

จลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่วหรือทองแดง

นางมารศรี อูชชิน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-812-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KINETICS OF LEAD OR COPPER BINDING ON APOCERULOPLASMIN

Mrs Marasri Ujjin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-334-812-3

มารศรี อูริน : จลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างอะโปเรอูโลพลาสตินกับตะกั่วหรือทองแดง (Kinetics of lead or copper binding on apoceruloplasmin) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุภัทญา สุนทรส ; 99 หน้า. ISBN 974-334-812-3

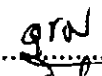
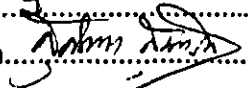
ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างอะโปเรอูโลพลาสตินของคนกับโลหะ จำเป็นต้องใช้อะโปเรอูโลพลาสติน จึงทดสอบความสามารถของสารจับโลหะ 4 ชนิด ได้แก่ penicillamine, DMPS, DTC และ EDTA ในการดึงทองแดงออกจากโมเลกุลของโฮโลเรอูโลพลาสติน พบว่าสารจับโลหะ 3 ชนิดแรกสามารถดึงทองแดงที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับออกซิเดต แอคติวิตีได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 1.0, 1.0 และ 3.5 มก./มล. ตามลำดับ ส่วน EDTA ที่ 3.5 มก./มล.สามารถลดแอคติวิตีลงได้เพียง 80% เมื่อเปรียบเทียบดูการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าระหว่างโฮโลเรอูโลพลาสตินกับเรอูโลพลาสตินทำปฏิกิริยากับสารจับโลหะทั้ง 4 ชนิด ในอิเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่เสียสภาพที่ pH 8.8 และโฮโรอิเล็กทริกโฟลด์ลิ่ง พอลิอะคริลาไมด์เจลในช่วง pH 4-6 ไม่พบความแตกต่างของทุกตัวในระบบเจลทั้ง 2 ชนิด แต่ในยูเรียพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ pH 8.4 พบว่าโฮโลเรอูโลพลาสตินที่ทำปฏิกิริยากับสารจับโลหะ DTC เคลื่อนที่ช้ากว่าโฮโลเรอูโลพลาสตินอยู่เล็กน้อยในยูเรียพอลิอะคริลาไมด์เจลที่ pH 8.4 ทำให้สันนิษฐานได้ว่าบริเวณที่จับกับทองแดงอยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีน

หลังจากทำปฏิกิริยากับ DMPS และ DTC พบว่าเรอูโลพลาสตินยังมีทองแดงเหลืออยู่ในโมเลกุล 30% และ 25% ตามลำดับ จึงเตรียมอะโปเรอูโลพลาสตินที่มีปริมาณทองแดงน้อยลงโดยไดออกซิไรกับสารจับโลหะ DTC 5 mg/ml ร่วมกับ ascorbic acid 10 mM ที่ 4°C. 5 ชม. อะโปเรอูโลพลาสตินที่ได้มีปริมาณทองแดงเพียง 2%

นำอะโปเรอูโลพลาสตินไปศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของการจับกับโลหะ จากการวิเคราะห์โดยกราฟแบบ metal-saturation curve และ double reciprocal plot พบว่าทองแดงเข้าจับกับอะโปเรอูโลพลาสตินแบบ non-cooperativity ซึ่งมีค่าคงที่ของการแตกตัว (K_d) เท่ากับ 3.20 μ M จำนวนทองแดงที่จับกับอะโปเรอูโลพลาสตินสูงสุด (n) เท่ากับ 7.25 อะตอมต่อโมเลกุล ผลจาก Scatchard plot แสดงว่าตำแหน่งที่จับกับทองแดงอาจมีมากกว่า 1 ชนิด ส่วนการจับระหว่างอะโปเรอูโลพลาสตินกับตะกั่วแตกต่างกับทองแดงคือ metal-saturation curve ซึ่งให้เห็นว่าเป็นแบบ positive allostericity และ Hill plot ให้ค่า n_H (maximum Hill slope) เท่ากับ 3.42 สำหรับการจับอย่างแน่น K_d เท่ากับ 1.10 μ M และจำนวนตะกั่วที่เข้าจับเท่ากับ 2.54 อะตอมต่อโมเลกุล สำหรับการจับอย่างหลวมค่า K_d เท่ากับ 2.67 μ M และจำนวนตะกั่วที่เข้าจับเท่ากับ 2.84 อะตอมต่อโมเลกุล ได้ศึกษาการจับระหว่างตะกั่วกับโฮโลเรอูโลพลาสตินด้วย เพื่อยืนยันว่าตะกั่วสามารถแทนที่ทองแดงในโฮโลเรอูโลพลาสตินพบว่ารูปแบบการจับเป็นแบบ positive allostericity เช่นกัน มีค่า n_H (maximum Hill slope) เท่ากับ 1.72 สำหรับการจับอย่างแน่น K_d เท่ากับ 0.54 μ M และจำนวนตะกั่วที่เข้าจับ เท่ากับ 1.49 สำหรับการจับอย่างหลวมค่า K_d เท่ากับ 2.80 μ M และจำนวนตะกั่วที่เข้าจับเท่ากับ 1.79 ผลที่ได้เสนอว่า allosterism อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแทนที่



