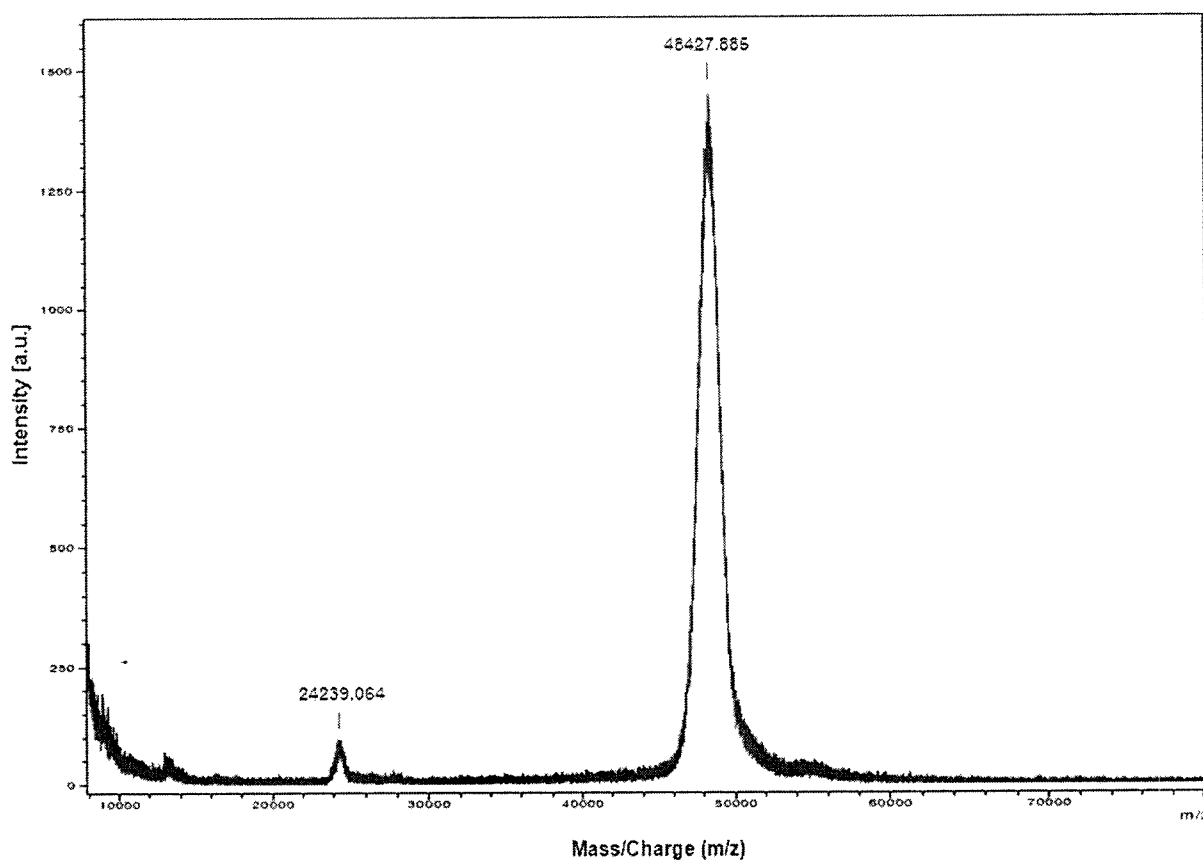
3.3 การหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค N-terminal sequencing

โปรตีน spot ของ AMP48 ที่ได้จาก 2D gel electrophoresis ที่ได้รับการ blot ลง PVDF membrane แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 นำไปหาลำดับกรดอะมิโนแบบ N-terminal sequencing ด้วย Edman degradation method ผลการทดลองพบว่าโปรตีนดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโน 11 ตัวแรกจากปลาย N ของ polypeptide chain ดังนี้