ภาควิชา..... ชีวเคมี ...
สาขาวิชา..... ชีวเคมี ...
ปีการศึกษา... 2542 ...

ลายมือชื่อนิสิต..... 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C828175 : MAJOR BIOCHEMISTRY

MARASRI UJJIN : KINETICS OF LEAD OR COPPER BINDING ON APOCERULOPLASMIN.

THESIS ADVISOR : ASIST. PROF. SUGANYA SOONTAROS, Ph.D. 91 pp.

ISBN 974-334-812-3

In an attempt to study metal-binding kinetics of human ceruloplasmin, apocerulplasmin (aCP) was required. Four metal chelators, namely, penicillamine, DMPS, DTC and EDTA were screened for their ability in chelating Cu from the holoceruloplasmin (hCP). The three former chelators, concentration of 1.0, 1.0 and 3.5 mg/ ml could completely remove Cu-required oxidase activity from the hCP, respectively. 3.5 mg/ml EDTA could only 80% inhibit the enzyme. Electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel at pH 8.8 or isoelectric focusing (pH4-6) polyacrylamide gel could not be used to confirm the chelation. Different migration of hCP and metal-chelated CP in urea gel at pH 8.4 was obtained. This suggested that the binding sites for oxidase required Cu were deeply located in the protein molecule.

After the chelation with DMPS and DTC, the CP still retained Cu content of 30% and 25%, respectively. Extensive removal of Cu was done by dialyzing the CP with 5 mg/ml DTC in the presence of 10 mM ascorbic acid at 4°C for 5 hr, aCP with 2% Cu retained was obtained.

The obtained aCP was used to study metal-binding kinetics. The binding of Cu to aCP, analyzed with metal-saturation curve and double reciprocal plot showed non-cooperativity with K_d of 3.20 μ M and the number of Cu binding (n) of 7.25 atoms/molecule. Results from Scatchard plot suggested the heterogeneity of Cu binding. Pb binding differed from the former by its nature, i.e. the positive allostericity was obtained on Pb-saturation curve . Analyzed with Hill plot showed the n_H (maximum Hill plot) of 3.42, K_d of 1.10 μ M and n of 2.54 atoms/molecule for strong binding, K_d of 2.67 μ M and n of 2.84 atoms/molecule for weak binding. Pb binding was also performed on the hCP to confirm that the metal could replace the native Cu on the molecule. Allostericity was again obtained with n_H of 1.72, K_d of 0.54 μ M and n of 1.49 atoms/molecule for strong binding, K_d of 2.80 μ M and n of 1.79 atoms/molecule for weak binding. The result suggested that allosterism may serve as a main factor for the replacement.

ภาควิชา..... ชีวเคมี
สาขาวิชา..... ชีวเคมี
ปีการศึกษา... 2542 ...

ลายมือชื่อนิสิค.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับถูกลงได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากผู้เกี่ยวข้องหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภัทญา จันทรส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆในงานวิจัยในทุกด้าน ตลอดจนตรวจแก้ไขรายละเอียดต่างๆของวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ได้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์ ประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ที่กรุณาสละเวลาเพื่อเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา ชัยศิริ และรองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย ที่กรุณาให้คำแนะนำในแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัยจึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ อาจารย์ ชำราชากร เจ้าหน้าที่ นิสิตภาควิชาชีวเคมีและภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำย่อ.....	ท
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1. ตะกั่ว.....	1
2. เซอร์โคไลพลาสมีน.....	4
2.1 สรีรวิทยาและหน้าที่ของเซอร์โคไลพลาสมีน.....	4
2.2 โครงสร้างของเซอร์โคไลพลาสมีน.....	5
2.3 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของออกซิเดส	11
3. สารจับโลหะ.....	12
4. จลนพลศาสตร์ของการเข้าจับ.....	15
5. วัตถุประสงค์.....	20
6. ขั้นตอนของงานวิจัย.....	20
7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	20
2 วัตถุประสงค์และวิธีทดลอง.....	21
1. สารเคมี	21
2. เครื่องมือ	23
3. วิธีการทดลอง.....	24
1. โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน.....	24
2. การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์อะตอมมิกแอบซอร์ปชัน.....	24

	หน้า
3. การหาแอดคิตีวิตี้ของเซอร์คูโลพลาสมีน	26
4. เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่ต่อเนื่อง	27
5. ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง	29
6. การหาปริมาณโปรตีน.....	31
7. เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบยูเรีย.....	32
8. การเตรียมอะโปเซอร์คูโลพลาสมีน	34
3 ผลการทดลอง	35
1. ผลของสารจับโลหะต่อออกซิเดส แอดคิตีวิตี้และการเคลื่อนที่ ในสนามไฟฟ้า.....	35
1.1 ผลของสารจับโลหะต่อออกซิเดส แอดคิตีวิตี้ของ เซอร์คูโลพลาสมีน.....	35
1.2 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ของเซอร์คูโลพลาสมีนใน อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียดสภาพ	37
1.3 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า ของเซอร์คูโลพลาสมีนในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง	39
1.4 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของ เซอร์คูโลพลาสมีนในยูเรียเจล.....	41
1.5 ผลของสารจับโลหะ DMPS และ DTC ต่อออกซิเดส แอดคิตีวิตี้ และปริมาณทองแดงของเซอร์คูโลพลาสมีน.....	43
2. การเติมทองแดงกลับเข้าสู่ไมเลกุลของเซอร์คูโลพลาสมีน.....	45
3. ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของอะโปเซอร์คูโลพลาสมีน ต่อการจับกับทองแดง.....	47
3.1 การหาปริมาณอะโปเซอร์คูโลพลาสมีนที่เหมาะสมกับทองแดง.....	47
3.2 จลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างทองแดงกับ อะโปเซอร์คูโลพลาสมีน.....	47

4. ผลของการศึกษาจลนพลศาสตร์ของอะโปเซอรูโลพลาสติน	
ต่อการจับกับตะกั่ว.....	54
4.1 การหาปริมาณอะโปเซอรูโลพลาสตินที่เหมาะสมกับตะกั่ว.....	54
4.2 จลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสติน	
กับตะกั่ว	54
5. ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของไฮโดเซอรูโลพลาสติน	
ต่อการจับกับตะกั่ว.....	61
4 บทวิจารณ์.....	68
5 สรุปผลการทดลอง	78
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	89
ประวัติผู้วิจัย.....	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ระดับความเข้มข้นของตะกั่วต่ำสุดที่มีผลต่อร่างกายที่อวัยวะต่างๆ3
2	ลักษณะการจับของทองแดงกับกรดอะมิโนในโปรตีน.....8
3	ภาวะของการวัดปริมาณทองแดงของเครื่องอะตอมมิกแอนบรอปชัน25
4	ภาวะของการวัดปริมาณตะกั่วของเครื่องอะตอมมิกแอนบรอปชัน.....25
5	ส่วนผสมสารละลายไนโอเล็กโทรไฟริซิสแบบไม่เสียดสภาพ.....28
6	ส่วนผสมสารละลายที่ใช้ในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง.....30
7	ส่วนผสมสารละลายยูเรียพอลิอะคริลาไมด์เจล.....33
8	ผลของการเติมทองแดงกลับเข้าสู่เซอร์โพลลาสมินที่ทำปฏิกิริยากับ DTC46
9	Dissociation constant และค่าจำนวนทองแดงที่จับกับอะโปเซอร์โพลลาสมิน สูงสุด (n) จากการเขียนกราฟแบบ Saturation curve แบบ Double reciprocal plot และแบบ Scatchard plot.....53
10	ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของโลหะต่อเซอร์โพลลาสมิน.....77
11	ผลโดยละเอียดของการเติมทองแดงในเซอร์โพลลาสมินที่บ่มกับสารจับโลหะ DTC.....91