A-Q-E-G-G-K-D-D-D-G-G

3.4 การหาขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrophotometry

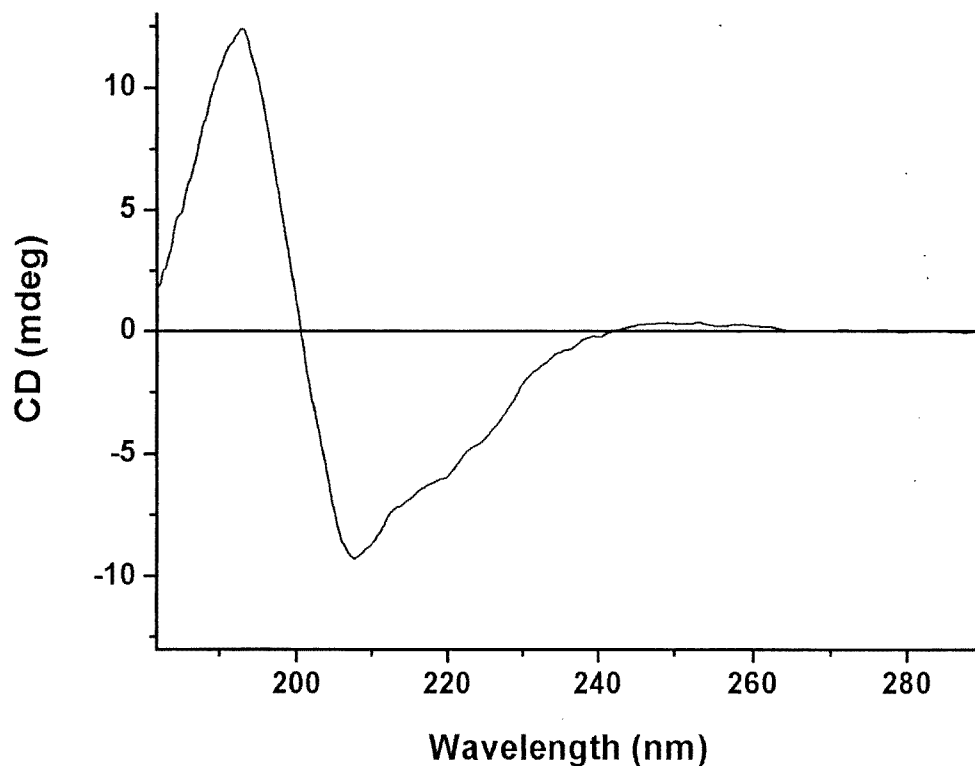
ขนาดของโปรตีน AMP48 วิเคราะห์ด้วย matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry โดยใช้ sinapinic acid (SA) เป็น MALDI matrix โดยทำการวิเคราะห์ ณ หน่วยบริการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ผลการทดลองพบว่า intact mass ของ AMP48 มีขนาด 48427.885 Da (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 Intact mass ของ AMP48 วิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry

3.5 ศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีนออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค circular dichroism spectroscopy (CD spectroscopy)

โครงสร้าง secondary structure หรือโปรตีน folding ของโปรตีน AMP48 ศึกษาโดยใช้เทคนิค circular dichroism spectroscopy ด้วยเครื่อง Jasco J-715 spectropolarimeter (Japan) โดยใช้โปรตีนความเข้มข้น 1 mg/ml ใช้ speed 20 nm/min, 2 nm bandwidth, 100 mdeg sensitivity, average response time of 2 s และ optical path length เท่ากับ 0.2 mm ผล CD spectrum แสดงในรูปที่ 2 และทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย K2D program (Andrade และคณะ, 1993) พบว่าโปรตีนนี้ประกอบด้วย α -helix ประมาณ 51%, β -sheet 9%



รูปที่ 2 CD spectrum ของโปรตีน AMP48

3.6 การออกฤทธิ์ต่อไฟบริโนเจนของมนุษย์ (human fibrinogenolytic activity)

การออกฤทธิ์ในการย่อยไฟบริโนเจนของมนุษย์ ของ AMP48 ศึกษาโดยการดัดแปลงวิธีการทดลองของ Satake และคณะ (1963) ในปฏิกิริยาการทดลองประกอบด้วย human fibrinogen (10 mg/ml) และ 4 μ g ของโปรตีน AMP48 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% TCA นำหลอดทดลองไปปั่นที่ 10,000 xg เป็นเวลา 20 นาที นำส่วน supernatant ไปวัดหาความเข้มข้นของ peptide ที่ถูกย่อยออกมาได้โดยใช้ BCA assay kit ตัวควบคุมในการทดลองหรือ Blank คือปฏิกิริยาที่ไม่เติมโปรตีน AMP48

1 unit ของ enzyme activity คือความเข้มข้นของ AMP48 ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{540} เพิ่มขึ้น 0.01 ที่ 37 °C โดย specific activity มีหน่วยเป็น units/min/mg

3.7 ผลของตัวยับยั้ง (inhibitors) และไอออนของโลหะ (metal ions) ต่อ fibrinogenolytic activity

ตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ ที่จำเพาะต่อ serine protease: phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) และ soybean trypsin inhibitor (SBTI), cysteine protease: iodoacetic acid (IAA) และ $HgCl_2$ และสำหรับ metalloproteases: ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ *O*-phenanthroline และ metal ions: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} และ Zn^{2+} ใช้สำหรับศึกษาเพื่อหาชนิดของโปรติเอสสำหรับโปรตีน AMP48 รวมทั้งศึกษาถึงผลของ metal ions ต่อ fibrinogenolytic activity ของเอนไซม์ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.6

ผลการทดลองถึงผลของตัวยับยั้ง metal ions ต่อ fibrinogenolytic activity ของ AMP48 แสดงในตารางที่ 1 พบว่าเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้อย่างมากด้วยตัวยับยั้งสำหรับเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease และ metal ions ของโลหะบางชนิด เช่น Fe^{3+} และ Zn^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานของ AMP48 ได้

3.8 ผลของ pH และ อุณหภูมิต่อ fibrinogenolytic activity

ผลของ pH ต่อ fibrinogenolytic activity ของ AMP48 ศึกษาโดยการวัด activity ของเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่ pH ต่าง ๆ คือ ตั้งแต่ 3 ถึง 12 รวมทั้งศึกษาความทนของเอนไซม์ต่อ pH ต่าง ๆ โดยการ incubate เอนไซม์ไว้ที่ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการวัด fibrinogenolytic activity ตามวิธีในข้อ 3.6

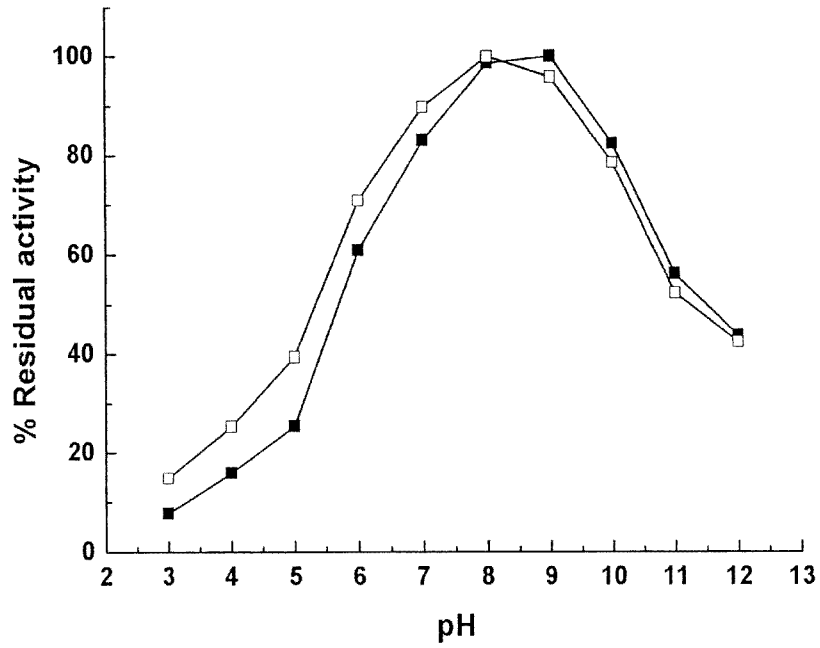
ผลการทดลองพบว่า AMP48 มี pH optimum สำหรับ fibrinogenolytic activity ที่ pH 8 และเอนไซม์มีความคงทนต่อ pH 7-10 โดยยังคงมี activity เหลืออยู่มากกว่า 80% เมื่อ incubate เอนไซม์ที่ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3)

ผลของอุณหภูมิต่อ fibrinogenolytic activity ของ AMP48 ศึกษาได้โดยการวัด activity ของเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ ตั้งแต่ 10 ถึง 95 °C และศึกษาความคงทนของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิต่าง ๆ โดยการ incubate เอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงและทำการวัด fibrinogenolytic activity ตามวิธีในข้อ 3.6

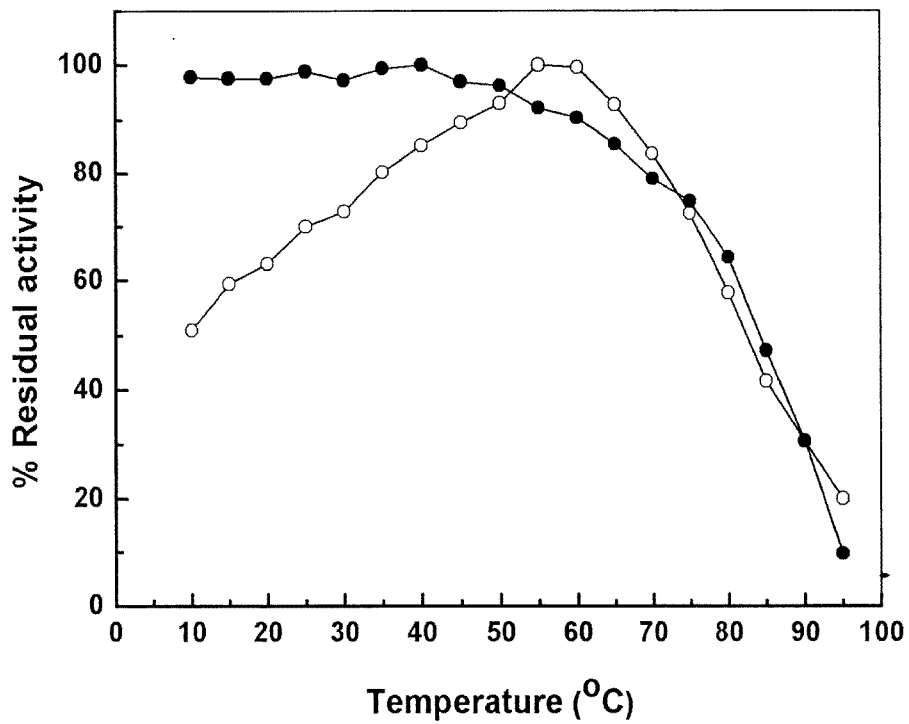
ผลการทดลองพบว่า AMP มี temperature optimum สำหรับ fibrinogenolytic activity ที่ช่วงอุณหภูมิ 55-60 °C เอนไซม์นี้จะสูญเสีย activity เกือบทั้งหมดเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 95 °C เอนไซม์มีความคงทนถึงอุณหภูมิ 50 °C (รูปที่ 4)

ตารางที่ 1 ผลของ inhibitors และ metal ions ต่อ fibrinogenolytic activity ของโปรตีน AMP48

Type of inhibitor and metal ion	Inhibitor and metal ion	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None			100
Serine protease	PMSF	10	1 ± 2
	SBTI	1	16 ± 3
Cysteine protease	Iodoacetic acid	10	109 ± 4
	HgCl ₂	10	7 ± 3
Metalloprotease	EDTA	10	30 ± 3
	O-phenanthroline	10	50 ± 2
Metal ion	Ca ²⁺	10	105 ± 2
	Mg ²⁺	10	80 ± 3
	Fe ³⁺	10	13 ± 3
	Zn ²⁺	10	34 ± 4



รูปที่ 3 ผลของ pH (□) และความคงทนต่อ pH (■) สำหรับ fibrinolytic activity ของ AMP48



รูปที่ 4 ผลของอุณหภูมิ (●) และความคงทนต่ออุณหภูมิ (○) สำหรับ fibrinolytic activity ของ AMP48

3.9 Subunit specific ต่อ fibrinogenolytic activity ของ AMP48

ความจำเพาะของ AMP48 ต่อการย่อย subunit ของ human fibrinogen สามารถทำการศึกษได้ตามวิธีของ Rajesh และคณะ (2006) โดยการผสม human fibrinogen กับ AMP48 (ปริมาณ 1-32 μg) และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย denaturing buffer (1M urea, 4% SDS และ 4% β -mercaptoethanol) ศึกษารูปแบบโปรตีนที่ได้จากการย่อย fibrinogen โดยแยกโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE ย้อมแผ่นเจลด้วย Coomassie brilliant blue R 250

จากการทดลองพบว่า เมื่อผสม human fibrinogen กับ AMP48 ที่ปริมาณต่าง ๆ พบว่า AMP48 สามารถย่อย human fibrinogen ให้กลายเป็น polypeptide ขนาดต่าง ๆ ได้มากขึ้น และปริมาณของ human fibrinogen แต่ละ subunit จะมีขนาดลดลงตามปริมาณของ AMP48 ที่มากขึ้น (รูปที่ 5.1) นอกจากนี้เมื่อศึกษาปฏิกิริยาการย่อย human fibrinogen ด้วย AMP48 ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ (0 ถึง 240 นาที) พบว่าเมื่อใช้เวลานานขึ้นเอนไซม์สามารถย่อย human fibrinogen ได้มากขึ้น (รูปที่ 5.2) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการย่อย human fibrinogen ของ AMP48 กับ human plasmin พบว่า AMP สามารถย่อย α subunit ของ human fibrinogen ได้ดีที่สุด ตามด้วย partial hydrolyze ต่อ β และ γ subunits สาย polypeptide ที่เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการย่อยคือ polypeptide ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 33 และ 28 kDa ส่วน human plasmin สามารถย่อยทุก subunit ของ human fibrinogen ได้ดีและได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นสาย polypeptide ที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 42-45 kDa และ 22-28 kDa (รูปที่ 5.3)

3.10 การออกฤทธิ์ต่อก้อนไฟบรินของมนุษย์ (fibrinolytic activity)

3.10.1 ศึกษา fibrinolytic activity ของ AMP48 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

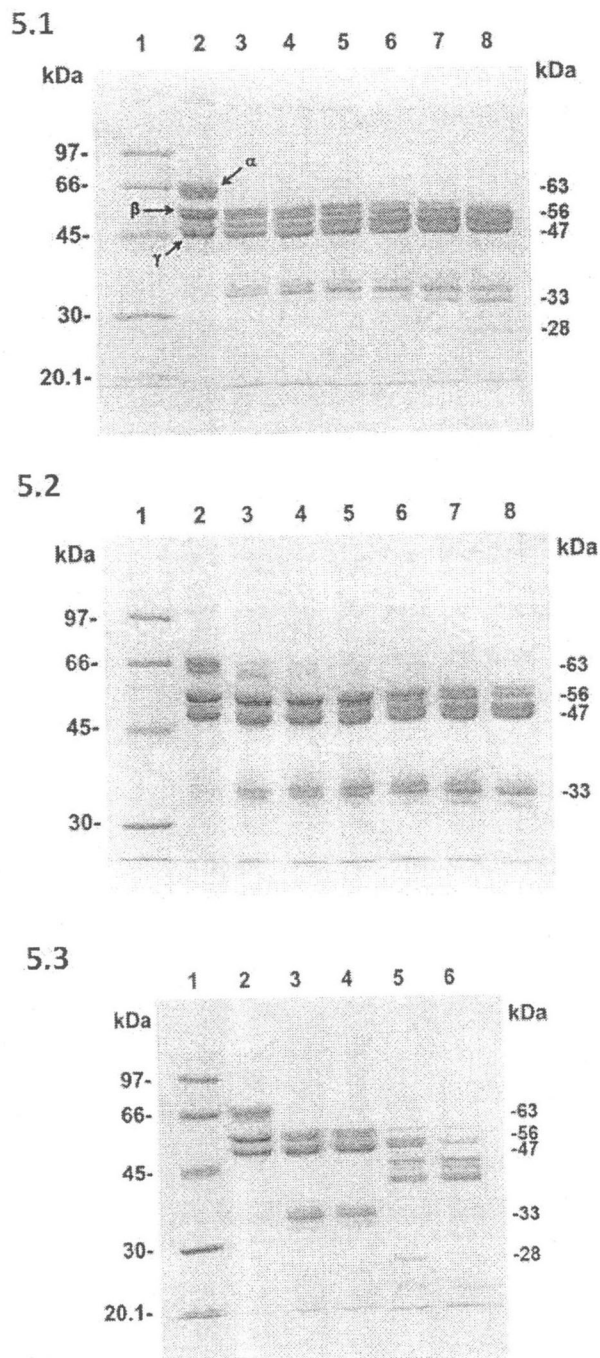
ก้อนไฟบริน (fibrin clot) สามารถเตรียมได้โดยผสม human fibrinogen กับ CaCl_2 และ Thrombin (0.25 NIH Units) ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที นำ fibrin clot ที่ได้ไปย่อยด้วย AMP48 ที่ปริมาณตั้งแต่ 0 ถึง 32 μg เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 37 °C หยุดปฏิกิริยาด้วย denaturation buffer (1 M urea, 4% SDS และ 4% β -mercaptoethanol) ศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโดยใช้ 7.5% SDS-PAGE ย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R 250 รูปแบบการย่อย fibrin clot ของ AMP48 (4 μg) จะเปรียบเทียบกับ การย่อยด้วย human plasmin (2 μg)

ผลการศึกษาพบว่า AMP48 สามารถย่อย α -chain และ α -polymer (M.W. > 400 kDa) ของ fibrin clot ได้อย่างสมบูรณ์ (รูปที่ 6) และย่อย β -chain และ γ -dimer ได้บ้าง ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย fibrin clot ของ AMP48 มีความแตกต่างกับ human plasmin (รูปที่ 6) โดย human plasmin สามารถย่อย fibrin clot ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น polypeptide มีขนาดเล็กกว่า 45 kDa ส่วน AMP48 ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น polypeptide ขนาดเล็กกว่า 40 kDa (รูปที่ 6)

3.10.2 ศึกษา fibrinolytic activity ของ AMP48 ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

Fibrinolytic activity ของ AMP48 ศึกษาได้ด้วยเทคนิค FTIR แบบ attenuated total reflectant (ATR-FTIR) spectroscopy โดยการนำ human fibrin clot ทำปฏิกิริยาการย่อยด้วย AMP48 (20 μ g) ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของ fibrin clot ในช่วง wavenumber 4000 ถึง 600 cm^{-1} ใช้ resolution 4 cm^{-1} และ 64 scans ต่อการวัด 1 ครั้ง ติดตามปฏิกิริยาการย่อยต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม OPUS 6.5 (Bruker, Germany) การทดลองใช้ human plasmin เป็น positive control

ผลการทดลองของการศึกษา fibrinolytic activity ของ AMP48 แสดงในรูปที่ 7 พบว่าโครงสร้างของทุติยภูมิของ fibrin clot มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อถูกย่อยด้วย AMP48 และ plasmin โดยทั้ง α -helix (1660 cm^{-1}) และ β -sheet (1638 cm^{-1}) มีสัญญาณ IR ลดลงเมื่อเวลาที่ใช้ในการย่อยเพิ่มขึ้น

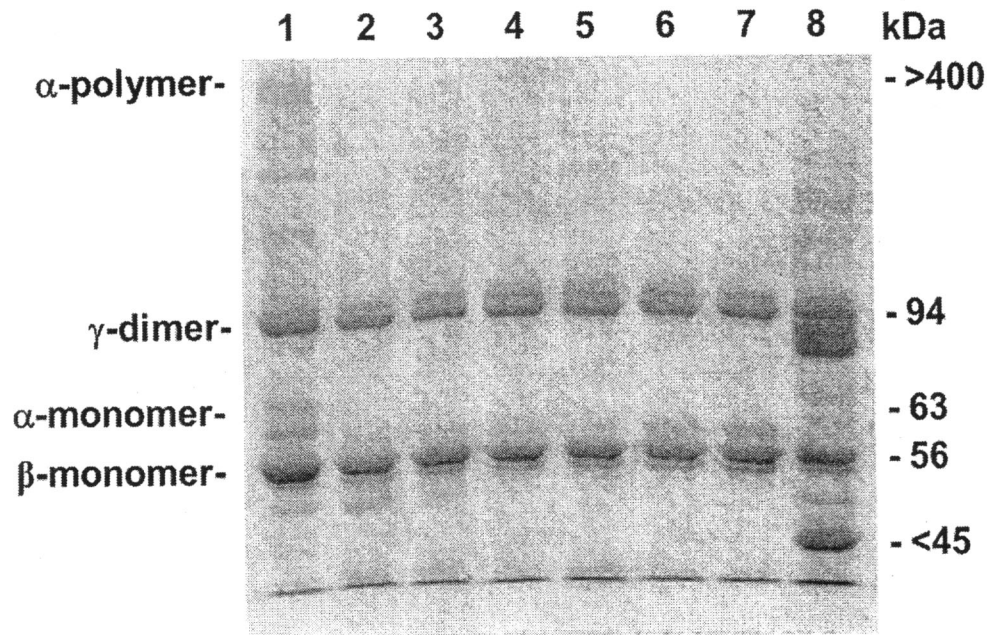


รูปที่ 5 Fibrinogenolytic activity ของ AMP48 เมื่อใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (5.1) เมื่อย่อยที่เวลาต่าง ๆ (5.2) และเปรียบเทียบรูปแบบการย่อยของ AMP48 กับ human plasmin (5.3)

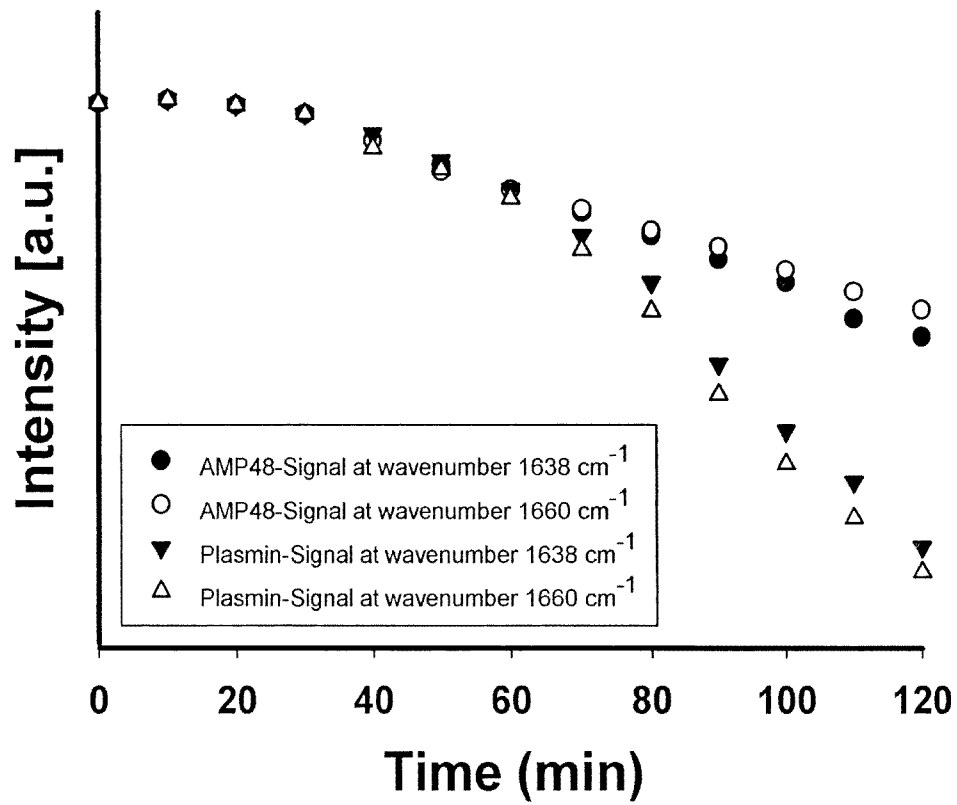
5.1: Human fibrinogen ถูกย่อยด้วย AMP48 ที่ปริมาณต่าง ๆ คือ 0 μg (lane 2), 1 μg (lane 3), 2 μg (lane 4), 4 μg (lane 5), 8 μg (lane 6), 16 μg (lane 7) and 32 μg (lane 8)

5.2: Human fibrinogen ถูกย่อยด้วย AMP48 ที่เวลาต่าง ๆ คือ 0 min (lane 2), 5 min (lane 3), 15 min (lane 4), 30 min (lane 5), 60 min (lane 6), 120 min (lane 7) and 240 min (lane 8)

5.3: Human fibrinogen ถูกย่อยด้วย AMP48 ที่ปริมาณเอนไซม์ 2 and 4 μg (lanes 3 and 4 ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับถูกย่อยด้วย human plasmin ที่ปริมาณ 1 and 2 μg (lanes 5 and 6 ตามลำดับ) โดย lane 2 คือ ปฏิกริยาที่ไม่มีเอนไซม์



รูปที่ 6 Fibrinolytic activity ของ AMP48 ศึกษาโดยการนำ human fibrin clot ทำการย่อยด้วย AMP48 ที่ปริมาณต่าง คือ 0 μg (lane 1), 1 μg (lane 2), 2 μg (lane 3), 4 μg (lane 4), 8 μg (lane 5), 16 μg (lane 6), 32 μg (lane 7) และเปรียบเทียบรูปแบบการย่อยด้วย human plasmin ปริมาณ 2 μg (lane 8) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง



รูปที่ 7 แสดงการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างทุติยภูมิของ fibrin clot เมื่อย่อยด้วย AMP78 และ human plasmin