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1	โมเลกุลเชอริโลพลาสตินแสดงลักษณะของ domain ทั้ง 6 ใน β -barrel ของเชอริโลพลาสติน7
2	ระยะระหว่างทองแดงในแต่ละ domain ในเชอริโลพลาสติน9
3	บริเวณ labile site ของ metal cation ในเชอริโลพลาสติน10
4	บริเวณของทองแดงประเภทที่ 1 จับกับเชอริโลพลาสตินใน domain 2, 4, 611
5	โครงสร้างทางเคมีของสารจับโลหะ Penicillamine, EDTA, DMPS, DTC ที่เข้าจับกับโลหะ13
6	ผลของ Penicillamine, DMPS, EDTA, DTC ต่อออกซิเดส แอคติวิตี36
7	ผลของสารจับโลหะ EDTA, Penicillamine, DMPS, DTC ต่อการเคลื่อนที่ของเชอริโลพลาสตินในอิเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่เสียดสภาพ.....38
8	ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ของเชอริโลพลาสติน ใน isoelectric focusing polyacrylamide gel40
9	ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของเชอริโลพลาสตินในยูเรียเจลที่ pH 8.4.....42
10	ผลของสารจับโลหะ DMPS และ DTC ต่อออกซิเดส แอคติวิตี และปริมาณทองแดงของเชอริโลพลาสติน44
11	ผลของความเข้มข้นของอะโปเชอริโลพลาสตินต่อการจับกับทองแดง48
12	การเขียนกราฟแบบ Saturation curve ของการจับระหว่างอะโปเชอริโลพลาสตินกับทองแดง49
13	การเขียนกราฟแบบ Double reciprocal plot ของการจับระหว่างอะโปเชอริโลพลาสตินกับทองแดง50
14	การเขียนกราฟแบบ Scatchard plot ของการจับระหว่างอะโปเชอริโลพลาสตินกับทองแดง51

รูปที่	หน้า
15 ผลของความเข้มข้นของอะโปเซอรูโลพลาสมีนต่อการจับกับตะกั่ว.....	55
16 การเขียนกราฟแบบ Saturation curve ของการจับระหว่าง อะโปเซอรูโลพลาสมีนกับตะกั่ว.....	56
17 การเขียนกราฟแบบ Double reciprocal plot ของการจับระหว่าง อะโปเซอรูโลพลาสมีนกับตะกั่ว.....	57
18 การเขียนกราฟแบบ Scatchard plot ของการจับระหว่าง อะโปเซอรูโลพลาสมีนกับตะกั่ว.....	58
19 การเขียนกราฟแบบ Hill plot ของการจับระหว่าง อะโปเซอรูโลพลาสมีนกับตะกั่ว.....	59
20 ผลของความเข้มข้นของตะกั่วต่อการลดลงของทองแดงและ ออกซิเดส แอคติวิตีของไฮโลเซอรูโลพลาสมีน.....	62
21 การเขียนกราฟแบบ Saturation curve ของการจับระหว่าง ไฮโลเซอรูโลพลาสมีนกับตะกั่ว.....	63
22 การเขียนกราฟแบบ Double reciprocal plot ของการจับระหว่าง ไฮโลเซอรูโลพลาสมีนกับตะกั่ว.....	64
23 การเขียนกราฟแบบ Scatchard plot ของการจับระหว่าง ไฮโลเซอรูโลพลาสมีนกับตะกั่ว.....	65
24 การเขียนกราฟแบบ Hill plot แสดงการจับระหว่าง ไฮโลเซอรูโลพลาสมีนกับตะกั่ว.....	66
25 แผนภาพแสดงการเติมทองแดงกลับเข้าสู่เซอรูโลพลาสมีนที่ทำปฏิกิริยากับDTC.....	90

คำย่อ

ชม.	ชั่วโมง
°ซ	องศาเซลเซียส
ชม.	เซนติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
A	Absorbance
BSA	Bovine serum albumin
aCp	อะโปเซอรูโพลลาสมิน
Cp	เซอรูโพลลาสมิน
hCp	ไฮโดเซอรูโพลลาสมิน
Cu	ทองแดง
Disc-PAGE	discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis
DMPS	2, 3-dimercapto-1-propanesulfonic acid
DTC	sodium diethyldithiocarbamate
EDTA	ethylenediamine tetra acetic acid
F-AAS	furnace atomic absorption spectrophotometer
M	molar
μ l	microlitre
μ M	micromolar
μ mole	micromole
mg	milligram
ml	millilitre
nm	nanometre
Pb	ตะกั่ว
ppb	part per billion (ng/l)
PPD	p-phenylenediamine-di-hydrochloride
ppm	part per million (μ g/l)

TEMED N,N,N,N-tetraethylmethylenediamine
Tris tris-(hydroxymethyl)-aminomethane



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย