

ผลของสารพวกซิลิโคนาไมด์ต่อไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส จาก Escherichia coli

นางสาวนภาพร สายอุบล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดำรงหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2526

ISBN 974-562-687-2

015199

Effect of Sulfonamides on Dihydropteroate Synthase from  
Escherichia coli

Miss Napaporn Sai-Ubol

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

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1983

ISBN 974-562-687-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์      ผลของ สารพวกซัลโฟนาไมด์ต่อโคไลโครพเทอโรเอท ซินเทส จาก  
Escherichia coli  
โดย                              นางสาวนภาพร สายอุบล  
ภาควิชา                              ชีวเคมี  
อาจารย์ที่ปรึกษา              ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชัย สุทธิมูล

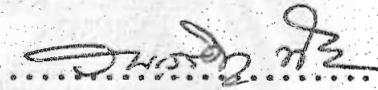
---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุประดิษฐ์ บุญาค)

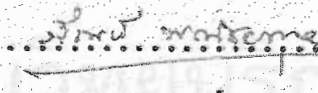
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรร เสริฐ ทรัพย์โตษก)



.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชัย สุทธิมูล)



.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สัท พันธ์ยกุล)



.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

|                   |  |
|-------------------|--|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ผลของสารพวกซัลโฟนาไมด์ต่อไดไฮโดรเพอโรเอท ซินเทสจาก <u>Escherichia coli</u> |
| ชื่อผู้ผลิต       | นางสาว นภาพร สายอุบล   |
| อาจารย์ที่ปรึกษา  | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชัย ลู่ธิมูล                                       |
| ภาควิชา           | ชีวเคมี  |
| ปีการศึกษา        | 2526   |

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลการยับยั้งของสารพวกซัลโฟนาไมด์ 5 ชนิด ต่อการทำงานของไดไฮโดรเพอโรเอท ซินเทส จาก Escherichia coli โดยการหาค่าของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (MIC) ค่าของความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $I_{50}$ ) และค่าคงที่ของการยับยั้ง ( $K_I$ ) พบว่าค่า MIC ของ sulfanilamide ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลซี-บรอก เทเท่ากับ  $4.30 \times 10^{-2}$  โมล/ลิตร และในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคสค่า MIC ของ sulfanilamide และ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide เท่ากับ  $1.31 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร และ  $2.91 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาค่า  $I_{50}$  ของซัลโฟนาไมด์ที่มีต่อ enzyme ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่า 20 - 60% พบว่าค่า  $I_{50}$  ของ sulfanilamide, N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine, p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate และ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine เท่ากับ  $2.15 \times 10^{-3}$ ,  $3.23 \times 10^{-3}$ ,  $3.35 \times 10^{-3}$  และ  $2.70 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร ตามลำดับ หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีแอฟทินีโคโรมาโตรกราฟีปรากฏว่าได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 209 เท่า แต่อย่างไรก็ตามจากการทำอะโครลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแท่งพบว่า มีแถบของโปรตีน 7 แถบ คุณสมบัติที่เหมาะสมของการทำงานเอนไซม์เท่ากับ 45 - 46 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 8.58 ค่า  $K_m$  ของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเท่ากับ  $2.86 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร และค่า  $K_I$

ของ sulfanilamide, p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide, N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine, p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate และ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine เท่ากับ  $4.30 \times 10^{-4}$ ,  $7.50 \times 10^{-4}$ ,  $3.50 \times 10^{-4}$ ,  $5.38 \times 10^{-4}$  และ  $7.50 \times 10^{-6}$  โมล/ลิตร ตามลำดับ พบว่าการยับยั้งของสารพวกซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด เป็นแบบแข่งขันกับกรดฟารา-อะมิโนเบนโซอิก



and 45 - 46° C, respectively. The  $K_m$  value for p-aminobenzoic acid was  $2.86 \times 10^{-5}$  mol/l. The  $K_i$  values for sulfanilamide, p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide, N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine, p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate and 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine were  $4.30 \times 10^{-4}$ ,  $7.50 \times 10^{-4}$ ,  $3.50 \times 10^{-4}$ ,  $5.38 \times 10^{-4}$  and  $7.50 \times 10^{-6}$  mol/l, respectively. All five sulfonamides were competitive inhibitors with p-aminobenzoic acid.

## กิติกรรมประกาศ

ผู้เขียนใคร่ขอขอบพระคุณ และ ขอขอบคุณ ท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ  
 ให้กำลังใจ และ ให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชัย สุทธิมูล  
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพย์โตษก  
 รองศาสตราจารย์ ดร. สันต์ พณิชยกุล  
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ  
 ดร. สุกัญญา สุนทรส  
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภาดา สุรัตนวิกุล  
 คุณองอาจ ภัทธีวงศกร  
 นิสิตปริญญาโทภาคริชาชีวเคมีทุกท่าน

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา และ ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
 มหาวิทยาลัย ที่ให้ยืมเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

และขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยบางส่วน



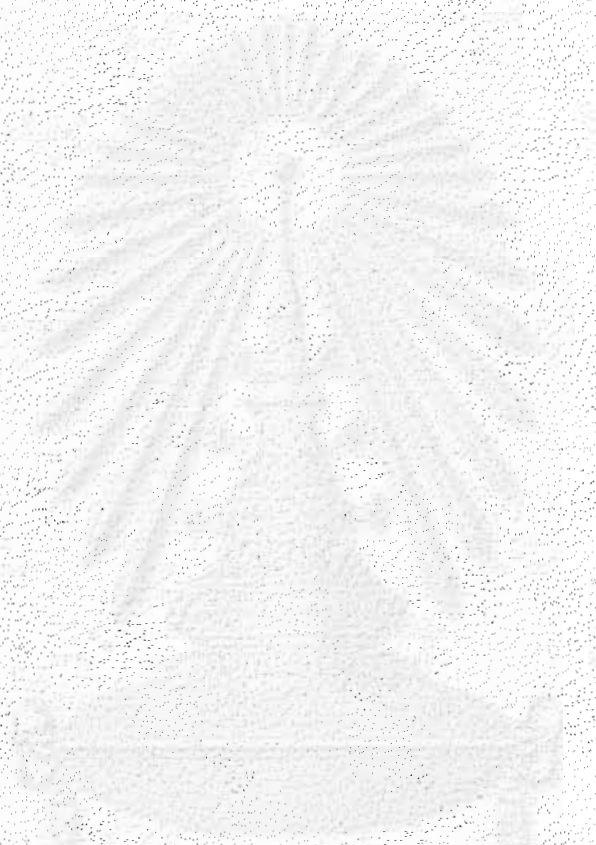
## สารบัญ

|   | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย .....   | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....  | ฉ    |
| กิจกรรมประกาศ .....   | ฉ    |
| สารบัญ .....  | ญ    |
| สารบัญตาราง .....   | ค    |
| สารบัญภาพ .....   | ค    |
| คำย่อ .....   | ฅ    |
| บทที่   |      |
| 1    บทนำ   |      |
| 1.1   คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพเทอริน .....                  | 2    |
| 1.2   คุณสมบัติโดยทั่วไปของโคไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส .....            | 4    |
| 1.3   วิธีการวัดแอกติวิตีของโคไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส .....           | 8    |
| 1.4   ผลของซิลโฟนาไมด์ต่อโคไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส .....              | 8    |
| 1.5   วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....                                 | 10   |
| 2    วัสดุภัณฑ์ เครื่องมือ และ เคมีภัณฑ์                            |      |
| 2.1   วัสดุภัณฑ์ .....  | 11   |
| 2.2   เครื่องมือ .....  | 11   |
| 2.3   เคมีภัณฑ์ .....   | 13   |
| 2.4   จุลชีพที่ใช้ในการทดลอง .....                                  | 14   |
| 3    วิธีการทดลอง   |      |
| 3.1   อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย .....                               | 15   |
| 3.2   การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง .....                       | 16   |
| 3.3   การเก็บ <u>E. coli</u> ที่ใช้ในการทดลอง .....                 | 21   |
| 3.4   การเลี้ยง <u>E. coli</u> เพื่อเก็บเซลล์ไว้ใช้ในการศึกษา ..... | 21   |
| 3.5   การหาปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ .....     | 21   |

| บทที่ | หน้า  |
|-------|---|
| 3.6   | การหาปริมาณโปรตีน .....21   |
| 3.7   | การทดสอบสีของสารประกอบพวกเอมีน .....22  |
| 3.8   | การเตรียม DHPP .....22  |
| 3.9   | การหาจำนวนเซลล์ของ <u>E. coli</u> .....24   |
| 3.10  | การหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารพวกซิลโฟนาไมด์ ในการยับยั้ง<br>การเจริญเติบโตของ <u>E. coli</u> .....24   |
| 3.11  | การเปรียบเทียบความสามารถของสารพวกซิลโฟนาไมด์ที่มีความเข้มข้น<br>เท่ากัน ( $9.00 \times 10^{-4}$ โมล/ลิตร) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ<br><u>E. coli</u> ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่ากลูโคส .....25 |
| 3.12  | การทำลายผนังเซลล์ของ <u>E. coli</u> โดยใช้โซนิคเคเตอร์ .....25  |
| 3.13  | การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-60 % .....25   |
| 3.14  | การวัดแอกติวิตีของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส .....26   |
| 3.15  | การหาค่า $I_{50}$ ของซิลโฟนาไมด์ .....27  |
| 3.16  | การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีแอฟฟิวดิโครมาโตกราฟี .....28   |
| 3.17  | การศึกษาคุณสมบัติบางประการของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส .....30  |
| 3.18  | การแยกโปรตีนด้วยโพลีอะครีลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ชนิดแห้ง ...34  |
| 4     | ผลการทดลอง  |
| 4.1   | ผลการหาจำนวนเซลล์ของ <u>E. coli</u> .....36   |
| 4.2   | ผลการหาความเข้มข้นต่ำสุดของซิลโฟนาไมด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต<br>ของ <u>E. coli</u> .....36  |
| 4.3   | ผลการเปรียบเทียบความสามารถของซิลโฟนาไมด์เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่า<br>กัน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ <u>E. coli</u> .....40   |
| 4.4   | ผลการหาค่า $I_{50}$ ของซิลโฟนาไมด์ .....40  |
| 4.5   | ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยแอฟฟิวดิโครมาโตกราฟี .....40   |
| 4.6   | ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส ...53  |
| 4.7   | ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง $\frac{K_i}{K_m}$ กับ $\left(\frac{I}{S}\right)_{0.5}$ .....61   |
| 5     | วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง .....70  |

เอกสารอ้างอิง .....80

ประวัติผู้เขียน .....88



สถาบันวิจัยประชากร  
 และสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล

สารบัญตาราง

| ตารางที่ |  | หน้า |
|----------|--|------|
| 1        | แสดงคุณลักษณะของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ กัน .....  | 5    |
| 2        | แสดงการหาจำนวนเซลล์ของ <u>E.coli</u> .....   | 37   |
| 3        | แสดง % recovery ของวิธีการหาปริมาณกรตพารา-อะมิโนเบนโซอิก ..  | 39   |
| 4        | แสดงความสามารถของซัลโฟนาไมด์ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ <u>E.coli</u> ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคส ..... | 41   |
| 5        | แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอตหาค่า I <sub>50</sub> ของ sulfanilamide.....  | 42   |
| 6        | แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอตหาค่า I <sub>50</sub> ของ N,N'-bis-(sulfanilyl)-L-cystine.....                            | 44   |
| 7        | แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอตหาค่า I <sub>50</sub> ของ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate.....         | 46   |
| 8        | แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอตหาค่า I <sub>50</sub> ของ 4-(4-aminobenzene-sulfonamido) benzenesulfonamidoglycine.....   | 48   |
| 9        | แสดงขั้นตอนการแยกไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส จาก <u>E.coli</u> .....   | 50   |
| 10       | แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง $\frac{K_i}{K_m}$ กับ $\left(\frac{I}{S}\right)_{0.5}$ .....                  | 67   |
| 11       | สรุปผลการทดลองผลของซัลโฟนาไมด์ที่มีต่อไดไฮโดรพเทอโรเอทซินเทส .....   | 69   |

## สารบัญภาพ

| รูป |   | หน้า |
|-----|---|------|
| 1   | แสดงปฏิกิริยาการเกิด 7,8-ไดไฮโดรฟเทอโรเอท.....  | 1    |
| 2   | แสดงขบวนการสร้างกรดไดไฮโดรโฟลิก.....  | 6    |
| 3   | เส้นกราฟมาตรฐานของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก.....   | 38   |
| 4   | กราฟแสดงค่า $I_{50}$ ของ sulfanilamide.....   | 43   |
| 5   | กราฟแสดงค่า $I_{50}$ ของ N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine.....                                | 45   |
| 6   | กราฟแสดงค่า $I_{50}$ ของ sodium-p-aminobenzenesulfonamido-<br>propyl thiosulfate.....       | 47   |
| 7   | กราฟแสดงค่า $I_{50}$ ของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzene-<br>sulfonamidoglycine ..... | 49   |
| 8   | ผลการแยกไดไฮโดรฟเทอโรเอท ซินเทส โดยวิธีแอฟฟิวดิโครมาโต-<br>กราฟฟี.....                      | 51   |
| 9   | เส้นกราฟมาตรฐานของ BSA.....   | 52   |
| 10  | แสดงผลการทำอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....  | 54   |
| 11  | กราฟแสดงการหาช่วงเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบต .....   | 55   |
| 12  | กราฟแสดงการหาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา .....                                      | 56   |
| 13  | กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา .....  | 57   |
| 14  | กราฟแสดง pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา .....  | 58   |
| 15  | กราฟแสดงการหาอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา .....  | 59   |
| 16  | กราฟแสดงการหาค่า $K_m$ ของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก .....                                      | 60   |
| 17  | กราฟแสดงการหาค่า $K_1$ ของ sulfanilamide .....  | 62   |
| 18  | กราฟแสดงการหาค่า $K_1$ ของ p-aminobenzenesulfonamidopropyl-<br>bromide .....                | 63   |
| 19  | กราฟแสดงการหาค่า $K_1$ ของ N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine .....                             | 64   |
| 20  | กราฟแสดงการหาค่า $K_1$ ของ sodium-p-aminobenzenesulfonamido-<br>propyl thiosulfate .....    | 65   |
| 21  | กราฟแสดงการหาค่า $K_1$ ของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido)<br>benzenesulfonamidoglycine ..... | 66   |

## คำย่อ

DHP = 7,8-dihydropterolate

DPP = 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylpteridine pyrophosphate

DHPP = 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine  
pyrophosphate

pABA = p-aminobenzoic acid

BIS = N,N'-Methylenebisacrylamide

TEMED = N N N'N'-Tetramethyl-ethylenediamine

PPO = Diphenyloxazole

Dimethyl POPOP = 1,4-bis-2(4-methyl-5-phenyloxazolyl) benzene

MIC = Minimum inhibitory concentration

$I_{50}$  = Concentration required for 50 % inhibition

$K_i$  = Inhibitor constant

$K_m$  = Michaelis - Menten constant

OD = Optical density

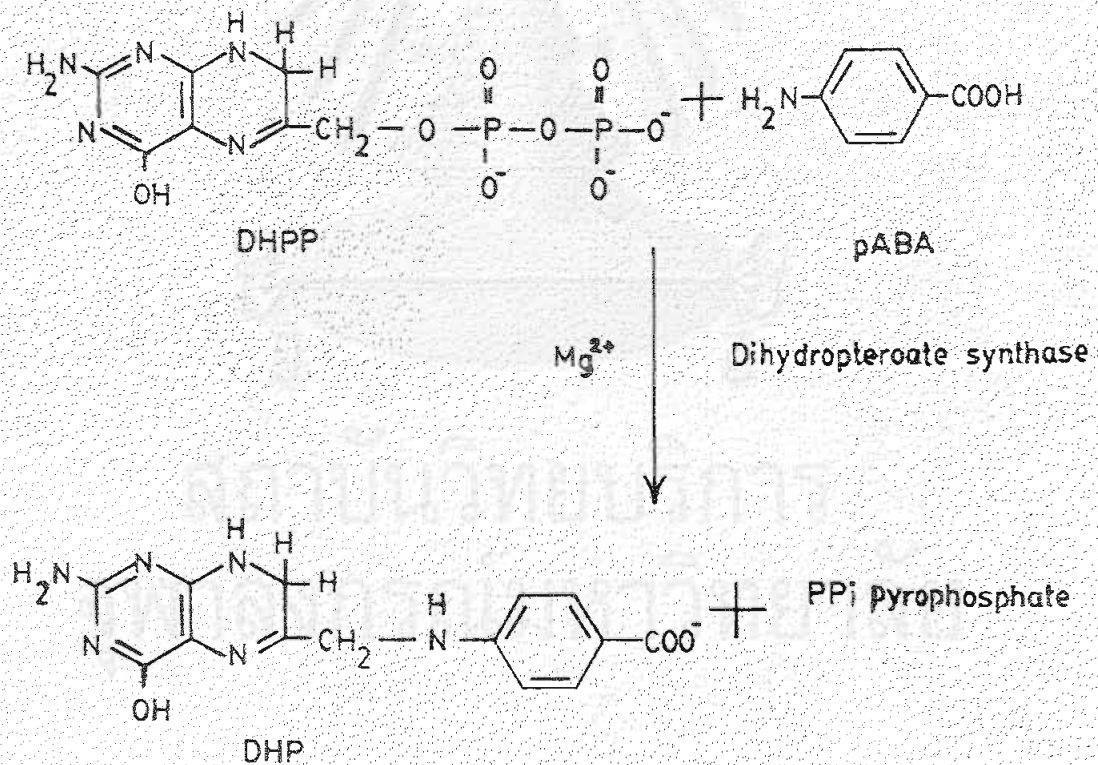
nm = nanometre

SD. = standard deviation

บทที่ 1

บทนำ

ไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส (E.C. 2.5.1.15) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา  
การเกิด 7, 8 - ไดไฮโดรพเทอโรเอท (7, 8-dihydropteroate; DHP) และ  
ไพโรฟอสเฟต (PPi) โดยมี 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7,  
8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอสเฟต (2-amino-4-hydroxy-6-hydro-  
xymethyl-7, 8-dihydropteridine pyrophosphate; DHPP) และกรด พารา-  
อะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid; pABA) เป็นสับสเตรท

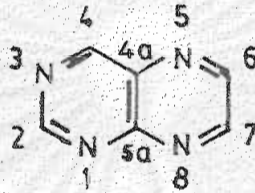


รูปที่ 1 แสดงปฏิกิริยาการเกิด 7, 8 - ไดไฮโดรพเทอโรเอท โดยมีเอนไซม์ไดไฮโดร-  
พเทอโรเอท ซินเทส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Iwai, 1980)

### 1.1 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพเทอริน (pterins) (Blakley, 1969)

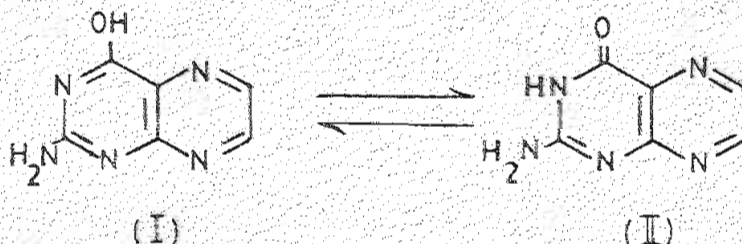
ปัจจุบันคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของ DHPP ยังไม่มีการศึกษากันมากนัก แต่เนื่องจาก DHPP ประกอบด้วยวงพเทอริน (pteridine ring) ดังนั้นจึงควรมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับอนุพันธ์ของพเทอรินอื่น ๆ

โครงสร้างทางเคมีของพเทอรินประกอบด้วย วงไพราซีน (pyrazine ring) รวมอยู่กับวงไพริมิดีน (pyrimidine ring) ดังรูปที่แสดงข้างล่างนี้



คำว่า "พเทอริน" หมายถึง 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี พเทอริน พเทอรินมีความสามารถในการละลายทั้งในน้ำและในตัวทำละลายที่ไม่เป็นโพลาร์ (non-polar solvents) แต่พเทอรินละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อย เพราะว่ามี 2-อะมิโนกลุ่ม และ 4-ไฮดรอกซีกลุ่ม สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonding) ระหว่างโมเลกุลของพเทอริน ซึ่งทำให้พเทอรินมีความเสถียร (stable) มากกว่าพเทอรินในไนโตรเจนในวงพเทอรินสามารถดึงอิเล็กตรอนออกจาก ring ทำให้สภาวะเสถียรอะโรมาติก (aromatic stabilization) ของ ring ลดน้อยลง แต่ในอะมิโนกลุ่มและไฮดรอกซีกลุ่มในพเทอริน เป็นกลุ่มที่ปล่อยอิเล็กตรอน (electron-releasing group) เมื่ออิเล็กตรอนสามารถหมุนเวียนในโมเลกุลได้มากขึ้น จึงทำให้มีความเสถียรมากขึ้น พบว่าถ้ามีกลุ่มที่ปล่อยอิเล็กตรอนมากขึ้นแล้วความเสถียรจะเพิ่มมากขึ้น เช่น Xanthopterin (6-hydroxypterin) สามารถทนต่อการต้มในกรดเกลือ 7 โมล/ลิตร และเมื่อต้มในเบสเรียมไฮดรอกไซด์ 1.5 โมล/ลิตร จะมีผลต่อความเสถียรเล็กน้อย

พเทอรินเมื่ออยู่ในสมดุลจะมีโครงสร้าง 2 แบบคือ แบบ enolic (I) และแบบ cyclic amide (II) ดังที่แสดงในรูป





เมื่ออยู่ในสมดุลเพเทอร์รินจะอยู่ในรูปแบบ cyclic amide (II) มากกว่าแบบ enolic (I)

Dieffenbacher และคณะ (1966) ได้ศึกษาเพเทอร์รินและอนุพันธ์ของเพเทอร์ริน เลื่อนความเห็นว่า ค่า basic pKa จะหมายถึงโปรโตเนชันที่ N(1) หรือในกรณีของ อนุพันธ์บางตัวจะเป็นที่ N(3) ส่วน acidic pKa ของอนุพันธ์ของเพเทอร์รินจะเป็นค่าของ 4-ไฮดรอกซี หรือ 3-อะมิโด (3-amido) กรุ๊ป

เพเทอร์รินถูกรีดิวซ์ได้ด้วยสารเคมีหลายชนิดเช่น โซเดียมไดไทโอไนท์ (sodium dithionite) โซเดียมหรือโพแทสเซียมโบโรไฮไดรด์ (sodium or potassium borohydride) รีดักชันของเพเทอร์รินจะเกิดขึ้นที่วงไพราซีน (pyrazine ring) เพราะวงไพราซีนถูกรีดิวซ์ได้ค่อนข้างง่าย ในขณะที่ไพริมิดีนถูกรีดิวซ์ยากโดยเฉพาะในสารละลายต่าง พบว่ากรุ๊ปที่ปล่อยอิเล็กตรอน (electron-releasing group) ซึ่งเพิ่มความเสถียรให้เพเทอร์รินจะเป็นตัวลดความเสถียรของเพเทอร์รินหลังจากถูกรีดิวซ์แล้ว ดังนั้นสารละลายที่ถูกรีดิวซ์ที่ตำแหน่งที่ 7 และ 8 (7, 8 - dihydro compound) บางตัวจะถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็นสารเดิมได้ในสารละลายกรดและในสารละลายต่าง ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถป้องกันได้ โดยใช้ 2-เมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และไดไทโอเทรียทอล (dithiothreitol) (Futterman, 1957; Shiota และคณะ 1969; Zakrzewski, 1966; Ferone, 1973)

การหาปริมาณ DHPP ที่เกิดขึ้นหลังปฏิกิริยารีดักชัน โดยการรีดิวซ์ DPP ด้วยโซเดียมไดไทโอไนท์ ในสารละลายที่มี pH 4 ป็นกลาง DHPP ที่เกิดขึ้นสามารถหาความเข้มข้นได้โดยการวัดความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตร และใช้ค่า molar extinction coefficient เท่ากับ  $6,200 \text{ (โมล/ลิตร)}^{-1}$  (เช่นซี.เมตร) $^{-1}$  (Shiota และคณะ, 1969) และ absorption peak ที่ 330 นาโนเมตร นี้จะบ่งบอกถึงโครงสร้างที่มีไฮโดรเจนอะตอมอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 และ 8 ของโมเลกุลของ DHPP (Nagai, 1968)

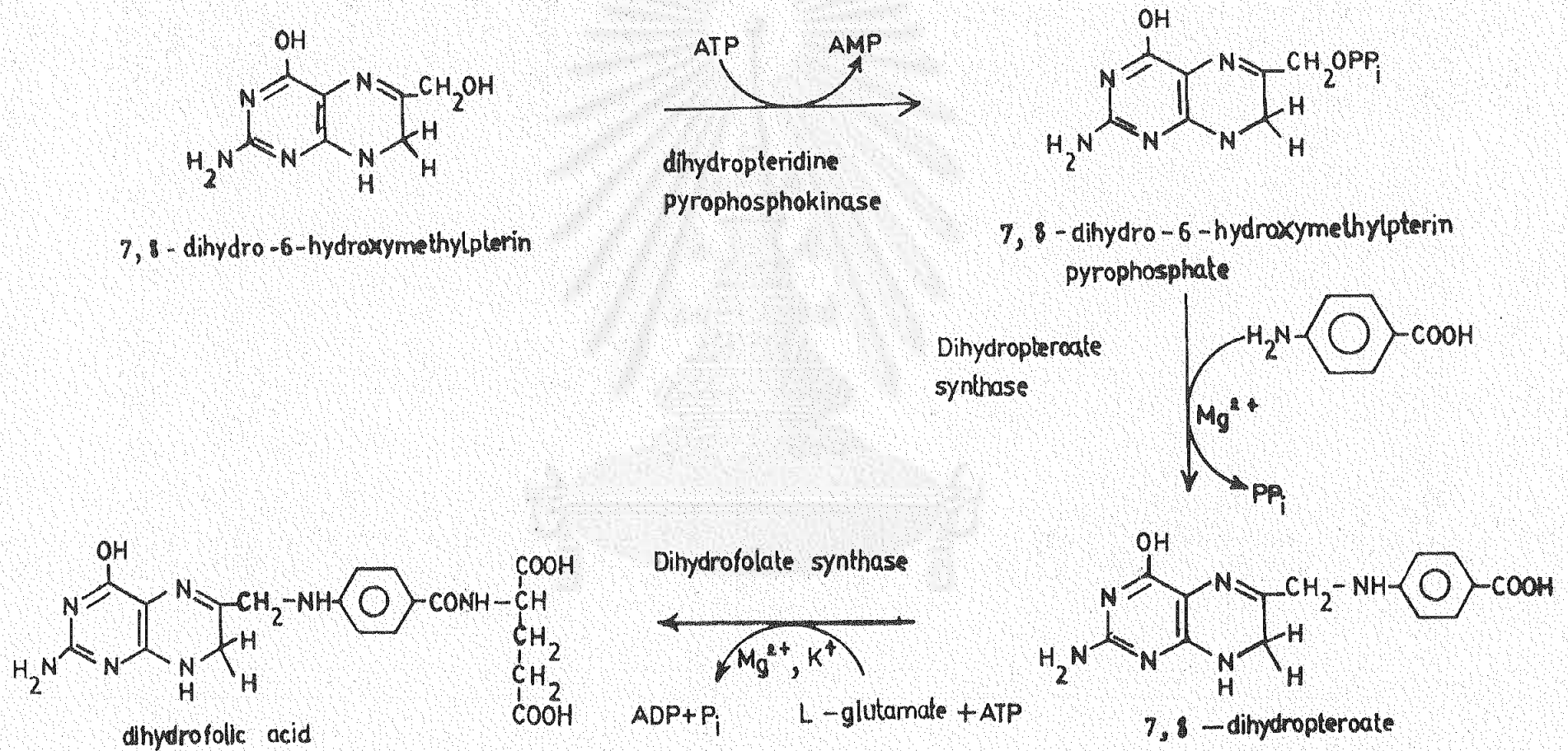
## 1.2 คุณสมบัติโดยทั่วไปของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซีนเทส

Jaenick และ Chan (1960) เสนอว่า สารประกอบไพโรฟอสเฟตของไดไฮโดรพเทอโรอินอาจจะเป็นตัวกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 7, 8 - ไดไฮโดรพเทอโรเอท Brown และคณะ (1961) ได้ทำการทดลองพบว่า 7, 8 - ไดไฮโดร-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอโรอินเป็นสารตั้งต้นโดยตรงของปฏิกิริยาการสร้างไดไฮโดรโฟเลท (dihydrofolate) โดยมีกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเป็นสับสเตรทด้วย ต่อมาได้มีการทดลองใช้ 7, 8-ไดไฮโดร-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอโรอินเป็นสับสเตรทในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไดไฮโดรโฟเลท เมื่อมี ATP และไม่มี ATP พบว่าสารประกอบพเทอโรอินจะถูกใช้ในปฏิกิริยาเฉพาะเมื่อมี ATP ร่วมในปฏิกิริยาด้วยเท่านั้น แต่ถ้าใช้สารประกอบไพโรฟอสเฟตของ 7, 8-ไดไฮโดร-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอโรอินเป็นสับสเตรทก็ไม่จำเป็นต้องมี ATP ในปฏิกิริยา (Ortiz และ Hotchkiss, 1966; Weisman, 1964) Richey และ Brown (1969) สามารถแยกไดไฮโดรพเทอโรเอท ซีนเทส และพิสูจน์ว่าเอนไซม์ตัวนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิด 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอท ไดไฮโดรพเทอโรเอท ซีนเทส พบในจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น Escherichia coli (Garrett และ Wright, 1967) Lactobacillus plantarum, Butyribacterium rettgeri, Fusobacterium fusiforme, Veillonella (Strain V<sub>2</sub>), Staphylococcus epidermis (Brown, 1971), Diplococcus pneumoniae (Ortiz, 1970), Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae (Ho และคณะ, 1974b) Streptococcus faecalis (Brown และคณะ, 1961) Plasmodium berghei (Ferone, 1973) ทั้งยังพบในพืช โพรโตซัว (Thijssen, 1977) และ Yeast (Brown, 1971) คุณสมบัติของเอนไซม์จากแบคทีเรียต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 1

7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอทเป็นตัวกลาง (intermediate) ตัวหนึ่งในปฏิกิริยาการสร้างเตตระ-ไฮโดรโฟเลท (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน, พิวรีน และกรดอะมิโน ซึ่งปฏิกิริยาการสร้าง 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอทจะพบในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ แต่ไม่พบในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจึงเป็นจุดที่น่าสนใจในแง่ของการหาตัวยับยั้งเอนไซม์ในปฏิกิริยานี้ ในปี 1940 (Woods, 1940) พบว่าซัลโฟนาไมด์ (sulfonamides) สามารถขัดขวางการทำงานของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกได้ ต่อมาจึงได้มีผู้ค้นคว้าหาอนุพันธ์ของซัลโฟนาไมด์เพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ตารางที่ 1 แสดงคุณลักษณะ (characteristics) ของเอนไซม์ไดไฮโดรเพอโรเอทซินเทส จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ กัน

| Source   | Molecular weight  | Optimum pH   | $K_m$ for pABA mol/l         | $K_m$ for DHPP mol/l  |
|--|-------------------|--------------|------------------------------|-----------------------|
| <u>E. coli</u><br>(Richey และ Brown, 1969)                           | 52,000            | 8.5          | $2.5 \times 10^{-6}$         | -                     |
| <u>Veillonella</u><br>strain V <sub>2</sub><br>(Shiota และคณะ, 1964) | -                 | 8.5          | $(1.58-3.75) \times 10^{-4}$ | $3.12 \times 10^{-4}$ |
| <u>S. indica</u><br>(Iwai และ Kabashi, 1975)                         | 43,000            | 9.3          | $7.1 \times 10^{-6}$         | $2.86 \times 10^{-5}$ |
| <u>P. berghei</u><br>(McCollough และคณะ, 1974b)                      | -                 | 8.5          | $2.8 \times 10^{-6}$         | $1.21 \times 10^{-6}$ |
| <u>N. gonorrhoeae</u><br>strain 7134<br>(Ho และคณะ, 1974 b)          | -                 | -            | $1.6 \times 10^{-3}$         | -                     |
| <u>N. meningitidis</u><br>strain M-166<br>(Ho และคณะ, 1974b)         | -                 | -            | $1.4 \times 10^{-3}$         | -                     |
| <u>D. pneumoniae</u><br>strain R6<br>(Ortiz, 1970)                   | 75,000-<br>95,000 | 8.0 -<br>8.2 | $3.3 \times 10^{-6}$         | -                     |



รูปที่ 2 แสดงขบวนการสร้างกรดไดไฮโดรโฟลิกใน *Serratia indica* (Iwai, 1975) และ Kabashi, 1975)

Ferone และ Webb (1975) พบว่าปฏิกิริยาการยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส ใน E. coli เป็นกลไกแบบมีระเบียบ (ordered mechanism) โดย DHPP จะเป็นลิบล่เตแรกที่เข้าจับกับเอนไซม์ และ 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอทจะเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ถูกปล่อยออกมา และพบว่าทั้ง DHPP และ 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอท จะช่วยป้องกันเอนไซม์ไม่ให้เสียแอกติวิตีเนื่องจากความร้อนได้บางส่วน Suckling และคณะ (1977) ใช้แอฟฟิวดิโกราฟี แสดงให้เห็นว่า DHPP จะเข้าจับเอนไซม์ก่อนกรตพารา-อะมิโนเบนโซอิกหรือฮัลโฟนาไมด์

### 1.3 วิธีการวัดแอกติวิตีของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส

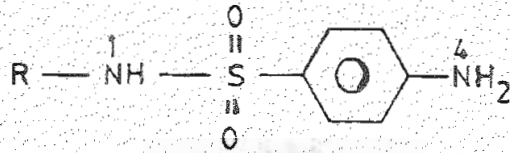
การวัดแอกติวิตีของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส ทำได้ 2 วิธี

1. โดยการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Microbiological assay) (Iwai และ Okinaka, 1980) โดยใช้ Streptococcus faecalis R เนื่องจากปฏิกิริยาของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส ในขบวนการสร้างเตตระไฮโดรโฟเลทจะให้กรดโฟลิก ซึ่งใช้ในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่วิธีนี้ใช้เวลาานเพราะจะต้องใช้เวลาในการที่แบคทีเรียจะเจริญอย่างน้อย 18 ชั่วโมง และบางครั้งค่าที่ได้จากการทดลองไม่แน่นอน เพราะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียไวมากต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการทดลองเช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความชื้น เป็นต้น

2. โดยการใช้สารไอโซโทป (radioisotope) เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็วและให้ค่าที่ถูกต้องกว่าวิธีแรก (Iwai และ Okinaka, 1980) โดยใช้คาร์บอน-14-กรตพารา-อะมิโนเบนโซอิก ( $^{14}\text{C}$ -p-aminobenzoic acid) เป็นลิบล่เตรท ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา คือ 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอทจะถูกติดฉลากด้วยคาร์บอน - 14 ( $^{14}\text{C}$ -7, 8-dihydropteroate) และผลิตภัณฑ์นี้สามารถแยกออกจากคาร์บอน - 14 - กรตพารา-อะมิโนเบนโซอิกที่เหลือ จากปฏิกิริยาได้ โดยใช้วิธี paper chromatography คือใช้โบตล์เซียงพอลิเฟต หนึ่งเฟอ์ 0.1 โมล/ลิตร pH 7.0 เป็นตัวพา (developing solvent) พบว่า 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอทที่ถูกติดฉลากด้วยคาร์บอน - 14 จะอยู่ที่จุดเริ่มต้น ในขณะที่คาร์บอน - 14 - กรตพารา - อะมิโนเบนโซอิกจะเคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้นด้วยค่า  $R_f = 0.76$  (Richey และ Brown, 1969; Okinaka และ Iwai, 1969)

#### 1.4 ผลของซัลโฟนาไมด์ต่อไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส

โครงสร้างทางเคมี โดยทั่วไปของซัลโฟนาไมด์



Woods (1940) แสดงให้เห็นว่า กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกที่สังเคราะห์ขึ้น สามารถลดการยับยั้งของ sulfanilamide ในแบคทีเรียหลายชนิด จึงตั้งสมมติฐานว่า sulfanilamide สามารถขัดขวางการใช้กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก ซึ่งเป็นตัวตั้งต้น (precursor) ในปฏิกิริยาการสร้างกรดโฟลิกได้ เนื่องจากมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน และจากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาของซัลโฟนาไมด์ในแบคทีเรีย โปรโตซัว และพืช สรุปได้ว่า ซัลโฟนาไมด์จะแสดงความสามารถในการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) โดยการแย่งกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกในการจับกับไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส

Bell และ Roblin (1942), Roblin และ Bell (1943) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง bacteriostatic activity ของซัลโฟนาไมด์กับค่า pKa เป็นแบบพาราโบลา (parabola) bacteriostatic activity จะเพิ่มขึ้นด้วยลักษณะความเป็นลบ (negative character) มากขึ้นของซัลโฟนิลกรุป -SO<sub>2</sub>- (sulfonyl group) ของอนุพันธ์ของ sulfanilamide ที่ถูกแทนที่ในโตรเจนตำแหน่งที่ 1 (1<sup>N</sup>-substituted sulfanilamide derivative) โมเลกุลของซัลโฟนาไมด์ทั้งในสภาวะที่มีประจุ (ionized form) และไม่มีประจุ (unionized form) สามารถเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ได้ ส่วน Bruckner (1943) และ Cowles (1942) ได้ตั้งสมมติฐานว่า โมเลกุลของซัลโฟนาไมด์ในสภาวะที่มีประจุเท่านั้นจะเป็นตัวทำให้เกิด bacteriostatic activity และซัลโฟนาไมด์ในสภาวะที่ไม่มีประจุเท่านั้นที่สามารถผ่านเข้าเซลล์ของแบคทีเรียได้ แต่ทฤษฎีของ Bell และ Roblin ได้รับการสนับสนุนจาก Thijssen (1974) ซึ่งรายงานว่า non-acidic N<sub>1</sub>, N<sub>1</sub>-dialkyl-sulfonamides สามารถยับยั้งการสร้าง 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอทใน cell-free extract ได้ดีกว่าใน ionizable

monosubstituted parent compound ส่วน Benedetti และ Rastelli (1981) พบว่าดัชนีการยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition index) ของ E.coli K<sub>12</sub>T<sub>53</sub> มีค่าสูงกว่าดัชนีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition index) ของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส  $10^{-2}$  -  $10^{-3}$  เท่า ซึ่งแสดงว่าผนังเซลล์ (cell membrane) มีส่วนในการสกัดการผ่านเข้ามาในเซลล์ของซัลโฟนาไมด์ โดยไม่ขึ้นกับสภาพของโมเลกุลของซัลโฟนาไมด์ว่าจะมีประจุหรือไม่

Bock และคณะ (1974) แสดงให้เห็นว่า กลไกการยับยั้งของซัลโฟนาไมด์ ซับซ้อนมากกว่าที่คิดกันแต่แรก คือซัลโฟนาไมด์ไม่เพียงแต่จะแข่งขันกับการตพาราก-อะมิโน-เบนโซอิกเพื่อจับกับ binding site บนเอนไซม์เท่านั้น แต่ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ DHPP เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ได้อีกด้วย จากการทดลองใช้ [<sup>35</sup>S] sulfamethoxazole ทั้งใน cell free system และ whole cell system แล้วแยกผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นพบว่า สารประกอบนี้จะให้ค่า R<sub>F</sub> เท่ากับสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นคือ N<sup>1</sup> - 3 - (5-methylisoxazolyl) - N<sup>4</sup> - (7, 8-dihydro-6-pteridinylmethyl) sulfanilamide

### 1.5 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ดังที่กล่าวมาแล้วในหน้าว่าปฏิกิริยาการสังเคราะห์ 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอท ที่มีไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส เป็นตัวเร่งจะพบในแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ และไม่พบขบวนการนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเช่น คน ดังนั้นการหาตัวยับยั้งไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส ในขบวนการนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในแง่ของการผลิตยารักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียเหล่านี้ โดยยาเหล่านี้จะไม่มีผลต่อเซลล์เจ้าเรือน (host cell) ของคนเลย และเนื่องจากแบคทีเรียมีความสามารถที่จะปรับสภาวะของเซลล์ให้ทนต่อยาพวกซัลโฟนาไมด์ได้เร็วจึงต้องมีการคิดค้นหาอนุพันธ์ของซัลโฟนาไมด์ใหม่ ๆ ขึ้นอยู่เสมอ และนำอนุพันธ์เหล่านี้มาทำการทดลองกับแบคทีเรียใน in vitro ก่อนที่จะนำไปพัฒนาต่อถึงระดับ in vivo ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ

1. เพื่อศึกษาความสามารถของสารพวกซัลโฟนาไมด์บางชนิดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ Escherichia coli

2. เพื่อศึกษาความล่าช้าของสารพวกอัลโฟมาไมต์บางชนิดในการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอท อินเทล์
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของไดไฮโดรพเทอโรเอท อินเทล์ ที่สกัดได้โดยวิธีแอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี (Affinity chromatography)

สถาบันวิทยบริการ  
พุทธทาสภวนธรรมวิทยาเขต



วัสดุภัณฑ์ เครื่องมือ และ เคมีภัณฑ์

2.1 วัสดุภัณฑ์

Argon gas บริษัท แอลทอนก๊าซโปรดักท์จำกัด

Nitrogen gas บริษัท ไทยอินดัสเตรียลก๊าซ

Whatman Chromatographic paper 3 MM บริษัท Sigma, St. Louis, U.S.A.

Whatman filter paper No. 1 บริษัท W & R Ralston Limited, England.

Millipore filter, 0.22  $\mu$ , 2.5 mm, บริษัท Millipore corporation, Bedford, Massachusetts, U.S.A.

Heparinized micro-hematocrit capillary tubes บริษัท Fisher Scientific Co., Pittsburgh, U.S.A.

Scintillation vial บริษัท Packard Instruments Co., U.S.A.

2.2 เครื่องมือ

Spectrophotometer, model Spectronic 20 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

Spectrophotometer, model 25 บริษัท Beckman Instruments Inc., Fullerton, California, U.S.A.

Autocal pH meter, model PHM 83 Laboratory บริษัท Radiometer, Capennagen, Denmark.

Beckman Refrigerated Centrifuge, model J.21 C บริษัท Beckman Instruments Inc., Fullerton, California, U.S.A.

Autoclave, model HA-3D ប៊្រិម័រ Hirayama Manufacturing Co.,  
Tokyo, Japan.

Sonicator, model W 375 ប៊្រិម័រ Heat systems-Ultrasonic Inc.,  
New York, U.S.A.

Fraction Collector ប៊្រិម័រ LBK Productor AB Bromma, Sweden.

HSI disc electrophoresis chamber, model DE 102 ប៊្រិម័រ  
Haefer Scientific Instruments, San Francisco, U.S.A.

Shandon power supply, model Vokam 2541 ប៊្រិម័រ Shandon  
Scientific Co., Ltd., England.

Fermentation Equipment, model MD 500-10L ប៊្រិម័រ Marubishi  
Laboratory Equipment Co., Ltd., Japan.

GE hot air oven ប៊្រិម័រ Grundy Equipment Ltd., Cowley Peachey,  
Middx, England.

Sartorius analytical balance, model 2355 ប៊្រិម័រ Sartorius  
Werke, Gottingen, Germany.

Pipetmen ប៊្រិម័រ Gilson Medical Electronics, France.

Forma bio-freezer ប៊្រិម័រ Forma Scientific, Marietta, Ohio,  
U.S.A.

Liquid Scintillation Counter ប៊្រិម័រ Packard Instruments Co.,  
U.S.A.

Diaflo Ultrafiltration ប៊្រិម័រ Amicon PM-30 membrane  
Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts, U.S.A.

Shaking Water Bath ប៊្រិម័រ Forma Scientific Company,  
Marietta, Ohio, U.S.A.

Water Bath, model SKM 250 ប៊្រិម័រ Gallenkamp & Co., Ltd.,  
London, England.

### 2.3 เคมีภัณฑ์

p-Aminobenzoic acid (AR), Ammonium persulfate (AR),  
Glucose, Naphthalene (scintillation grade) บริษัท E. Merck,  
Damstadt, Federal Republic of Germany.

Ammonium sulfate, Hydrochloric acid (AR), Sodium hydroxide  
(AR), Sulfuric acid (AR) บริษัท J.T. Baker Chemical B.V., Deventor,  
Holland.

Activated charcoal, Bromine, Cupric sulfate, Coomassi  
brilliant blue (for electrophoresis), Diethyl ether (AR),  
ethylene glycol (extra pure) Glycine (Chromatographically  
homogeneous). Magnesium sulfate, 2-Mercaptoethanol, N-(1-naphthyl)  
ethylenediamine dihydrochloride (90%), Riboflavin, Sodium D(+)  
tartrate, Sodium Molybdate, Sodium acetate, Sodium dithionite,  
N, N'-Methylenebisacrylamide (BIS for electrophoresis), N N N' N'-  
Tetra methyl-ethylenediamine (TEMED) บริษัท BDH Chemical Ltd.,  
Poole, England.

Boric acid, Magnesium chloride, Potassium di-hydrogen-  
phosphate, di-Potassium hydrogenphosphate, Potassium chloride,  
Sodium citrate, Sodium nitrite, Sodium hydrogencarbonate บริษัท  
May & Baker Ltd., Bagenham, England.

Ammonium hydroxide, Methanol, Sodium chloride บริษัท  
Mallinckrodt Inc., Kentucky, U.S.A.

Acrylamide, Bovine Serum Albumine fraction V (BSA),  
1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metho-p-toluene-  
sulfonate, Dihydroxyacetone, Hydrazine hydrate, Diphenyloxazole  
(PPO-scintillationgrade), Sucrose, 2,4,6-Trinitrobenzenesul-  
fonate, 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidine sulfate บริษัท  
Sigma chemical company, St. Louis, Misschuri, U.S.A.

1-2 Bis-(3-aminopropylamino) ethane, Dimethylformamide, Ethoxy-ethanol, Pyrophosphoric acid, Sodium carbonate, Trishydroxymethyl aminomethane, Sulphanilamide, grade puriss ใช้ Fluka AG, Buchs, Switzweland.

Agar, Vitamine free casamino acid, Tryptone ใช้ Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

p-Aminobenzoic - 7 -  $^{14}\text{C}$ -acid (0.1 mC/2.4 mg) ใช้ New England Nuclear, Boston, Massachusetts, U.S.A. (purity 95%)

Glacial Acetic acid (AR) ใช้ Carlo Erba, Division chemical, Milano, Italy.

Cyanogenbromide Activated Sepharose - 4 - B ใช้ Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.

Toluene ใช้ Ajax chemical, Sydney, Australia

Yeast Extract ใช้ BBL, Cockeyville, Maryland, U.S.A.

Sodium tungstate, Trichloroacetic acid, Urea ใช้ Riedel-De Haën AG.

Phenol reagent เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

ซิลโฟนาไมด์ 4 ชนิดที่ใช้ในการทดลองคือ p-Aminobenzenesulfonamidopropyl bromide, m.p. 106 - 106.2 $^{\circ}$  C, Sodium p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate m.p. 190 $^{\circ}$  C, N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine, m.p. 169-171 $^{\circ}$  C ได้รับมาจาก Dr. Joel Kauffman และ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine, m.p. 188 - 190 $^{\circ}$  C ได้รับมาจาก ดร. วิชัย สุทธิมูล

#### 2.4 จุลชีพที่ใช้ในการทดลอง

Escherichia coli strain K<sub>12</sub> No. 3110

วิธีการทดลอง

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอก (LB broth) (Luria และคณะ 1960)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เรียกลูตรอุดม (rich medium) ประกอบด้วย

|                                  |    |      |
|----------------------------------|----|------|
| ทริปโตเนน (tryptone)             | 10 | กรัม |
| ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)   | 5  | กรัม |
| โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) | 10 | กรัม |

ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมล/ลิตร ละลายในน้ำกลั่น

จนครบ 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เรียกลูตรปรับต่ำกลูโคส (glucose minimal medium)

(Garrett และ Wright, 1967)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เรียกลูตรปรับต่ำกลูโคสใช้ในการทดลองทั่วไปประกอบด้วย

|  |     |      |
|--|-----|------|
| โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                       | 3   | กรัม |
| ไดโพตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต, $\text{K}_2\text{HPO}_4$                                       | 7   | กรัม |
| แอมโมเนียมซัลเฟต, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   | 1   | กรัม |
| โซเดียมซีเตรท, $\text{C}_3\text{H}_4(\text{OH})(\text{COONa})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 | กรัม |
| แมกนีเซียมซัลเฟต, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                                | 0.1 | กรัม |
| แคสอะมิโนแอซิด (vitamin free casamino acid)  | 10  | กรัม |
| กลูโคส (glucose)   | 2   | กรัม |

ปรับ pH เท่ากับ 6.9 ด้วยโพตัสเซียมไฮดรอกไซด์ 3 โมล/ลิตร ละลายในน้ำกลั่นจนครบ

1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

### 3.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 สารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณธาตุฟอสฟอรัส-อะมิโนเบนโซอิก (Toro และ Ackermann, 1975)

3.2.1.1 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 0.9 โมล/ลิตร

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติก 14.7051 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3.2.1.2 สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 0.044 โมล/ลิตร

ชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5021 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3.2.1.3 สารละลายโพแทสเซียมไนไตรท์ 0.014 โมล/ลิตร

ชั่งโพแทสเซียมไนไตรท์ 0.0966 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3.2.1.4 สารละลายมาตรฐานกรดฟอสฟอรัส-อะมิโนเบนโซอิก  $7.299 \times 10^{-3}$

โมล/ลิตร

ชั่งกรดฟอสฟอรัส-อะมิโนเบนโซอิก 100 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เติมสารละลายกรดเกลือ 1 โมล/ลิตร 2-3 หยด ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร pH ของสารละลายเท่ากับ 7.9

3.2.1.5 สารละลาย N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride  $3.87 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร

ชั่ง N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 20 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเท่ากับ 20 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลในตู้เย็น

3.2.2 ทรล-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมล/ลิตร pH 8.0

ชั่งทรล-ไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนเมเทน 6.075 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 8.0 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น ปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3.2.3 ทรล-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5

ชั่งทรล-ไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนเมเทน 24.228 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH

เท่ากับ 8.5 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3.2.4 สารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอว์ (Lowry และคณะ, 1951)

3.2.4.1 สารละลาย A

โซ่โซเดียมคาร์บอเนต 4 กรัม ละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมล/ลิตร ปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3.2.4.2 สารละลาย B

โซ่โซเดียม ดี (+) ทาร์เทรท 2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เติมหิวปริกซ์เฟต 1 กรัม ปรับปริมาตรของสารละลายเท่ากับ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3.2.4.3 สารละลาย C

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ในอัตราส่วน 50 : 1

3.2.4.4 สารละลาย D (สารละลายฟินอล)

โซ่โซเดียมทังสเตท 100 กรัม, โซเดียมโมลิบเดต 25 กรัม ละลายในน้ำ 700 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือเข้มข้น 100 มิลลิลิตร กรดซัลฟูริก 85% 50 มิลลิลิตร รีฟลักซ์ (reflux) ประมาณ 10 ชั่วโมง เติมลิเทียมซัลเฟต 150 กรัม น้ำ 50 มิลลิลิตร และน้ำโบรมีน 2 - 3 หยด ต้มต่อประมาณ 15 นาที เพื่อไล่น้ำโบรมีนที่มากเกินไป เจือจางด้วยน้ำจนปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บสารละลายในขวดสีน้ำตาล เก็บในตู้เย็น

3.2.4.5 สารละลายมาตรฐานโปรตีน (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

โซ่ Bovine serum albumin (BSA) 100 มิลลิกรัม ละลายด้วย กรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5 ปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

3.2.5 สารละลายที่ใช้ในการทดสอบสีของสารประกอบอะมีน (Amines) (Cuatrecasas, 1970)

3.2.5.1 สารละลายโซเดียมโบเรอิมส์ตัว

สารละลายกรดโบเรอิมส์ตัวที่บังคับมีสีของกรดโบเรอิมส์ นำมาปรับ pH เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 โมล/ลิตร กรองเอาแต่น้ำใสมาใช้ในการทดลอง

### 3.2.5.2 สารละลาย 2,4,6-ไตรไนโตรเบนซีนซัลโฟเนต 3%

ชั่ง 2,4,6-ไตรไนโตรเบนซีนซัลโฟเนต 3 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

### 3.2.6 สารละลายที่ใช้ในการเตรียมแอฟฟินิตีเจล (Affinity Gel)

#### 3.2.6.1 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล/ลิตร pH 9.5

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 5.2995 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 12.6015 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,500 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตลงในสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตจน pH เท่ากับ 9.5

#### 3.2.6.2 สารละลายผล้มของ 1,2 บิล (3-อะมิโนโพรพิลอะมิโน) อีเทน

0.174 โมล/ลิตร กับโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล/ลิตร pH 9.5

ผล้ม 1,2 บิล (3-อะมิโนโพรพิลอะมิโน) อีเทน 95% ความหนาแน่น 0.952 ปริมาตร 33.63 มิลลิลิตร กับโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล/ลิตร pH 9.5 จนปริมาตรครบ 105 มิลลิลิตร

#### 3.2.6.3 ไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ (Dimethylformamide) 50%

ผล้มไดเมทิลฟอร์มามาไมด์ 50 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

#### 3.2.6.4 บัฟเฟอร์ I

ชั่งไดไทโอไธเรออล (Dithiothreitol) 0.0028 กรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ 1.0166 กรัม (5 มิลลิโมล/ลิตร) โซเดียมคลอไรด์ 29.22 กรัม (0.5 โมล/ลิตร) ผล้มกับ DHPP 10.1 มิลลิลิตร (ประมาณ  $6.7 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร) เติมทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.8 โมล/ลิตร pH 8.5 จนปริมาตรครบ 1 ลิตร

#### 3.2.6.5 บัฟเฟอร์ II

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 29.22 กรัม (0.5 โมล/ลิตร) ละลายในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.8 โมล/ลิตร pH 8.5 ปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร

#### 3.2.6.6 สารละลายผล้มของยูเรีย 6 โมล/ลิตร กับโปตัสเซียมคลอไรด์ 2

โมล/ลิตร



ขิงยูเรีย 360.36 กรัม และโปตัสเซียมคลอไรด์ 149.12 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น  
ปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร

3.2.7 สารละลายที่ใช้กับโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแท่ง (Disc Polycrylamide Gel Electrophoresis) (Davis, 1964; Weber และ Osborn, 1969)

#### 3.2.7.1 สารละลาย A

ขิงทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน 36.3 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดเกลือ  
1 โมล/ลิตร 48 มิลลิลิตร เติม TEMED 0.23 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 8.9 ด้วยกรด  
เกลือ 1 โมล/ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีน้ำตาลที่  
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.2.7.2 สารละลาย B

ขิงทริสไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน 5.98 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดเกลือ  
1 โมล/ลิตร ปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.2.7.3 สารละลาย C

ขิงอะครีลาไมด์ 28.0 กรัม และ BIS 0.735 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตร  
ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีฟ้าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.2.7.4 สารละลาย D

ขิงอะครีลาไมด์ 10 กรัม และ BIS 2.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ  
100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.2.7.5 สารละลาย E

ขิงโรโบลาโรน 4 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บ  
ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.2.7.6 สารละลาย F

ขิงซูโครส 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ  
4 องศาเซลเซียส

### 3.2.7.7 สารละลายยูโทรล 80%

ชั่งยูโทรล 8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.2.7.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

ชั่งแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 0.14 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใต้ไม้เกิน 1 สัปดาห์

### 3.2.7.9 ทรึล-ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 8.3

ชั่งทรึลไฮดรอกซีเมทิลอะมิโนมีเทน 6 กรัม และไกลซีน 28.8 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.2.7.10 น้ำยาย้อมสีโปรตีน

ผสมเมทานอล 50% 454 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 46 มิลลิลิตร และโคโอมัลซี บริลเลียน บลู (Coomassie brilliant blue) 1.25 กรัม คนจนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีตะกอนกรองตะกอนออกก่อนนำไปใช้

### 3.2.7.11 น้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน (Destaining solution)

ผสมกรดอะซิติก 75 มิลลิลิตรกับเมทานอล 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร

### 3.2.8 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล/ลิตร pH 7.0

ชั่งไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 10.624 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเท่ากับ 305 มิลลิลิตร และชั่งโปรตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.3076 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเท่ากับ 195 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เทสารละลายไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงในสารละลายไดโปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จน pH เท่ากับ 7.0 เติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับ

### 3.2.9 Scintillation fluid (Foye และคณะ, 1982)

ชั่งเนฟรัลีน 150 กรัม PPO 8 กรัม Dimethyl POPOP 0.6 กรัม ผสมกับเอทิลีนไกลคอล 20 มิลลิลิตร เอทอกซีเอทานอล (ethoxyethanol) 100 มิลลิลิตร ปริมาตรด้วยโทลูอีน (toluene) จนปริมาตรครบ 1 ลิตร

### 3.3 การเก็บ E.coli ที่ใช้ในการทดลอง

E.coli ที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บรักษาไว้บนวุ้นแข็งที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แอลบีในขวดที่ปิดลูก แล้วเคลือบด้วยพาราฟิน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้ E.coli ในการทดลองจะใช้หลอดที่ปราศจากเชื้อ เชี่ยวออกมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แอลบี-บรอก

### 3.4 การเลี้ยง E.coli เพื่อเก็บเซลล์ไว้ใช้ในการศึกษา

เลี้ยง E.coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เฟอร์เมนเตอร์เก็บเซลล์ในระยะ log ตอนปลาย โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 2,740 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บเซลล์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 เดือน โดยเอนไซม์ไม่สูญเสียแอกติวิตี

### 3.5 การหาปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Toro และ Ackermann, 1975)

ผลหมากรังเลี้ยงเชื้อ 2 มิลลิลิตร กับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 0.9 มิลลิลิตร 8 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ 0.014 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 0.044 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เติมสารละลายที่ทำให้เกิดสี [N-(1-naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride] 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดการดูดแสงของสารละลายสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกมาตรฐานที่มีปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก 30 - 180 ไมโครกรัม

### 3.6 การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนวัดแปลงจากวิธีของลอร์ (Lowry และคณะ, 1951)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย C (ข้อ 3.2.4.3) 0.73 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมสารละลาย D (ข้อ 3.2.4.4) 0.07 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดการดูดแสงของสารละลายสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนของสารละลายตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับสีที่เกิดขึ้นจากสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 0 - 100 ไมโครกรัม

### 3.7 การทดสอบสีของสารประกอบพวกเอมีน (ดัดแปลงจาก Cuatrecasas, 1970)

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตรหรือเจลจำนวนเล็กน้อยผสมกับสารละลายโซเดียมโบเรอิมตัว 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเติมสารละลาย 2,4,6-ไตรโนโตรเบนซีนซัลโฟเนต 3% 2 - 3 หยด เขย่าและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ถ้าสารละลายตัวอย่างหรือเจลมีสารประกอบพวกเอมีนจะเปลี่ยนจากสีเหลือง เป็นสีส้มแดง

### 3.8 การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7,8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพโรฟอสเฟต [2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine pyrophosphate (DHPP)]

#### 3.8.1 การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีน (Forrest และ Walker, 1949)

ชั่งไดไฮดรอกซีอะซิโตน 17.5 กรัม (0.194 โมล) ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร เติมไฮดราซีนไฮเดรต (100%) 9.78 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที ชั่ง 2,4,5-ไตรอะมิโน-6-ไฮดรอกซีไพริมิดีน ซัลเฟต 25.5 กรัม (0.107 โมล) โซเดียมอะซิเตต 15.5 กรัม กรดโบริก 12 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เทสารละลายผสมทั้ง 2 อย่างลงในขวดกันกลม ต้มในน้ำเดือด ภายใต้บรรยากาศของก๊าซไนโตรเจนนาน 2 ชั่วโมง ผลผลิตที่ได้กรองและล้างด้วยน้ำเป็น 200 มิลลิลิตร เอทานอล 200 มิลลิลิตร ส่วนผลัมระหว่างเอทานอลกับไดเอทิลอีเทอร์ (1 : 1 โดยปริมาตร) 200 มิลลิลิตร และไดเอทิลอีเทอร์ 100 มิลลิลิตร ได้ผลผลิตออกเป็นสารสีเหลือง ชุบให้แห้งด้วยกระดาษกรองผลผลิตแห้งที่ได้หนัก 8.436 กรัม (43.56% Yield)

#### 3.8.2 การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีน ไพโรฟอสเฟต (Ho และคณะ, 1974 a)

ชั่งกรดไพโรฟอสฟอริก 200 กรัม ทำให้หลอมเหลวช้า ๆ ที่อุณหภูมิ 60 - 65 องศาเซลเซียส เติม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีน (เตรียมได้จากข้อ 3.8.1) 8 กรัม รักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ 60 - 65 องศาเซลเซียส คนของผสมตลอดเวลา นาน 2 ชั่วโมง เติมสารแขวนลอย ของแอดดีเวสเตรนคาร์โบล (50 กรัม/น้ำ 600 มิลลิลิตร) คนของผสมนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง กรองและล้างด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 3 โมล/ลิตร ที่เย็น 20 มิลลิลิตร กรองเก็บสารละลาย ทำซ้ำอีก 4 ครั้ง

สารละลายที่ได้แต่ละครั้งนำมาทดสอบความบริสุทธิ์ โดยวิธี paper chromatography โดยหยด (spot) บน whatman chromatographic paper 3MM ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวพา (developing solvent) ให้ซึมผ่านจุดตั้งต้นลงมา 30 เซนติเมตร ฝั่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เลือกเฉพาะแฟรคชันที่แสดงจุดบนกระดาษเพียงจุดเดียว นำมารวมกันทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer ผลิตภัณฑ์ที่ได้หนัก 2.91 กรัม (19.48% Yield) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.8.3 การเตรียม 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพรอโฟลเฟต (คัดแปลงจาก Friedkin และคณะ, 1962)

ชั่ง 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิลพเทอริดีน ไพรอโฟลเฟต 20 มิลลิกรัม (ข้อ 3.8.2) โซเดียมไดโทไอโอไนท์ 20 มิลลิกรัม ใส่น้ำ 1 มิลลิลิตร ของ 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 1 โมล/ลิตร เขย่าพร้อมกับผ่านกาชอาร์ทอน ปิดจุกด้วยพาราฟิล์ม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปปั่น 2,000 x g นาน 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.8.4 การหาค่าความเข้มข้นโดยประมาณของ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีน ไพรอโฟลเฟต (DHPP) (Shiota และคณะ, 1969)

การหาค่าความเข้มข้นโดยประมาณของ DHPP (ข้อ 3.8.3) โดยใช้ความสามารถในการดูดแสง (A) ที่ความยาวคลื่นแสง 330 นาโนเมตร (pH 7.10) โดยอาศัยการคำนวณจากสูตร

$$A = \epsilon bc$$

เมื่อ A = ความสามารถในการดูดแสง

$\epsilon$  = molar extinction coefficient ซึ่ง  $\epsilon_{330} = 6200$   
(โมล/ลิตร)<sup>-1</sup> (เซนติเมตร)<sup>-1</sup>

b = ระยะทางที่แสงผ่านสารละลายซึ่งเท่ากับ 1 เซนติเมตร

c = ความเข้มข้นของสารละลายที่นำมาวัดการดูดแสง (โมล/ลิตร)

### 3.9 การหาจำนวนเซลล์ของ E. coli

เลี้ยง E. coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ (Shaking water bath) จนอ่านค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ทำให้เสียจาง 1/10 ด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ นับเป็นการเสียจางครั้งที่ 1 จากการเสียจางครั้งที่ 1 นำมาเสียจางต่อด้วย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ จนถึงครั้งที่ 7 นำของเหลวที่ได้จากการเสียจางครั้งที่ 6 และ 7 กระจายบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบีแบบแข็ง บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

### 3.10 การหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารพวกอัลโฟนาไมด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ E. coli (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

คัดแปลงจากวิธีของ Cook (Cook, 1954)

เลี้ยง E. coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอกและในอาหารสูตรปรับต่างกลูโคส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิได้ จนอ่านค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 นำมาเสียจางจนมีปริมาณเซลล์เท่ากับ  $10^4$  เซลล์ / 0.1 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้น 5 เท่า ของที่ใช้เลี้ยงเซลล์ นำเซลล์ที่เสียจางแล้วมา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีอัลโฟนาไมด์ 0.8 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารพวกอัลโฟนาไมด์ที่ใช้มี sulfanilamide  $0-5.74 \times 10^{-2}$  โมล/ลิตร p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide  $0-3.33 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร N, N' - bis(sulfanilyl) - L - cystine  $0-9.00 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate  $0-2.60 \times 10^{-2}$  โมล/ลิตร 4-(4-aminobenzenesulfonamido) Benzenesulfonamidoglycine  $0-6.91 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านไมโครฟิลเตอร์ เมมเบรน เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมครอน เติมอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 5 เท่าของที่ใช้เลี้ยงเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร ให้ปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลอดเท่ากับ 1 มิลลิลิตร บ่มไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากการเจริญเติบโตของ E. coli ซึ่งความขุ่นควรจะลดลง เมื่อความเข้มข้นของอัลโฟนาไมด์เพิ่มขึ้น และหลอดทดลองหลอดแรกก็มองเห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อใส โดยเทียบความใส

กับหลอดทดลองที่ใส่อาหาร เลี้ยงเชื้อและซัลโฟนาไมด์ แต่ไม่ใช่ E.coli จะถือเอาความเข้มข้นของหลอดนั้นเป็นค่า MIC ของซัลโฟนาไมด์ที่ใช้ทดลอง

### 3.11 การเปรียบเทียบความสามารถของสารพวกซัลโฟนาไมด์ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ( $9.00 \times 10^{-4}$ โมล/ลิตร) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ E.coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคส

ใช้ซัลโฟนาไมด์ 5 ชนิด คือ sulfanilamide, p-aminobenzenesulfonamide-propyl bromide, sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate, 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamido glycine และ N-N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine เตรียมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดที่ทดลองเท่ากับ  $9.00 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร ใช้ E.coli 0.1 มิลลิลิตร ( $10^4$  เซลล์) ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมี 0.1 มิลลิลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคสความเข้มข้น 5 เท่า ของที่ใช้เลี้ยงเซลล์ และ 0.8 มิลลิลิตร ของซัลโฟนาไมด์ บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตร

### 3.12 การทำลายผนังเซลล์ของ E.coli โดยใช้โซนิคเคเตอร์ (Sonicator)

ชั่งเซลล์ของ E.coli 20 กรัม ใส่ในหลอดเขนตรีฟิวจ์ เดิมทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมล/ลิตร pH 8.0 ที่เย็น นำไปปั่นที่  $7,700 \times g$  อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อล้างอาหารเลี้ยงเชื้อ เดิมทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมล/ลิตร pH 8.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใส่ในเซลล์ที่ล้างแล้ว คนให้เซลล์กระจายสม่ำเสมอ นำหลอดเขนตรีฟิวจ์เข้าในอ่างน้ำแข็งที่มีส่วนผสมของน้ำแข็งกับเมทานอล จุ่มสแตนด์บายของโซนิคเคเตอร์ลงในสารละลายเซลล์ประมาณครึ่งนิ้ว เปิดเครื่องโดยใช้เวลานาน 5 นาที 2 ช่วงเวลา นำไปปั่นด้วยความเร็ว  $39,100 \times g$  นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.13 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20 - 60%

สารละลายใส่ที่ได้จากการทำลายผนังเซลล์ของ E.coli (ข้อ 3.12) เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0 - 20% ที่อุณหภูมิ 0 - 2 องศาเซลเซียส นำไปปั่นแยกตะกอนที่  $39,100 \times g$  อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนต่อ

ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจนอิ่มตัว 20 - 60% ที่อุณหภูมิ 0 - 2 องศาเซลเซียส บั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 39,100 x g อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ตะกอนโปรตีนที่ได้นำมาละลายด้วยทรล-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5 เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับละลายโปรตีนที่ได้จะใช้เป็น crude enzyme สำหรับหาค่า  $I_{50}$  และสำหรับแยกแอนไฮม์ด้วยวิธีแอฟฟิวดิโครมาโตกราฟี

### 3.14 การวัดแอกติวิตีของไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส (Ho และคณะ, 1974 a)

สำหรับละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทรล-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.48 โมล/ลิตร pH 8.5 แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก  $5.18 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร DHPP  $3.32 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 0.02 โมล/ลิตร และสำหรับละลาย เอนไซม์ในปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตร อินคิวเบตสำหรับละลายในปฏิกิริยาก่อนเติมสำหรับละลายเอนไซม์ 10 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเติมสำหรับละลายเอนไซม์ 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 20 ไมโครลิตร นำ 100 ไมโครลิตรของแต่ละส่วนผสมมาหยด (spot) บนกระดาษกรอง whatman 3MM แยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาโดยใช้ 0.1 โมล/ลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ภายในอ่างโครมาโตกราฟีที่อุณหภูมิห้องให้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซึมผ่านจุดตั้งต้นที่จุดผลิตภัณฑ์ไว้ลงมา 15 เซนติเมตร นำขึ้นมาทิ้งไว้ให้แห้ง ตัดบริเวณรอบจุดตั้งต้นขนาด 2 ตารางเซนติเมตร ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในขวด scintillation ที่มี scintillation fluid 5 มิลลิลิตร นำไปวัดด้วย Liquid Scintillation Counter

ปริมาณของ 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอทที่เกิดขึ้น (นาโนโมล) คำนวณได้จากค่าแอกติวิตีจำเพาะของคาร์บอน-14-กรดพาราอะมิโนเบนโซอิกซึ่งเท่ากับ 12,870 dpm/นาโนโมล และกำหนดให้ 1 หน่วย (unit) ของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิด 7, 8-ไดไฮโดรพเทอโรเอท 1.0 นาโนโมล/นาที ภายใต้สภาวะที่ไว้ทดลอง และ 1 หน่วยของแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1 หน่วยของเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน



### 3.15 การศึกษาค่า $I_{50}$ (concentration required for 50% inhibition) ของซิลโฟนาไมด์

สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme ข้อ 3.13) ก่อนนำมาใช้ศึกษาค่า  $I_{50}$  นำมาไดอะไลซ์ (dialyze) ด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.2 โมล/ลิตร pH 8.5 ปริมาตร 200 เท่า ของปริมาตร crude enzyme เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ในเวลา 12 ชั่วโมง

สารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.15 โมล/ลิตร pH 8.5 แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพาราอะมิโนเบนซออิก  $1.15 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 1.47 มิลลิกรัม ความเข้มข้นของซิลโฟนาไมด์ที่ใช้มีดังนี้ sulfanilamide  $5.81 \times 10^{-4}$  -  $34.86 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide  $2.25 \times 10^{-4}$  -  $15.95 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine  $5.84 \times 10^{-4}$  -  $46.72 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate  $9.20 \times 10^{-4}$  -  $55.19 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine  $5.20 \times 10^{-6}$  -  $51.95 \times 10^{-6}$  โมล/ลิตร ปริมาตรทั้งหมด 250 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร วัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.14

ค่า  $I_{50}$  หาได้จากการพลอตระหว่างอัตราส่วน  $v_0/v_i$  ของอัตราความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อไม่มีซิลโฟนาไมด์ ( $v_0$ ) และเมื่อมีซิลโฟนาไมด์ ( $v_i$ ) กับความเข้มข้นของซิลโฟนาไมด์ จุดที่อัตราส่วนของ  $v_0/v_i$  เท่ากับ 2 ความเข้มข้นของซิลโฟนาไมด์ที่จุดนั้นจะเป็นค่า  $I_{50}$  (Baker, 1967) ซึ่งค่า  $v_0/v_i$  จะมาจากสมการ

$$\frac{1}{v_i} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{K_m}{v_0} \cdot \left(\frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_0}\right) \quad (1)$$

สมการที่ (1) จัดลดด้วย  $v_0$

$$\frac{v_0}{v_i} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{K_m}{[S]} + 1 \quad (2)$$

$$\text{เมื่อ } \frac{v_o}{v_i} = 2$$

$$\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{K_m}{[S]} + 1 = 2 \quad (3)$$

จากสมการที่ (3) สามารถจะเปลี่ยนรูปสมการลงมาได้ว่า

$$K_i = \frac{K_m}{[S] - K_m} \cdot [I] \quad (4)$$

ถ้าความเข้มข้นของซับสเตรท  $[S]$  ในการทดลองมากกว่าค่า  $K_m$  อย่างน้อย 4 เท่า ค่า  $K_m$  จะสามารถตัดทิ้งได้เมื่อเทียบกับ  $[S]$  ดังนั้นสมการที่ (4) จะเขียนใหม่ได้ว่า

$$K_i = \frac{K_m}{[S]} \cdot [I] \quad (5)$$

หรือ

$$\frac{K_i}{K_m} = \frac{[I]}{[S]} = \left[\frac{I}{S}\right] 0.5 \quad (6)$$

เมื่อ  $\left[\frac{I}{S}\right] 0.5 =$  อัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวยับยั้งต่อความเข้มข้นของซับสเตรทที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50%

### 3.16 การทำฮอนไฮม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

(Affinity Chromatography)

#### 3.16.1 การเตรียมแอฟฟินิตี เจล (Affinity Gel)

ตัดแปลงจาก Cautrecasas (1970) Steers และคณะ (1971) และ Suckling และคณะ (1977)

ซังไซยาโนเจนโบรมไรด์ แอคทีวาตเตด เซฟารอส 4 บี (Cyanogenbromide Activated Sepharose 4B) 30 กรัม ทำใหพอง (swell) เติมน้ำที่ด้อยกรดเกลือ  $10^{-3}$  โมล/ลิตร 5 ลิตร กรอง เจลและทำให้แห้งด้วย water aspirator ทั้งที่เจลแห้งเติม 1,2 0 ล (3-อะมิโนโพรพิลอะมิโน) อีเทน ที่ผลมออยู่กับไฮเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล/ลิตร pH 9.5 เขย่ากลับไปกลับมา (mixed end over end) ให้ทั่วที่อุณหภูมิห้อง

นาน 2 ชั่วโมง ล้าง 1,2 บิล (3-อะมิโนโพรพิลอะมิโน) ฮีเทนออกด้วยโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล/ลิตร pH 9.5 และน้ำกลั่นจนไม่มี 1,2 บิล (3-อะมิโนโพรพิลอะมิโน) ฮีเทน หลุดออกมากับน้ำที่ล้าง ซึ่งสามารถทดสอบโดยวิธีทดสอบสารประกอบพวกเอมีน (ข้อ 3.7) ล้างเจลด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 50% 300 มิลลิลิตร นำเจลที่ได้มาใส่ในสารละลายผลึกรวมที่มีไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 50% 188,45 มิลลิลิตร 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine 0.525 กรัม และ 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metho-p-toluenesulfonate 6.6818 กรัม คนช้า ๆ ที่อุณหภูมิห้อง 22 ชั่วโมง ล้างเจลด้วยไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 50% 1 ลิตร เมทานอล 500 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำเจลที่ล้างแล้วส่วนหนักน้อยใส่ในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 50% 1 มิลลิลิตร เขย่า 3 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,700 x g นาน 15 นาที แยกสารละลายใส่และเจลออกจากกัน ทดสอบสีของสารประกอบพวกเอมีน (ข้อ 3.7) บนเจล เจลที่เหลือแช่ในบัฟเฟอร์ I เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ปริมาณของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine ที่จับอยู่กับเจลด้วยพันธะโควาเลนต์ สามารถได้ได้ในหน่วยของไมโครโมลของ ซัลเฟอร์/มิลลิลิตรของ settled gel ซึ่งกรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเป็นผู้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณซัลเฟอร์ให้โดยวิธี Bomb fusion method (Strouts และคณะ, 1962) ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ ชั่งสารตัวอย่างที่แห้ง 5 มิลลิกรัม นำมาทำปฏิกิริยากับโซเดียมเปอร์ออกไซด์ 1 กรัม ใน open bomb แล้วเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เป็นแล้วนำมาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยกรดเกลือเข้มข้น แล้วจึงเติม 0.5 มิลลิลิตร ของ 0.5 โมล/ลิตร แบเรียมคลอไรด์ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วจึงกรองเอาตะกอนที่ได้มาทำให้แห้งที่ 140 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นแบเรียมซัลเฟต ซึ่งปริมาณของซัลเฟอร์สามารถคำนวณหาได้จากสูตรดังนี้คือ

$$\% \text{ ซัลเฟอร์} = \frac{A \times 0.1374 \times 100}{W}$$

A = น้ำหนักของแบเรียมซัลเฟต (มิลลิกรัม)

W = น้ำหนักของสารตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

0.1374 = แฟคเตอร์ที่ใส่สำหรับการเปลี่ยนค่าของแบเรียมซัลเฟตไปเป็นค่าของซัลเฟอร์

### 3.16.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial Purification)

ด้วยแอฟฟิไนต์โครมาโตกราฟี

คัดแปลงจาก Suckling และคณะ (1977)

นำเจลที่เตรียมได้จากข้อ 3.16.1 มาบรรจุในหลอดแก้วตรงขนาด 2.7 x 30 เซนติเมตร สูง 19 เซนติเมตร ล้างเจลด้วยบัฟเฟอร์ I ประมาณ 16 ชั่วโมง อัตราการไหลของบัฟเฟอร์เท่ากับ 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เดิมสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ได้อะไลซ์แล้ว 5 มิลลิลิตรลงบนเจลที่เตรียมไว้ล้างเจลด้วยบัฟเฟอร์ I เก็บสารละลายที่ผ่านเจลลงมาด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน (fraction collector) อัตราการไหลเท่ากับ 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บแฟรคชันละ 5 มิลลิลิตร ล้างเจลจนโปรตีนที่ไม่ต้องการออกมาหมด ทดสอบด้วยการวัดการดูดแสงเหนือม่วงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร อ่านค่าเท่ากับ ศูนย์จึงเปลี่ยนจากบัฟเฟอร์ I เป็นบัฟเฟอร์ II เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาต่อ นำมาวัดการดูดแสงเหนือม่วงที่ความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร อ่านค่าเท่ากับศูนย์หยุด เก็บสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำ 100 ไมโครลิตรของแต่ละแฟรคชันมาหาเอนไซม์แอกติวิตีตามวิธีข้อ 3.14 และวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีข้อ 3.6 แฟรคชันที่มีไดไฮโดรเพเทอโรเอท ซินเทส แอกติวิตีสูง นำมารวมกันและทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Diaflo Ultrafiltration PM 30 นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้อะไลซ์ด้วย 0.8 โมล/ลิตร ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 ปริมาตร 100 เท่า เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ในเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0 - 2 องศาเซลเซียส สารละลายเอนไซม์ที่ได้อะไลซ์แล้ว เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เจลที่นำมาใช้ข้างล่างโปรตีนที่อาจมีเหลืออยู่ด้วยสารละลายผลงของยูเรีย 6 โมล/ลิตร กับโปตัสเซียมคลอไรด์ 2 โมล/ลิตร ล้างซ้ำด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร และบัฟเฟอร์ I 200 มิลลิลิตร

### 3.17 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของไดไฮโดรเพเทอโรเอท ซินเทส

#### 3.17.1 การศึกษาเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา

สารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.48 โมล/ลิตร pH 8.5 แมกนีเซียมคลอไรด์  $5.00 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $5.18 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์-

เคฟโตเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร สำหรับละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 ไมโครกรัม ให้ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาเท่ากับ 250 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0 - 45 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.14

### 3.17.2 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม

สำหรับละลายในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3.17.1 แต่ใช้สำหรับละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0 - 10.80 ไมโครกรัม ให้ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาเท่ากับ 250 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์เคฟโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร วัดแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.14

### 3.17.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

สำหรับละลายในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3.17.1 และใช้สำหรับละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 ไมโครกรัม ให้ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาเท่ากับ 250 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 23 - 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์เคฟโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร วัดแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.14

### 3.17.4 การศึกษา pH ที่เหมาะสม

สำหรับละลายในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3.17.1 ใช้ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ที่มีค่า pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 7.88 - 8.70 ใช้สำหรับละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 ไมโครกรัม ให้ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาเท่ากับ 250 ไมโครลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์เคฟโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร วัดแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.14

### 3.17.5 การศึกษาเพื่อหาค่า $K_m$ (Michaelis - Constant) ของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก

สำหรับละลายในปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 3.17.1 เว้นแต่ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ใช้ pH 8.58 และ คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก ใช้ความเข้มข้น ตั้งแต่  $1.15 \times 10^{-5}$  -  $11.5 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร ใช้สำหรับละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 ไมโครกรัม ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาเท่ากับ 250 ไมโคร-

ลิตร อินคิวเบตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0 - 40 นาที แต่ละค่าความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก วัดแอกติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในข้อ 3.14 หาอัตราความเร็วเริ่มต้นของแต่ละความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก ที่ใช้ โดยการพลอตความเข้มข้นของ DHP ที่เกิดขึ้น (ไมโครโมล/ลิตร) กับเวลา หาค่าความชัน (slope) ซึ่งเป็นอัตราความเร็วเริ่มต้น (ไมโครโมล/ลิตร/นาที) นำมาหาค่า  $K_m$  โดยอาศัยวิธี Lineweaver-Burk plot ซึ่งทำได้โดยการพลอตระหว่างส่วนกลับของอัตราความเร็ว เริ่มต้นกับส่วนกลับของความเข้มข้นของ คาร์บอน-14-กรด-พาราอะมิโนเบนโซอิก

DHPP ที่ใช้ในการทดลองหาค่า  $K_m$  ของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกนี้ จะมีความเข้มข้นมากเกินพอ โดยการทดลองใช้ DHPP หลาย ๆ ความเข้มข้น เมื่อให้ความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกคงที่ เลือกค่าความเข้มข้นของ DHPP ในช่วงที่ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์คงที่ มาใช้ในการหาค่า  $K_m$  ของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก

### 3.17.6 การศึกษาหาค่า $K_i$ (inhibitor constant) ของซิลโฟนาไมด์ต่อเอนไซม์

สารละลายในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.48 โมล/ลิตร pH 8.58 แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร ความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก ซิลโฟนาไมด์และสารละลายเอนไซม์จะเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของซิลโฟนาไมด์ โดยมีปริมาตรสุดท้ายของสารละลายในปฏิกิริยาเท่ากับ 250 ไมโครลิตร อินคิวเบตสารละลายในปฏิกิริยาก่อนใส่สารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงเติมสารละลายเอนไซม์ อินคิวเบตต่ออีก 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 80 ไมโครลิตร นำสารละลายในปฏิกิริยามาหาแอกติวิตีตามวิธีในข้อ 3.14

และค่า  $K_i$  หาได้โดยวิธีของ Dixon Plot (Dixon และ Webb, 1964) ซึ่งทำได้โดย  
การพลอตระหว่างส่วนกลับของอัตราความเร็ว เริ่มต้นกับความเข้มข้นของอัลโฟนาไมด์

#### 3.17.6.1 การหาค่า $K_i$ ของ sulfanilamide

ใช้คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $1.73 \times 10^{-5}$ ,  $3.45 \times 10^{-5}$   
และ  $5.18 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร ความเข้มข้นของตัวบ่งชี้ตั้งแต่  $2.09 \times 10^{-4}$  -  $9.90$   
 $\times 10^{-4}$  โมล/ลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 ไมโครกรัม ความเข้มข้น  
ของสารละลายอื่น ๆ ในปฏิกิริยารวมทั้งวิธีการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกับในข้อ  
3.17.6

#### 3.17.6.2 การหาค่า $K_i$ ของ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide

ใช้คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $1.29 \times 10^{-5}$ ,  $1.73 \times 10^{-5}$   
และ  $2.30 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร ความเข้มข้นของตัวบ่งชี้ตั้งแต่  $2.00 \times 10^{-4}$  -  $9.16 \times$   
 $10^{-4}$  โมล/ลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 4.20 ไมโครกรัม ความเข้มข้น  
ของสารละลายอื่น ๆ ในปฏิกิริยารวมทั้งวิธีการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกับในข้อ  
3.17.6

#### 3.17.6.3 การหาค่า $K_i$ ของ N,N'-bis (sulfanilyl)-L-cystine

ใช้คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $1.73 \times 10^{-5}$ ,  $2.30 \times 10^{-5}$   
และ  $3.45 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร ความเข้มข้นของตัวบ่งชี้ตั้งแต่  $5.03 \times 10^{-4}$  -  $21.30$   
 $\times 10^{-4}$  โมล/ลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 4.20 ไมโครกรัม ความ  
เข้มข้นของสารละลายอื่น ๆ ในปฏิกิริยารวมทั้งวิธีการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกับ  
ในข้อ 3.17.6

#### 3.17.6.4 การหาค่า $K_i$ ของ sodium-p-aminobenzenesulfonamido- propyl thiosulfate

ใช้คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $1.73 \times 10^{-5}$ ,  $2.30 \times 10^{-5}$   
และ  $3.45 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร ความเข้มข้นของตัวบ่งชี้ตั้งแต่  $4.10 \times 10^{-4}$  -  $20.14$   
 $\times 10^{-4}$  โมล/ลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 4.20 ไมโครกรัม ความ  
เข้มข้นของสารละลายอื่น ๆ ในปฏิกิริยารวมทั้งวิธีการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกับ  
ในข้อ 3.17.6

3.17.6.5 การหาค่า  $K_t$  ของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido)  
benzenesulfonamidoglycine

ใช้คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $5.18 \times 10^{-5}$ ,  $8.05 \times 10^{-5}$   
และ  $11.5 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร ความเข้มข้นของตัวรับยังตั้งแต่  $1.90 \times 10^{-5}$  -  $9.50 \times$   
 $10^{-5}$  โมล/ลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 4.20 ไมโครกรัม ความเข้มข้น  
ของสารละลายอื่น ๆ ในปฏิกิริยารวมทั้งวิธีการวัดแอกติวิตีของ เอนไซม์ เช่นเดียวกับในข้อ

3.17.6

3.18 การแยกโปรตีนด้วยโพลีอะคริลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิดแท่ง (Disc-Poly-  
acrylamide Gel Electrophoresis)

ดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Davis (1964) และ Weber และ Osborn  
(1969)

3.18.1 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์ เจลชนิดแท่ง

ผสมสารละลาย A (ข้อ 2.7.1) 1 ส่วน สารละลาย C (ข้อ 2.7.3) 2 ส่วน  
น้ำกลั่น 1 ส่วน และสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 4 ส่วน โดยปริมาตรเข้าด้วย (ส่วน  
ผสมนี้มีอะคริลาไมด์ 7%) บรรจุลงในหลอดแก้วขนาด  $0.6 \times 10.0$  เซนติเมตร ที่ปิดปลาย  
ข้างหนึ่งด้วยพาราฟิล์ม จนกระทั่งสารละลายในหลอดแก้วมีความสูง 8 เซนติเมตร ค่อย ๆ  
หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้า เจลอย่างรวดเร็วแต่แผ่วเบา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็น  
รอยต่อระหว่างเจลกับน้ำกลั่นอย่างชัดเจน เทน้ำกลั่นออกจากหน้าเจล เตรียมสแลตทิง-เจล  
(stacking gel) โดยผสมสารละลาย B (ข้อ 3.2.7.2) 1 ส่วน สารละลาย D (ข้อ  
3.2.7.4) 2 ส่วน สารละลาย E (ข้อ 3.2.7.5) 1 ส่วน และสารละลาย F (ข้อ  
3.2.7.6) 4 ส่วน โดยปริมาตรเข้าด้วยกัน ล้างหลอดแก้วที่มีเจลด้วยสารผสมสแลตทิง-เจล  
และเติมสารผสมสแลตทิง-เจล 0.2 มิลลิลิตรลงในหลอดที่มีโพลีอะคริลาไมด์ เจล ค่อย ๆ  
หยอดน้ำกลั่นลงบนผิวหน้า เจลอย่างรวดเร็วแต่แผ่วเบา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องหรืออย่าง  
สมบูรณ์ประมาณ 30 นาที ภายใต้น้ำหลังจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ และนำไปใช้ในการทดลอง  
ต่อไป



### 3.18.2 การเตรียมสารละลายโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากแอฟฟิดีโครมาโตกราฟี ไดอะไลซ์ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 150 เท่า ของปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่ 4 องค์กราเซลเซียส เปลี่ยนน้ำ กลั่น 6 ครั้ง ในเวลา 72 ชั่วโมง นำสารละลายที่ไดอะไลซ์ 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณ โปรตีน 120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้แห้งด้วย lyophilizer ละลายของแข็งที่ได้ ด้วยสารละลายยูโครล 80% 100 ไมโครลิตร

### 3.18.3 การทำอิเล็กโตรโฟเรซิส (Electrophoresis)

บรรจุแท่งเจลลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ใส่บัฟเฟอร์ลงในอ่างบัฟเฟอร์ทั้งบน และล่าง จนกระทั่งท่วมปลายเจลทั้งสองข้าง ผ่านกระแสไฟฟ้า เข้าไปในเจลที่ยังไม่ได้หยอด สารละลายโปรตีน (prerun gel) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 2.5 มิลลิแอมแปร์/เจล โดยกำหนดให้ขั้วลบอยู่ด้านบน นาน 1 ชั่วโมง จึงหยอดสารละลายโปรตีนลงบนหน้า เจลและหยด 0.01% บรอมฟินอลบลู 1-2 มิลลิลิตร ลงในบัฟเฟอร์ในอ่างบน ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 2.5 มิลลิแอมแปร์/เจล ผัดกระแสไฟฟ้าเมื่อแถบสีบรอมฟินอลบลูเคลื่อนถึงระยะทางประมาณ 1 เซนติเมตร จากปลายล่างของแท่งเจล

### 3.18.4 วิธีย้อมโปรตีนในโพสอะโครลาไมด์เจล

น้ำเจล (ข้อ 3.18.3) ออกจากหลอดแก้ว ย้อมสีโปรตีนด้วยน้ำยาย้อมสีโปรตีน เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำเจลไปล้างสีส่วนที่ติดเจลออกด้วยน้ำยาล้างสี จนเจลใสและแถบสีน้ำเงินของโปรตีนปรากฏชัดเจน เก็บเจลที่ได้ไว้ในน้ำยาล้างสีที่ 4 องค์กรา เซลเซียส

ผลการทดลอง

4.1 ผลการหาจำนวนเซลล์ของ E.coli

จากการเสาะหาเซลล์ของ E.coli ครั้งที่ 6 และ 7 พบจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยนับ 1 โคโลนีเท่ากับ 1 เซลล์ของ E.coli คำนวณได้ว่ามีจำนวนเซลล์ของ E.coli เท่ากับ  $1.05 \times 10^9 - 1.10 \times 10^9$  เซลล์/มิลลิลิตรของ E.coli ที่ไม่เสาะหา (ตารางที่ 2)

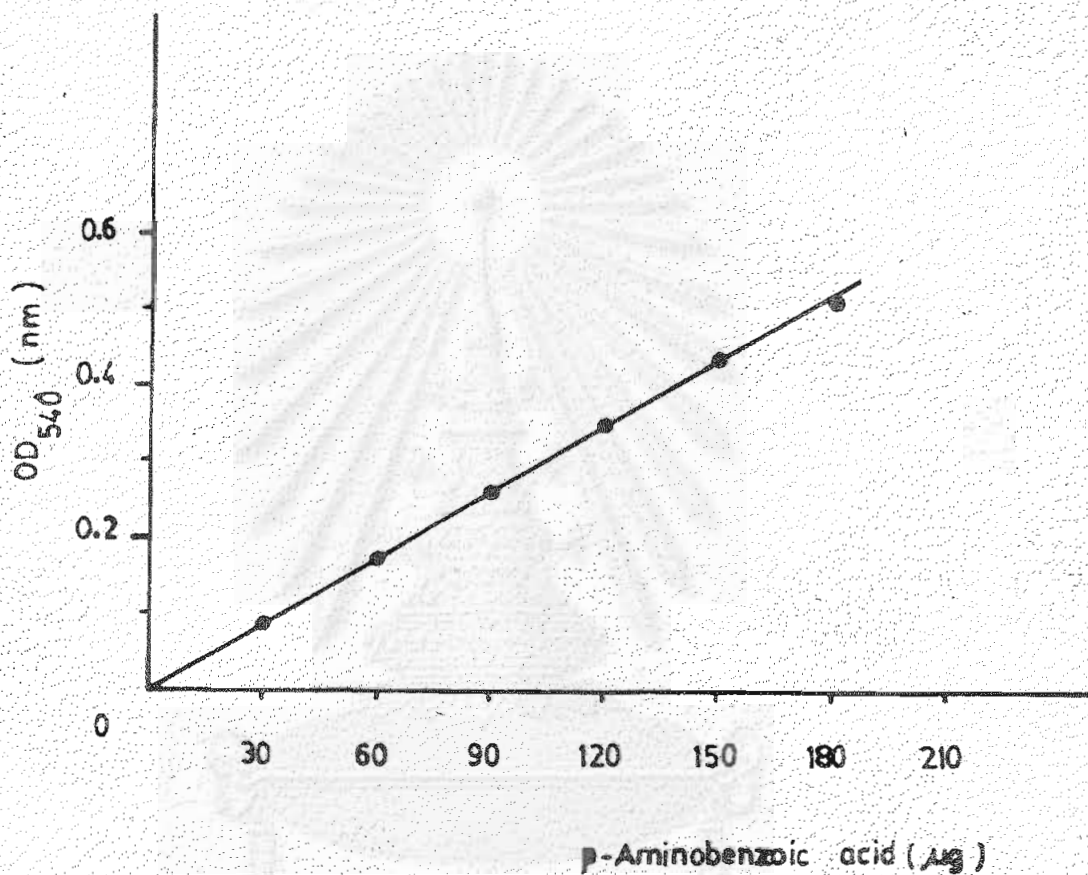
4.2 ผลการหาความเข้มข้นต่ำสุดของซัลโฟนาไมด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ E.coli (MIC)

การทดลองหา MIC ของซัลโฟนาไมด์โดยการเลี้ยง E.coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอก หาค่า MIC ได้เฉพาะของ sulfanilamide ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $4.30 \times 10^{-2}$  โมล/ลิตร ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคส หาค่า MIC ได้เฉพาะของซัลโฟนาไมด์ 2 ชนิด คือ sulfanilamide และ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $1.31 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร และ  $2.91 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร ตามลำดับ ส่วนซัลโฟนาไมด์อีก 3 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองไม่สามารถหาค่า MIC ได้ เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำจำกัด และเมื่อใช้ความเข้มข้นในตัวในน้ำก็ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ E.coli ได้สมบูรณ์ในหลอดที่ทำการทดลอง กล่าวคืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดที่ทำการทดลองขึ้น ซึ่งแสดงว่ามีการเจริญเติบโตของ E.coli เกิดขึ้นในหลอดทดลอง

ปริมาณของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอกเท่ากับ 17.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคสเท่ากับ 2.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกได้จากการเทียบค่าความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (รูปที่ 3) % recovery ของวิธีการหากรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การหาจำนวนเซลล์ของ E.coli เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลซี-บรอก  
 จนอ่านค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0

| การเสีจาง<br>ครั้งที | จำนวนโคโลนบนจานเพาะเชื้อ |         |         | ค่าเฉลี่ย<br>(โคโลนี/0.1 มิลลิลิตร) | จำนวนโคโลนีต่อ<br>มิลลิลิตรของ <u>E.coli</u><br>ทีไม่ได้อเสีจาง |
|----------------------|--------------------------|---------|---------|-------------------------------------|---|
|                      | จานที 1                  | จานที 2 | จานที 3 |                                     |   |
| 6                    | 93                       | 119     | 103     | 105                                 | $1.05 \times 10^9$  |
| 7                    | 9                        | 11      | 12      | 11                                  | $1.10 \times 10^9$  |



รูปที่ 3 เส้นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก กับความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร (ค่าที่นำมาพลอตเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง)

ตารางที่ 3 แสดง % recovery ของวิธีการหาปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก โดย การเทียบค่าความล้มเหลวในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ของสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก

| p-Aminobenzoic acid        |                               | % Recovery * |
|----------------------------|-------------------------------|--------------|
| Total<br>( $\mu\text{g}$ ) | Measured<br>( $\mu\text{g}$ ) |              |
| 94                         | 87                            | 92.55        |
| 124                        | 117.5                         | 94.76        |
| 154                        | 146.5                         | 95.13        |

\*วิธีการหาค่า % recovery ทำได้โดยการเติมกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (pABA) มาตรฐานลงในสารละลายตัวอย่างในปริมาณต่าง ๆ กัน คำนวณ % recovery

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณ pABA ที่วัดได้} \times 100}{\text{ปริมาณ pABA มาตรฐาน} + \text{ปริมาณ pABA ในสารละลายตัวอย่าง}}$$

#### 4.3 ผลการเปรียบเทียบความสามารถของซัลโฟนาไมด์เมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ E.coli

เมื่อใช้ความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ทุกชนิดเท่ากับ  $9.00 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร พบว่า sulfanilamide สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ E.coli ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4) ตัวที่ยับยั้งได้ตรงลงมาคือ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ส่วนซัลโฟนาไมด์อีก 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ E.coli ได้เพียงเล็กน้อย

#### 4.4 ผลการศึกษาหา $I_{50}$ ของซัลโฟนาไมด์

ค่า  $I_{50}$  ของ sulfanilamide, N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine, sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate และ 4-(4-amino benzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine เท่ากับ  $2.15 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร (ตารางที่ 5, รูปที่ 4),  $3.23 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร (ตารางที่ 6, รูปที่ 5),  $3.35 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร (ตารางที่ 7, รูปที่ 6) และ  $2.70 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (ตารางที่ 8, รูปที่ 7) ตามลำดับ แต่ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide หาค่า  $I_{50}$  ไม่ได้เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำมีจำกัด ความเข้มข้นของ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ที่ใช้เป็นความเข้มข้นเริ่มต้นในน้ำ ซึ่งความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง ( $1.60 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เพียง 25.17% เท่านั้น

#### 4.5 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) ด้วยแอฟฟิติกโครมากราฟี

crude enzyme ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-60% แล้ว นำมาไดอะไลซ์ด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์  $0.20$  โมล/ลิตร pH 8.5 เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออก เมื่อนำมาผ่านแอฟฟิติกโครมาโตกราฟี สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์พบว่ามีควมบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 209 เท่า (ตารางที่ 9, รูปที่ 8) ปริมาณโปรตีนในแต่ละแฟรคชันหาได้โดยเทียบความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร กับปริมาณโปรตีนจากกราฟโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 9) ตามวิธีของลอรี

ตารางที่ 4 แสดงความล้มเหลวของซัลโฟนาไมด์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ E.coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคสเมื่อความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์เท่ากับ  $9.00 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร

| ชนิดของซัลโฟนาไมด์                                      | OD <sub>500 nm</sub> *<br>(mean ± S.D.) |
|---|---|
| Sulfanilamide   | 0.042 ± 0.01                            |
| p-Aminobenzenesulfonamidopropyl bromide                 | 1.077 ± 0.02                            |
| N,N'-Bis(sulfanilyl)-L-cystine                          | 1.580 ± 0.009                           |
| Sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate      | 1.577 ± 0.006                           |
| 4-(4-Aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine | 1.416 ± 0.006                           |

ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตร เมื่อไม่มีซัลโฟนาไมด์เท่ากับ  $1.756 \pm 0.028$

\*ค่าตัวเลขที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอต  $v_0/v_i$  กับความเข้มข้นของ sulfanilamide เพื่อใช้หาค่า  $I_{50}$

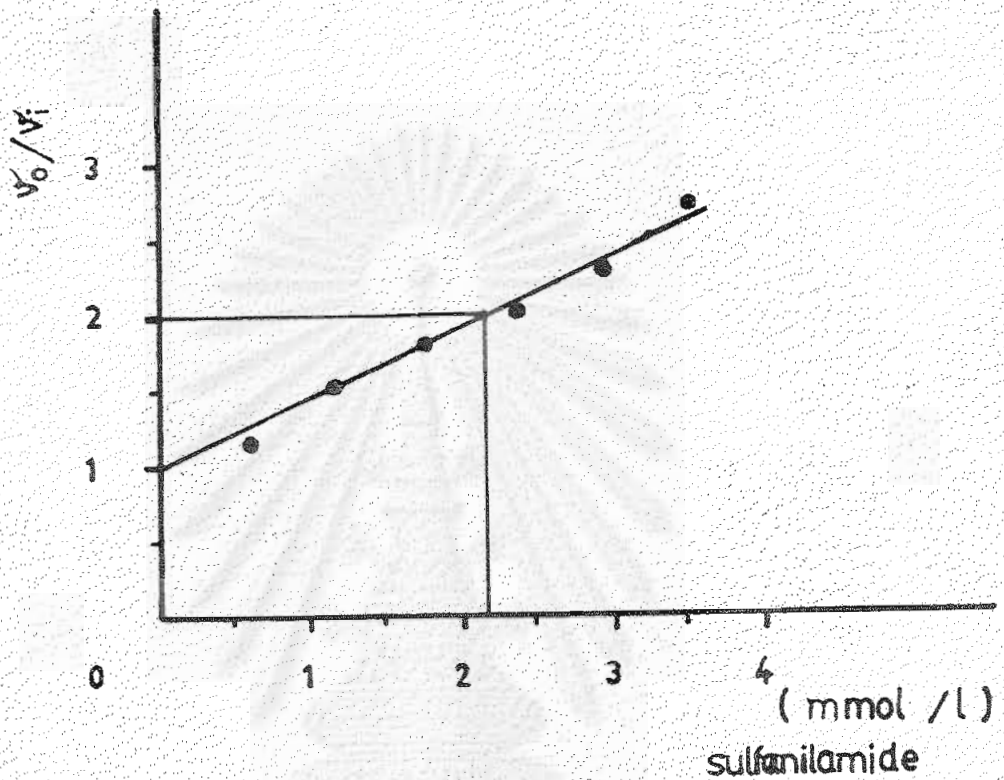
| Inhibitor conc <sup>n</sup><br>(mmol /l) | Enzyme Activity *<br>(cpm/min)<br>(mean + S.D.) | $\frac{v_0}{v_i}$ ** |
|--|---|----------------------|
| 0  | 1488.3 ± 116.0                                  | 1.00                 |
| 0.581                                    | 1146.8 ± 46.8                                   | 1.30                 |
| 1.162                                    | 979.6 ± 66.1                                    | 1.52                 |
| 1.743                                    | 828.0 ± 27.4                                    | 1.80                 |
| 2.324                                    | 728.0 ± 42.0                                    | 2.04                 |
| 2.905                                    | 652.5 ± 11.9                                    | 2.28                 |
| 3.486                                    | 551.2 ± 33.6                                    | 2.70                 |

\* ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

\*\*  $v_0$  เท่ากับอัตราความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง

$v_i$  เท่ากับอัตราความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งเท่ากับ I





รูปที่ 4 เส้นกราฟแสดงความสามารถของ Sulfanilamide ในการยับยั้งการทำงานของโคไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส โดยพลอตอัตราส่วนของอัตราความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อไม่มีตัวยับยั้งและมีตัวยับยั้ง ( $v_0/v_i$ ) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง จากกราฟเมื่อ  $v_0/v_i$  เท่ากับ 2 ค่า  $I_{50}$  มีค่าเท่ากับ  $2.15 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร

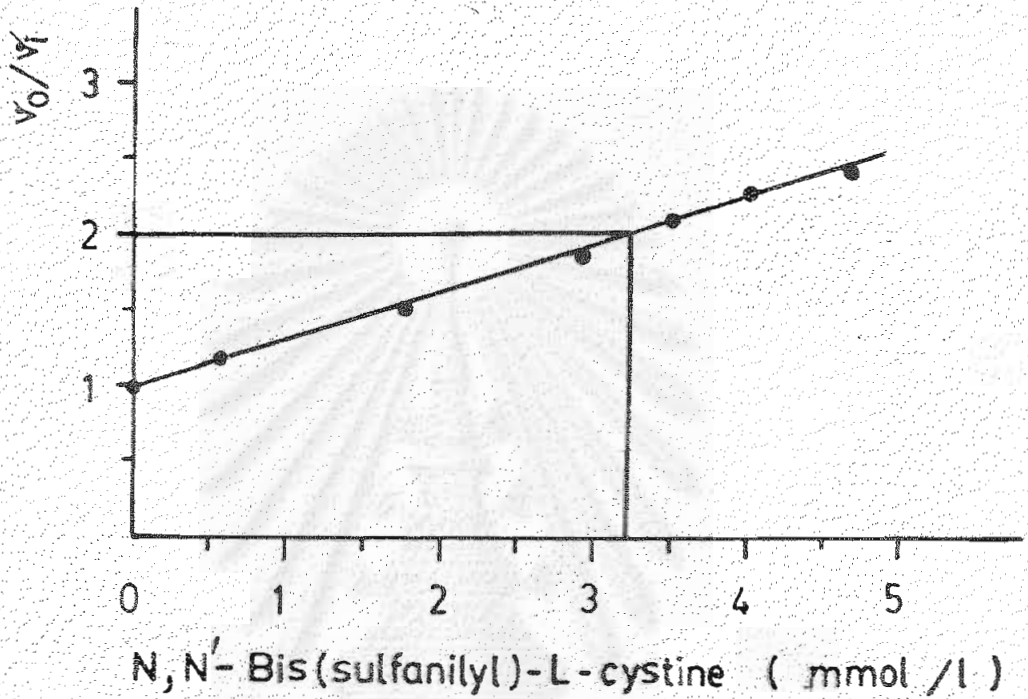
ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอต  $v_o/v_i$  กับความเข้มข้นของ N,N'-bis (sulfonyl)-L-cystine เพื่อหาค่า  $I_{50}$

| Inhibitor conc <sup>n</sup><br>(mmol /l) | Enzyme Acitivity <sup>*</sup><br>(cpm/min)<br>(mean $\pm$ S.D.) | $\frac{v_o}{v_i}$ ** |
|--|---|----------------------|
| 0  | 1548.6 $\pm$ 29.7   | 1.00                 |
| 0.584                                    | 1311.4 $\pm$ 69.7   | 1.18                 |
| 1.752                                    | 1017.8 $\pm$ 48.9   | 1.52                 |
| 2.920                                    | 832.4 $\pm$ 32.0  | 1.86                 |
| 3.504                                    | 739.1 $\pm$ 31.7  | 2.30                 |
| 4.088                                    | 683.6 $\pm$ 12.4  | 2.26                 |
| 4.672                                    | 642.2 $\pm$ 5.6   | 2.41                 |

\* ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

\*\*  $v_o$  เท่ากับอัตราความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง

$v_i$  เท่ากับอัตราความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งเท่ากับ I



รูปที่ 5 เส้นกราฟแสดงความสามารถของ  $N,N'$ -bis(sulfanylyl)-L-cystine ในการยับยั้งการทำงานของโคไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส โดยพลอตอัตราส่วนของ อัตราความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อไม่มีตัวยับยั้งและเมื่อมีตัวยับยั้ง ( $v_0/v_i$ ) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง จากกราฟเมื่อ  $v_0/v_i$  เท่ากับ 2 ค่า  $I_{50}$  มีค่าเท่ากับ  $3.23 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร

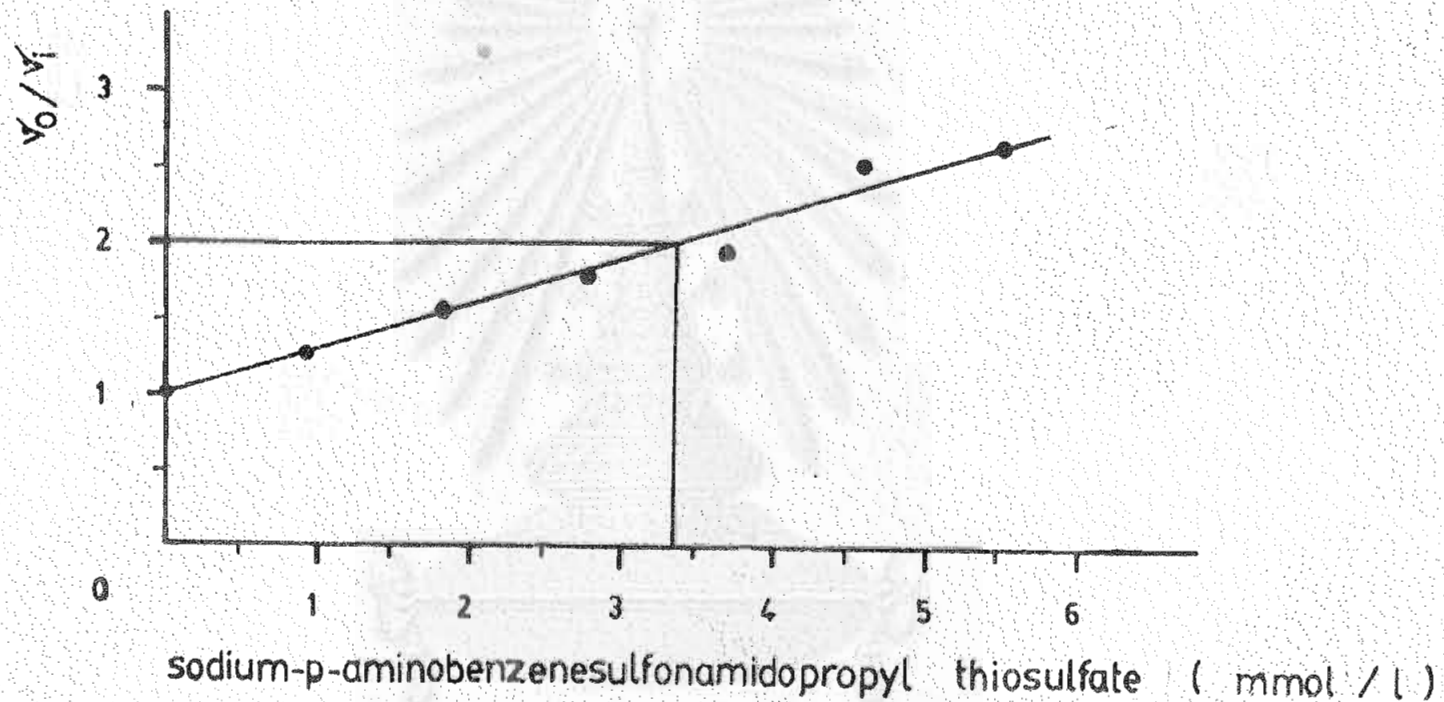
ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอต  $v_0/v_i$  กับความเข้มข้นของ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate เพื่อหาค่า  $I_{50}$

| Inhibitor conc <sup>n</sup><br>(mmol /l) | Enzyme Activity *<br>(cpm/min)<br>(mean $\pm$ S.D.) | $\frac{v_0}{v_i}$ ** |
|--|---|----------------------|
| 0  | 1361.8 $\pm$ 20.6                                   | 1.00                 |
| 0.920                                    | 1085.6 $\pm$ 29.1                                   | 1.254                |
| 1.839                                    | 881.1 $\pm$ 14.4                                    | 1.546                |
| 2.759                                    | 760.1 $\pm$ 57.4                                    | 1.792                |
| 3.679                                    | 701.6 $\pm$ 13.9                                    | 1.941                |
| 4.599                                    | 540.0 $\pm$ 11.1                                    | 2.522                |
| 5.519                                    | 518.1 $\pm$ 21.2                                    | 2.628                |

\* ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

\*\*  $v_0$  เท่ากับ อัตราความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง

$v_i$  เท่ากับอัตราความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งเท่ากับ  $I$



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสามารถของ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate ในการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรฟเทอโรเอท ซินเทส โดยการพลอตอัตราส่วนของอัตราความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อไม่มีตัวยับยั้งและเมื่อมีตัวยับยั้ง ( $v_0/v_1$ ) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง จากกราฟเมื่อ  $v_0/v_1$  เท่ากับ 2 ค่า  $I_{50}$  มีค่าเท่ากับ  $3.35 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร

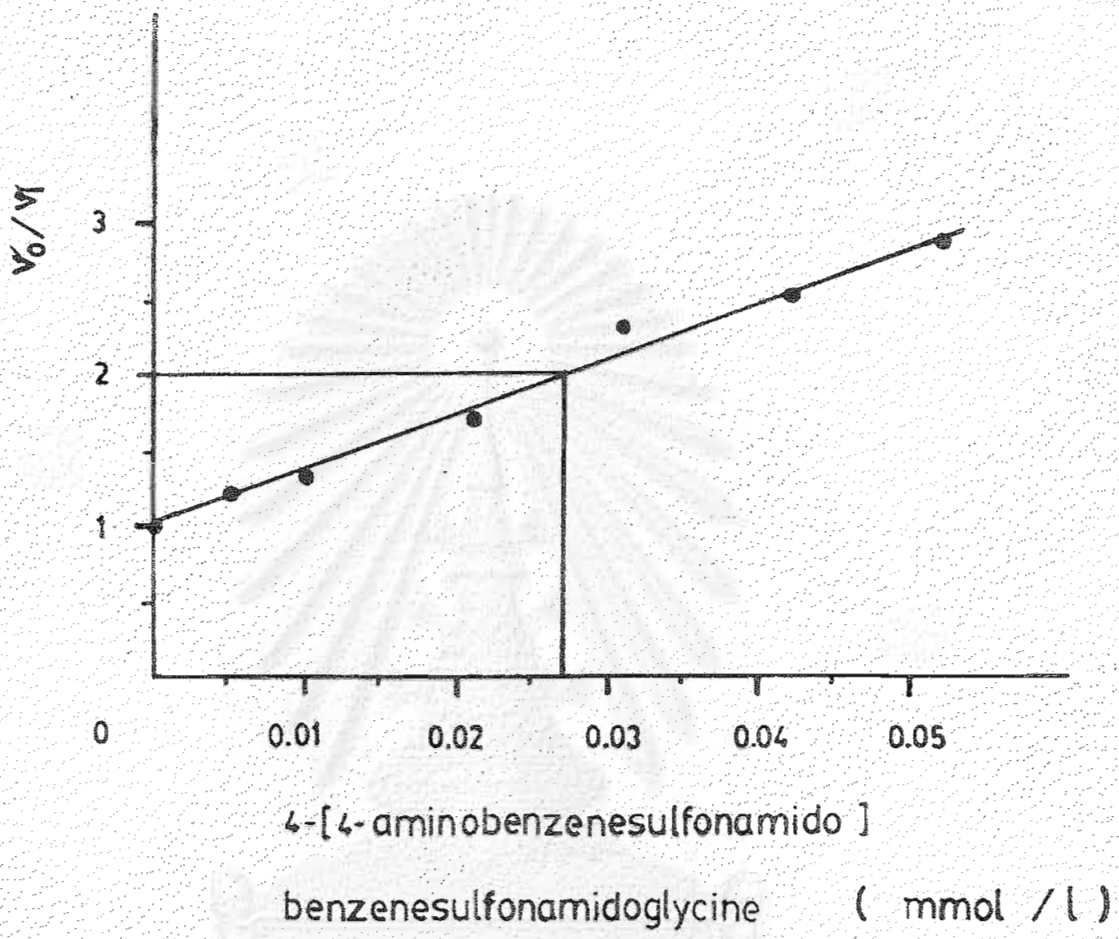
ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลที่ใช้ในการพลอต  $v_o/v_i$  กับความเข้มข้นของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine เพื่อหาค่า  $I_{50}$

| Inhibitor conc <sup>n</sup><br>(mmol /l) | Enzyme Activity *<br>(cpm/min)<br>(mean + S.D.) | $\frac{v_o}{v_i}$ ** |
|--|---|----------------------|
| 0  | 1432.6 + 19.9                                   | 1.00                 |
| 0.005                                    | 1180.5 + 94.2                                   | 1.21                 |
| 0.010                                    | 1071.5 + 28.7                                   | 1.34                 |
| 0.021                                    | 839.3 + 54.0                                    | 1.71                 |
| 0.031                                    | 623.8 + 74.1                                    | 2.30                 |
| 0.042                                    | 570.9 + 13.9                                    | 2.51                 |
| 0.052                                    | 499.7 + 9.7                                     | 2.87                 |

\* ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

\*\*  $v_o$  เท่ากับอัตราความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อไม่มีตัวยับยั้ง

$v_i$  เท่ากับอัตราความเร็วของปฏิกิริยาเมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งเท่ากับ I



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสามารถของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido)benzene sulfonamidoglycine ในการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรฟเทอโรเอท ซินเทส โดยพลอตอัตราส่วนของอัตราความเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเมื่อไม่มี ตัวยับยั้งและเมื่อมีตัวยับยั้ง ( $v_0/v_1$ ) กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง จากกราฟ เมื่อ  $v_0/v_1$  เท่ากับ 2 ค่า  $I_{50}$  มีค่าเท่ากับ  $2.70 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร

ตารางที่ 9 แสดงขั้นตอนการแยกไตโอโทรฟเทอโรเอก ซินเทส จาก E.coli

| Purification Step   | Total Volume (ml) | Concentration of protein (mg/ml) | Total protein (mg) | Concentration of enzyme (units/ml) | Specific activity (units/mg prot.) | Total Activity (units) | Yield (%) | Purification fold |
|---|-------------------|----------------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------|-------------------|
| crude cell-free extract                                     | 50                | 35.5                             | 1795               | 0.655                              | 0.0182                             | 32.76                  | 100       | 1                 |
| Ammonium sulfate precipitation (20-60% saturation fraction) | 5                 | 33                               | 165                | 0.622                              | 0.019                              | 3.11                   | 9.49      | 1.04              |
| Affinity chromatography                                     | 5                 | 0.1332                           | 0.666              | 0.508                              | 3.814                              | 2.54                   | 7.74      | 209               |

1 หน่วยของเอนไซม์ = ปริมาณเอนไซม์ที่ใส่เร่งปฏิกิริยาการเกิด 7,8-ไอโอโทรฟเทอโรเอกได้ 1.0 นาโนโมล/นาที ในสภาวะที่กำหนดไว้ในตารางทดลอง



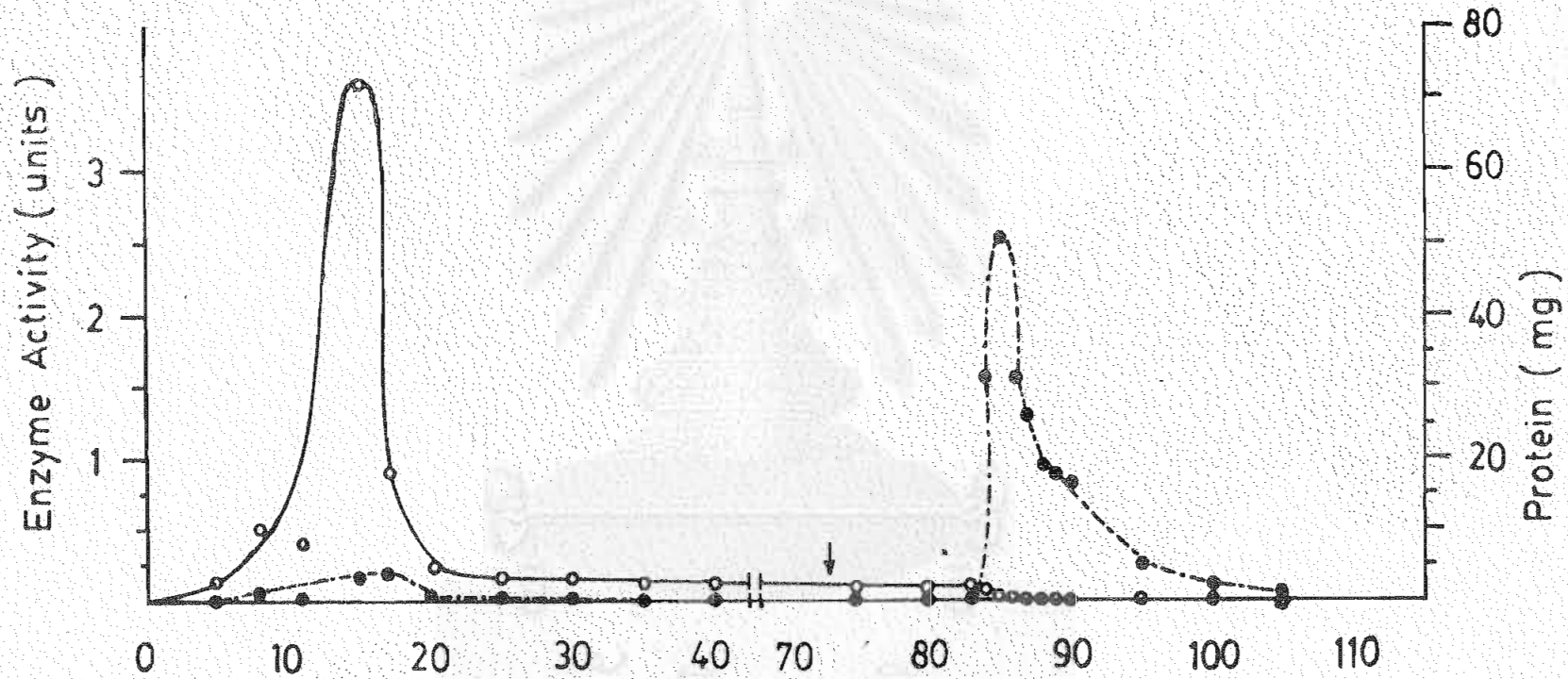
รูปที่ 8 ผลการแยกไตไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส จาก crude enzyme โดยวิธีแอฟฟิณี โครมาโตกราฟี (2.7x19 เซนติเมตร) ๑๑ด้วย บัฟเฟอร์ I อัตราการไหล 30 มิลลิลิตร/ชั่วโมง หลอดละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 73 หลอด แล้วจึงชะด้วยบัฟเฟอร์ II เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มิลลิลิตร อีก 34 หลอด รายละเอียดการทดลองตามวิธีทดลองในข้อ 3.16.2

●—● แอคติวิตีของไตไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส (units)

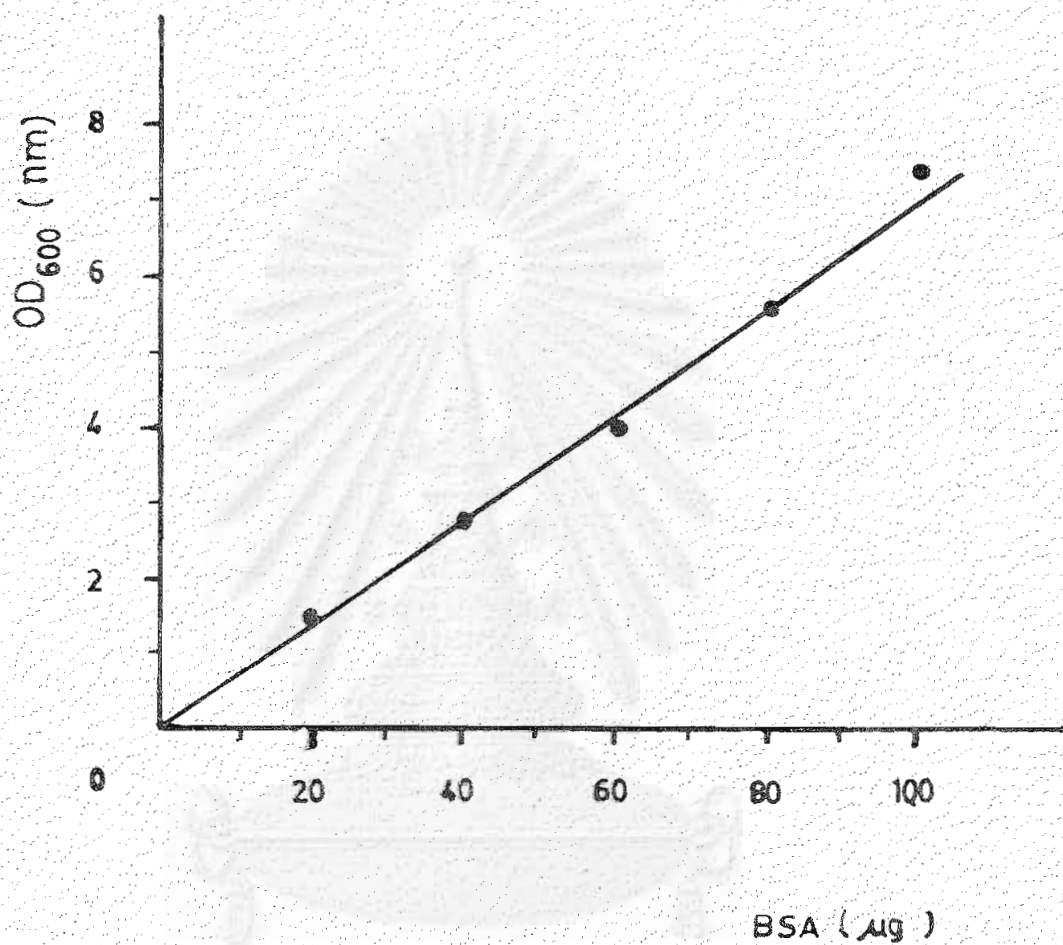
○—○ ปริมาณโปรตีน

↓ จุดที่เปลี่ยนบัฟเฟอร์ I เป็นบัฟเฟอร์ II

สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



8  
 $\frac{1}{2}$



รูปที่ 9 เส้นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของBSA กับ ความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ตามวิธีของลอรี  
(ค่าที่นำมาพลอตเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ครั้ง)

ปริมาณตัวบ่งชี้ที่ติดอยู่กับเจลด้วยพันธะโควาเลนต์หาได้โดย กรมวิทยาศาสตร์  
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เป็นผู้ทำการวิเคราะห์ ได้ปริมาณตัวบ่งชี้เท่ากับ 6  
ไมโครโมลของซิลเฟอร์/มิลลิลิตร ของ settled gel สำหรับละลายเอนไซม์ที่ได้จากการ  
ทำแอนติบอดีโครมาโตกราฟีพามาทำอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ปรากฏว่ามีแถบ  
โปรตีนให้เห็นชัด 3 แถบ และเป็นแถบโปรตีนบาง ๆ 4 แถบ (รูปที่ 10)

#### 4.6 ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของไดไฮโดรพเทเพโรเอท ซีนเทส

##### 4.6.1 ผลการหาช่วง เวลาที่ใช้ในการอินคิวเบต

จากกราฟ (รูปที่ 11) ช่วงเวลาที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ DHP  
ช่วงเวลาน้อยกว่า 25 นาที เลือกช่วงเวลา 20 นาที เพื่อใช้ในการอินคิวเบตสำหรับการ  
ทดลองอื่นต่อไป

##### 4.6.2 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

จากกราฟ (รูปที่ 12) พบว่าปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ช่วง 0-10.80 ไมโครกรัมเป็นสัดส่วน  
โดยตรงกับแอกติวิตีของเอนไซม์ เลือกปริมาณเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 และ 4.20  
ไมโครกรัม สำหรับการทดลองอื่นต่อไป

##### 4.6.3 ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

จากกราฟ (รูปที่ 13) อุณหภูมิที่ 45 - 46 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้แอกติวิตี  
ของเอนไซม์สูงสุด เลือกอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองอื่นต่อไป

##### 4.6.4 ผลการหา pH ที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

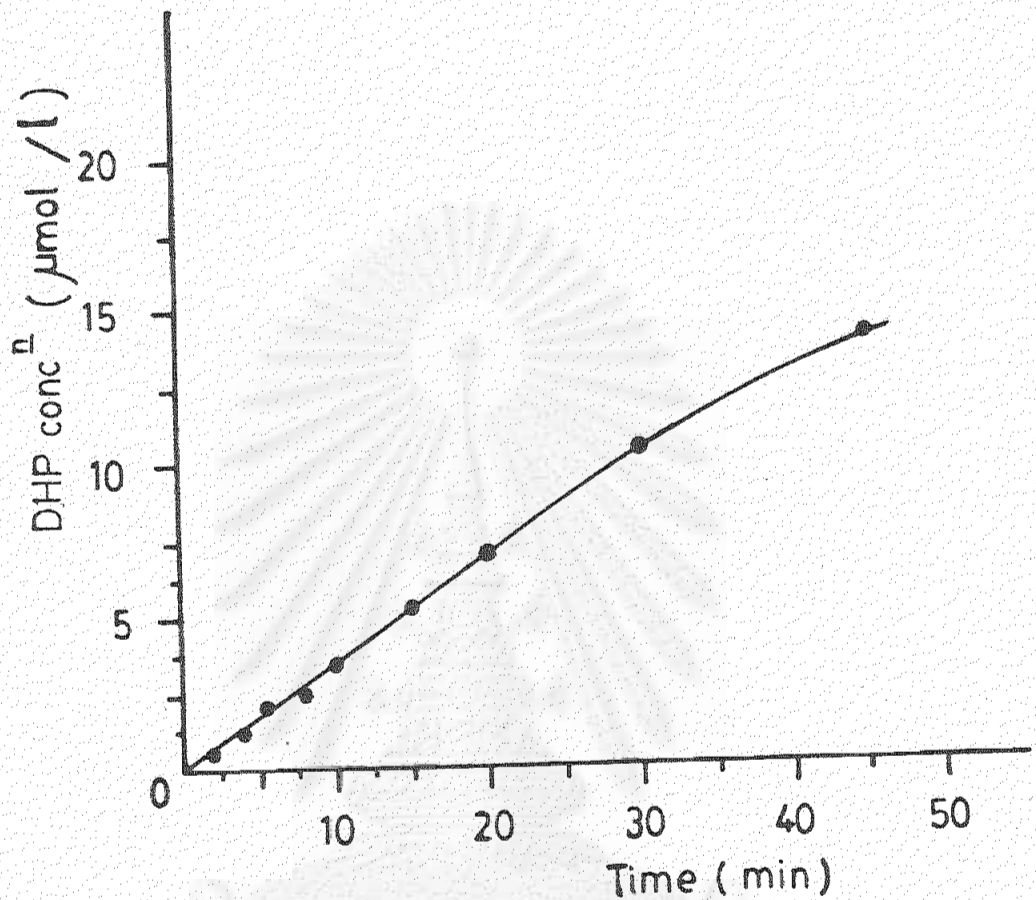
จากกราฟ (รูปที่ 14) pH ที่ 8.58 จะมีผลทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์  
สูงสุด เลือก pH ที่ 8.58 สำหรับการทดลองอื่นต่อไป

##### 4.6.5 ผลการศึกษาหาค่า $K_m$ สำหรับกรตพารา-อะมิโนเบนโซอิก

แต่ละค่าความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรตพารา-อะมิโนเบนโซอิก เมื่อแปร เวลาที่  
ใช้ในการอินคิวเบตจะได้อาณาที่พลอตระหว่าง เวลากับแอกติวิตีของเอนไซม์ หาค่าอัตราความ  
เร็วเริ่มต้นของแต่ละค่าความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรตพารา-อะมิโนเบนโซอิก เช่นรูปที่ 15  
นำค่าอัตราความเร็วเริ่มต้นที่ได้ (ไมโครโมล/ลิตร/นาที) มาพลอตหาค่า  $K_m$  ของคาร์บอน  
-14-กรตพารา-อะมิโนเบนโซอิกโดยวิธี Lineweaver Burk plot ตามวิธีการทดลองข้อ  
3.17.5 ได้ค่า  $K_m$  ของคาร์บอน-14-กรตพารา-อะมิโนเบนโซอิกเท่ากับ  $2.86 \times 10^{-5}$   
โมล/ลิตร (รูปที่ 16)

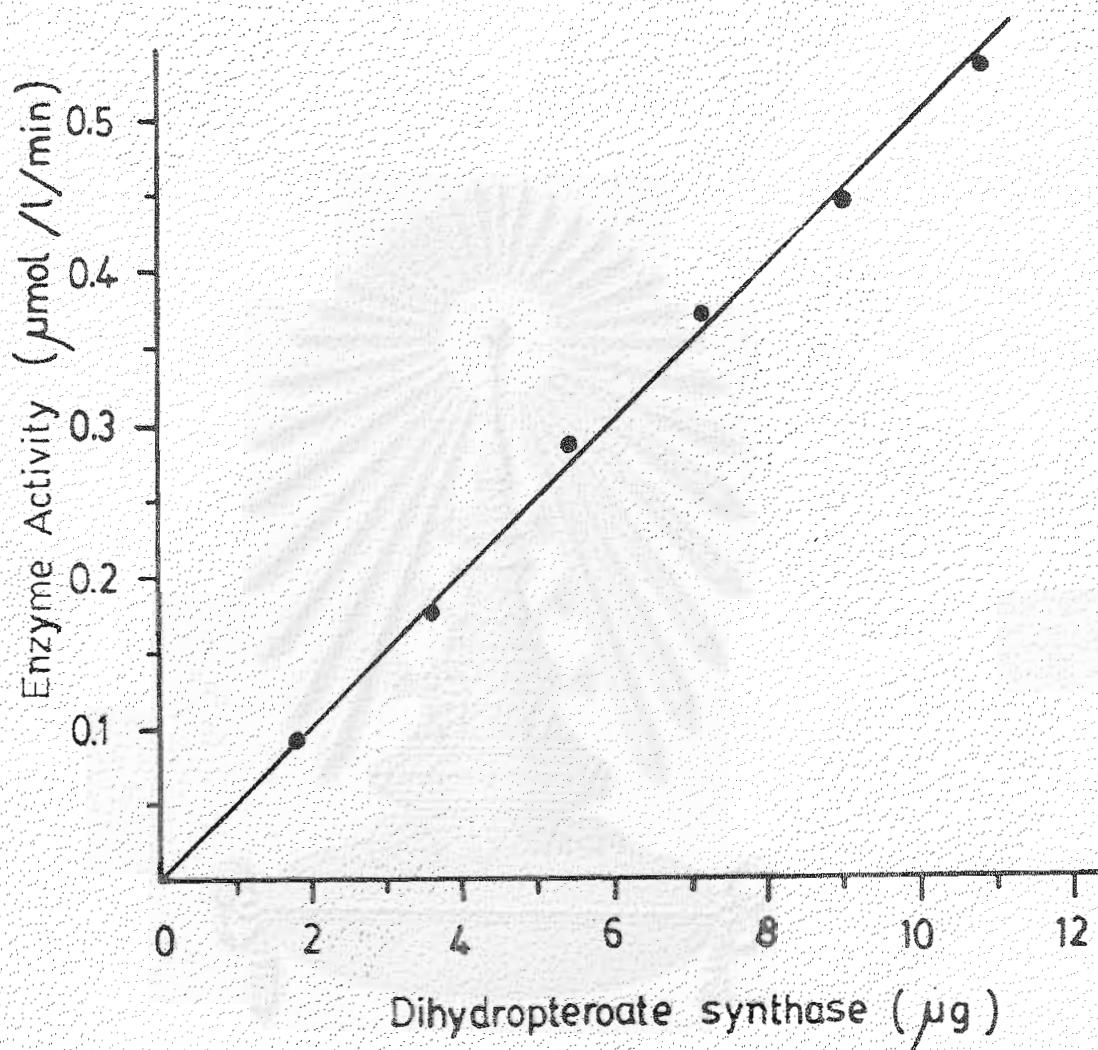


รูปที่ 10 แสดงผลการทำอะโครลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบแท่ง เปรียบเทียบ ระหว่าง crude enzyme ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อิ่มตัว 20-60% (I) กับ สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากแอฟฟิดีคอสมันน์ (II) ปริมาณโปรตีนที่ใช้สำหรับ I เท่ากับ 300 ไมโครกรัม และปริมาณโปรตีน ที่ใช้สำหรับ II เท่ากับ 240 ไมโครกรัม



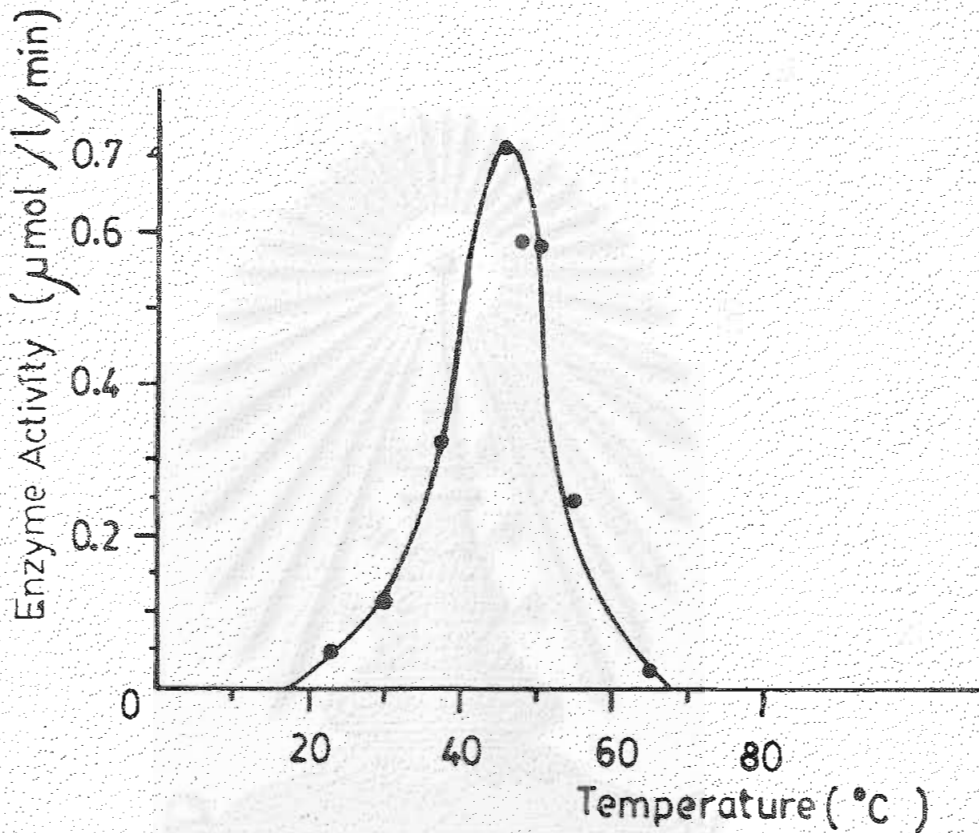
รูปที่ 11 แสดงการพลอตระหว่าง เวลา กับความเข้มข้นของ DHP เพื่อหาช่วงเวลาที่ใช่ ในการอินคิวเบต โดยสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์-บัฟเฟอร์ pH 8.5 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $5.18 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 0.4 โมล/ลิตร และ สารละลาย เอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่ 37 องศาเซลเซียส .

(ค่าที่นำมาพลอตเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง)



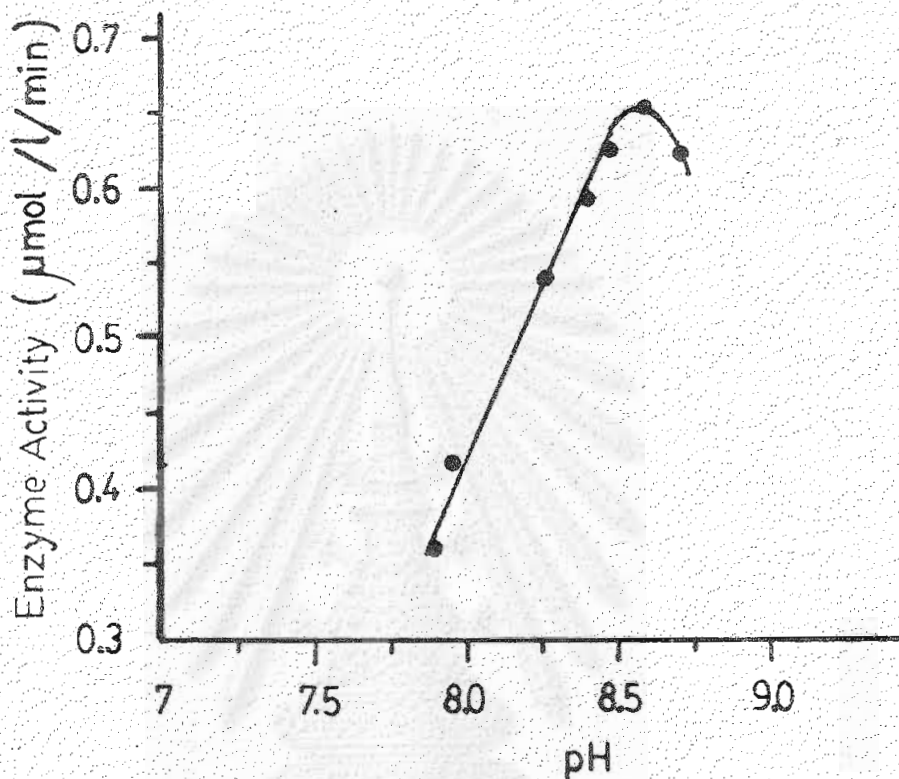
รูปที่ 12

แสดงการพลอตระหว่าง โคโฮโดรพเทอโรเอพซินเทส กับ แอคติวิตีของเอนไซม์ เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา ประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียม-คลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $5.18 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคพโต-เอทานอล 0.4 โมล/ลิตร และสารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 0-10.80 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (ค่าที่นำมาพลอตเป็น ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง)



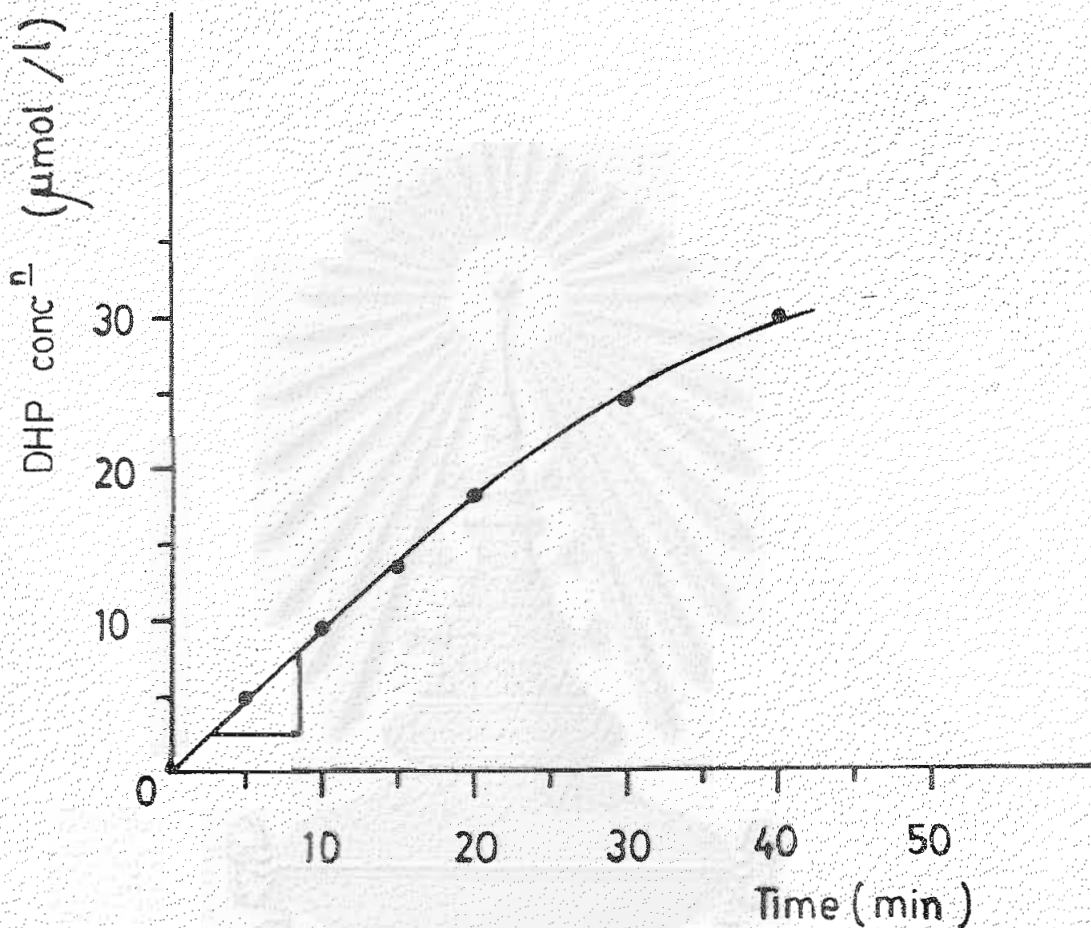
รูปที่ 13 แสดงการพลอตระหว่างอุณหภูมิ และ แอคติวิตีของเอนไซม์ เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $5.18 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคปโตเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่ 23-65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (ค่าที่นำมาพลอตเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง)





รูปที่ 14 แสดงการพลอตระหว่าง pH กับ แอคติวิตีของเอนไซม์ เพื่อหา pH ที่เหมาะสม ในการทำปฏิกิริยา สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.88-8.7 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $5.18 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคปโตเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.40 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

(ค่าที่นำมาพลอตเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ครั้ง)

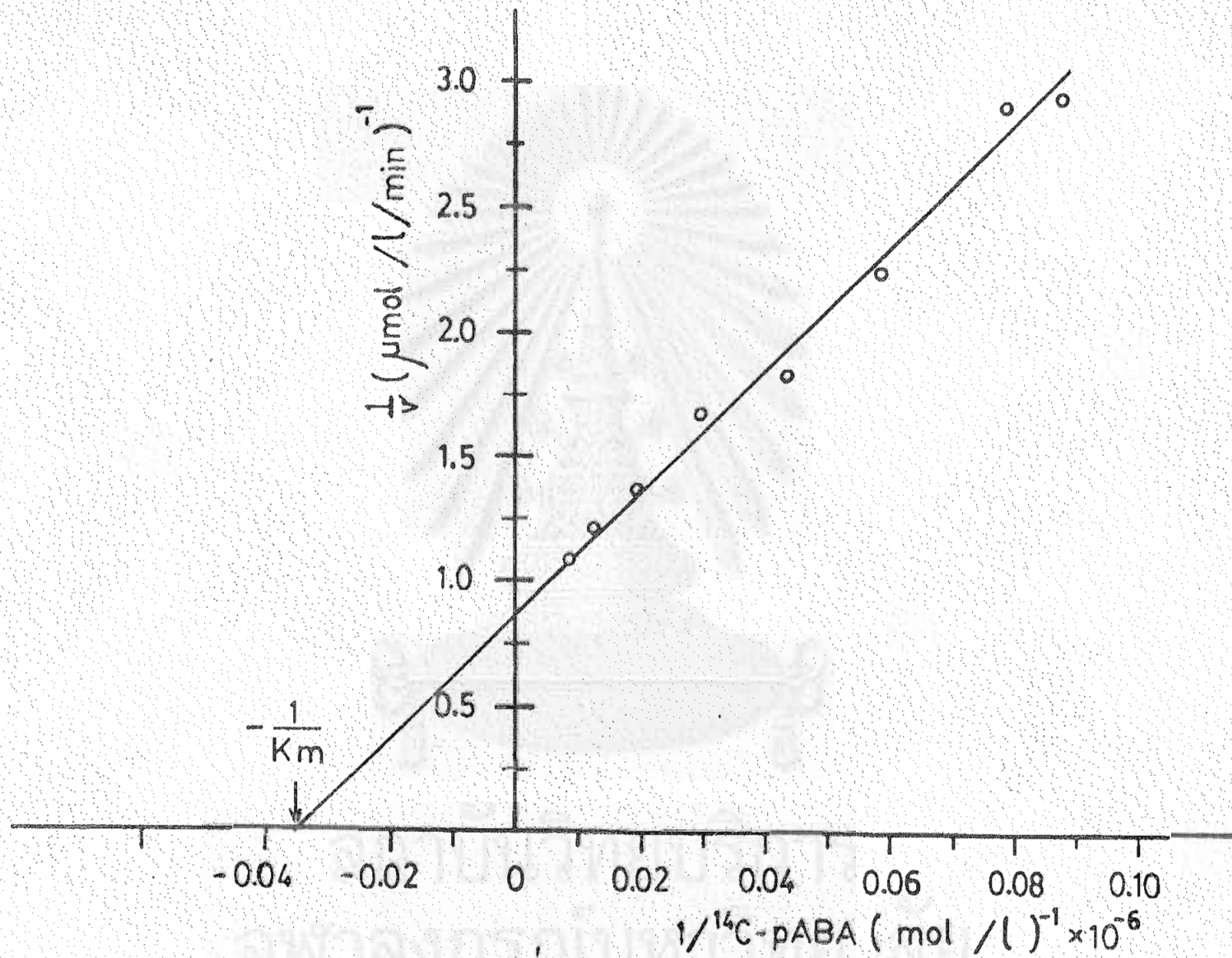


รูปที่ 15. กราฟแสดงการหาอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (ไมโครโมล/ลิตร/นาที) เมื่อใช้คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก เท่ากับ 115 ไมโครโมล/ลิตร จากกราฟอัตราความเร็วเริ่มต้น เท่ากับ 0.92 ไมโครโมล/ลิตร/นาที

รูปที่ 16 แสดงการพลอตแบบLineweaver-Burk Plot ระหว่างส่วนกลับของอัตราความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา เมื่อแปรเวลาไปในความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกแต่ละค่า กับส่วนกลับของความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก (วิธีการทดลองข้อ3,17.5) จากกราฟอ่านค่า  $K_m$  ของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก เท่ากับ  $2.90 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร

สถาบันวิจัยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16

4.6.6 ผลการศึกษาค่า  $K_i$  ของอัลโฟนาไมด์

โดยอาศัยวิธีการพลอตแบบ Dixon plot ค่า  $K_i$  ของ sulfanilamide เท่ากับ  $4.30 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร (รูปที่ 17)  $K_i$  ของ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide เท่ากับ  $7.50 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร (รูปที่ 18)  $K_i$  ของ N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine เท่ากับ  $3.50 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร (รูปที่ 19)  $K_i$  ของ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate เท่ากับ  $5.38 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร (รูปที่ 20) และ  $K_i$  ของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine เท่ากับ  $7.50 \times 10^{-6}$  โมล/ลิตร (รูปที่ 21)

4.7 ผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง  $\frac{K_i}{K_m}$  กับ  $\left[\frac{I}{S}\right] 0.5$

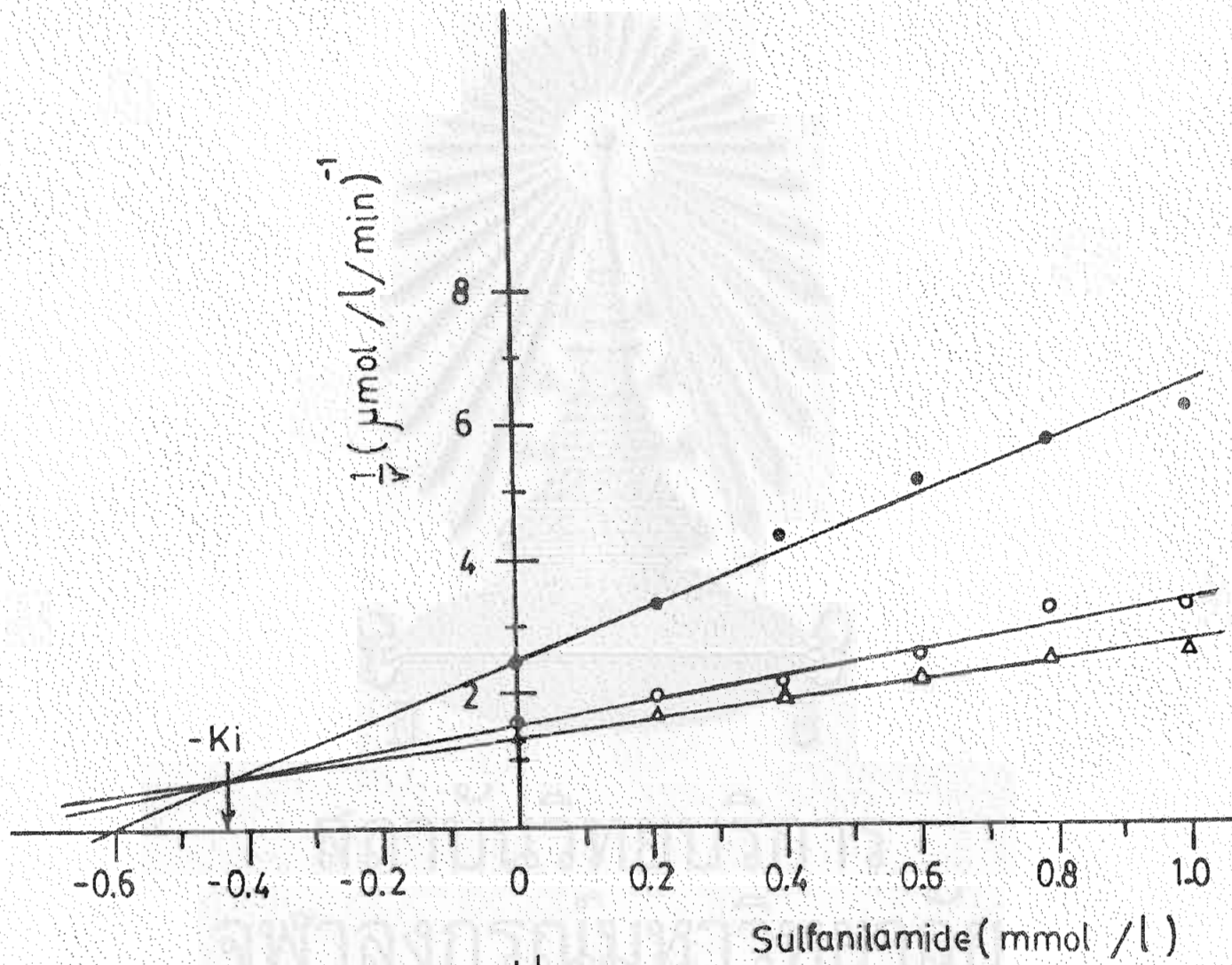
จากวิธีการทดลองข้อ 3.15 เมื่อใช้ความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเป็น 4 เท่าของค่า  $K_m$  ของไดไฮโดรพเทอโรเอทซินเทส จะได้ว่า

$$\frac{K_i}{K_m} = \left[\frac{I}{S}\right] 0.5$$

เมื่อ  $K_m$  และ  $K_i$  เป็นค่าที่ได้จากการทดลองข้อ 4.6.5 และข้อ 4.6.6 ตามลำดับ I เป็นความเข้มข้นของอัลโฟนาไมด์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเอทซินเทส ได้ 50% S เป็นความเข้มข้นของคาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกที่ใช้ในปฏิกิริยาการหาค่า  $I_{50}$  ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $1.15 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร

จากตารางที่ 10 จะเห็นว่าอัตราส่วนของ  $\frac{K_i}{K_m}$  กับ  $\left[\frac{I}{S}\right] 0.5$  ของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine ใกล้เคียงกันมาก แต่สำหรับ sulfanilamide, N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine และ sodium p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate ค่าอัตราส่วนระหว่าง  $\frac{K_i}{K_m}$  กับ  $\left[\frac{I}{S}\right] 0.5$  ต่างกัน 1.24, 2.29 และ 1.55 เท่า ตามลำดับและ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide หาค่าอัตราส่วนของ  $\left[\frac{I}{S}\right] 0.5$  ไม่ได้เนื่องจากหาค่า  $I_{50}$  ไม่ได้ดังกล่าวมาแล้วในผลการทดลองข้อ 4.4

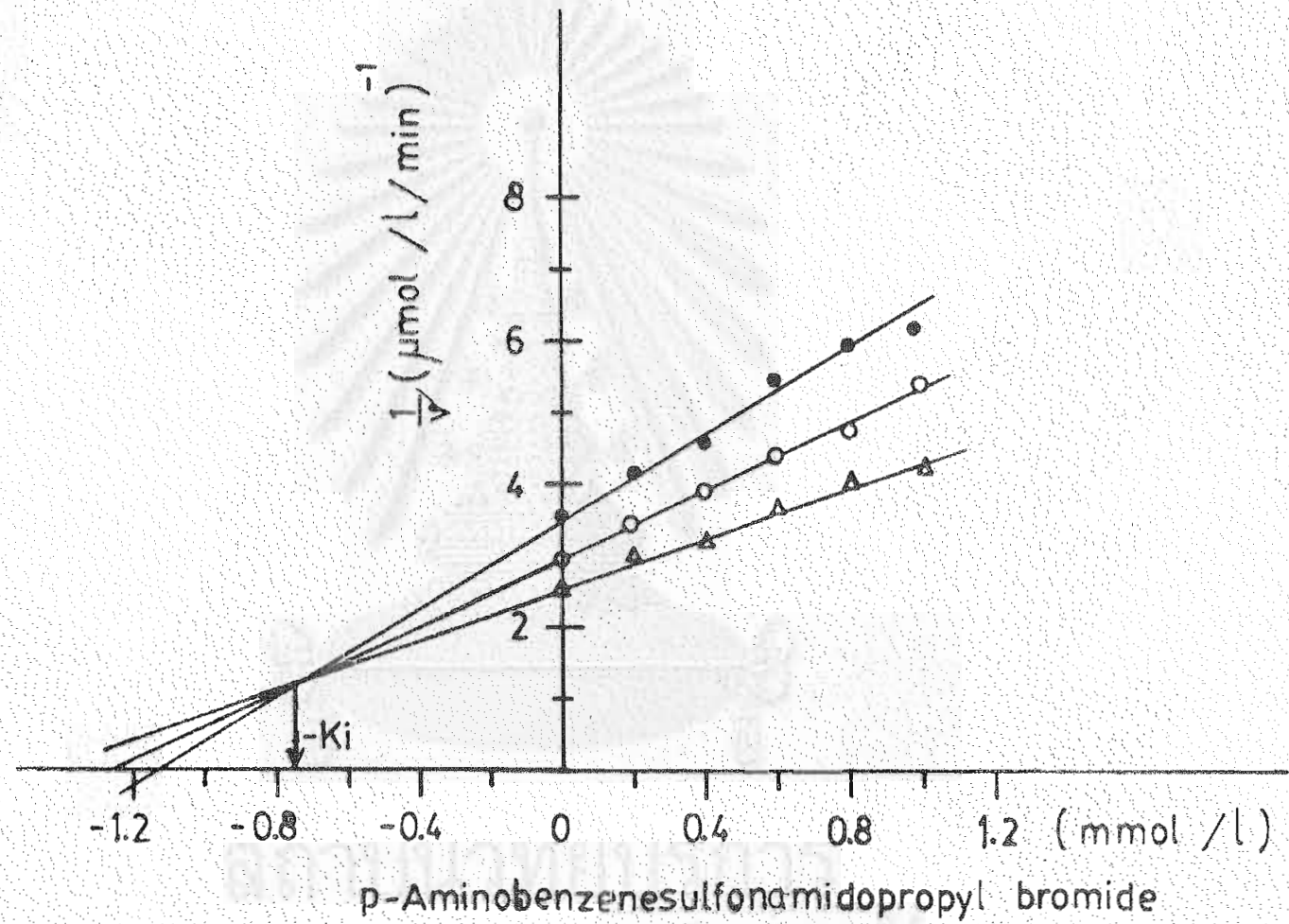
รูปที่ 17 แสดงการพลอตแบบ Dixon Plot โดยพลอตระหว่าง ความเข้มข้นของ sulfanilamide กับ ส่วนกลับของอัตราความเร็วเริ่มต้น สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.58 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร x DHPP  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคพ-โทเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $1.73 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (●)  $3.45 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (○) และ  $5.18 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (▲) sulfanilamide  $2.09 \times 10^{-4}$  -  $9.90 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 5.4 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากจุดที่เส้นกราฟตัดกัน อ่านค่า  $K_1$  เท่ากับ  $4.30 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร



รูปที่ 17

รูปที่ 18 แสดงการพลอตแบบ Dixon Plot โดยพลอตระหว่าง ความเข้มข้นของ p-aminobenzen-sulfonamidopropyl bromide กับส่วนกลับของอัตราความเร็วเริ่มต้น สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.58 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคปโตเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $1.29 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (●)  $1.73 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (○) และ  $2.30 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (△) p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide  $2.00 \times 10^{-4}$  -  $9.16 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 4.20 ไมโครกรัม ถิ่นควิบัตที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากจุดที่เส้นกราฟตัดกันอ่านค่า  $K_i$  เท่ากับ  $7.50 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร

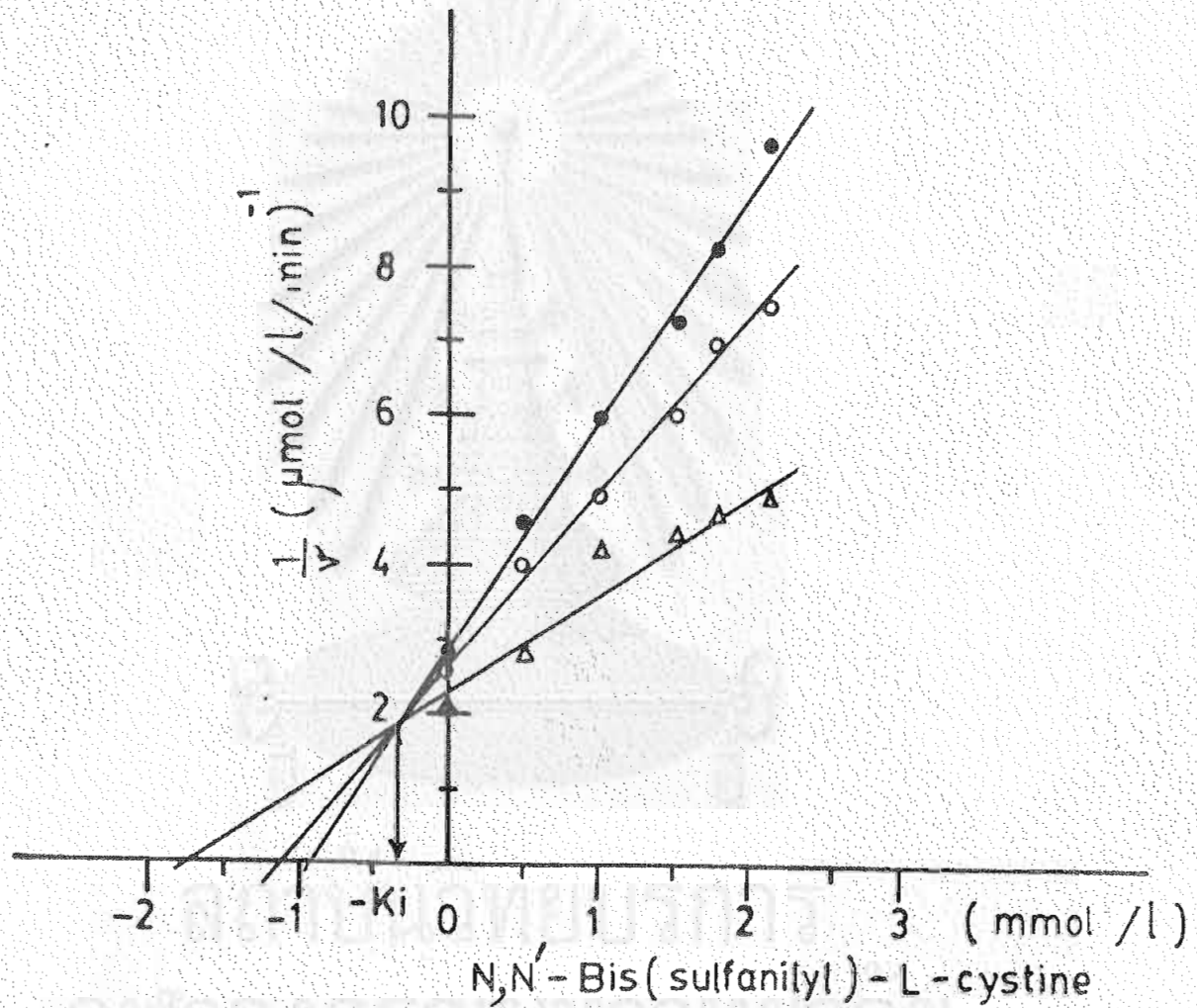




18

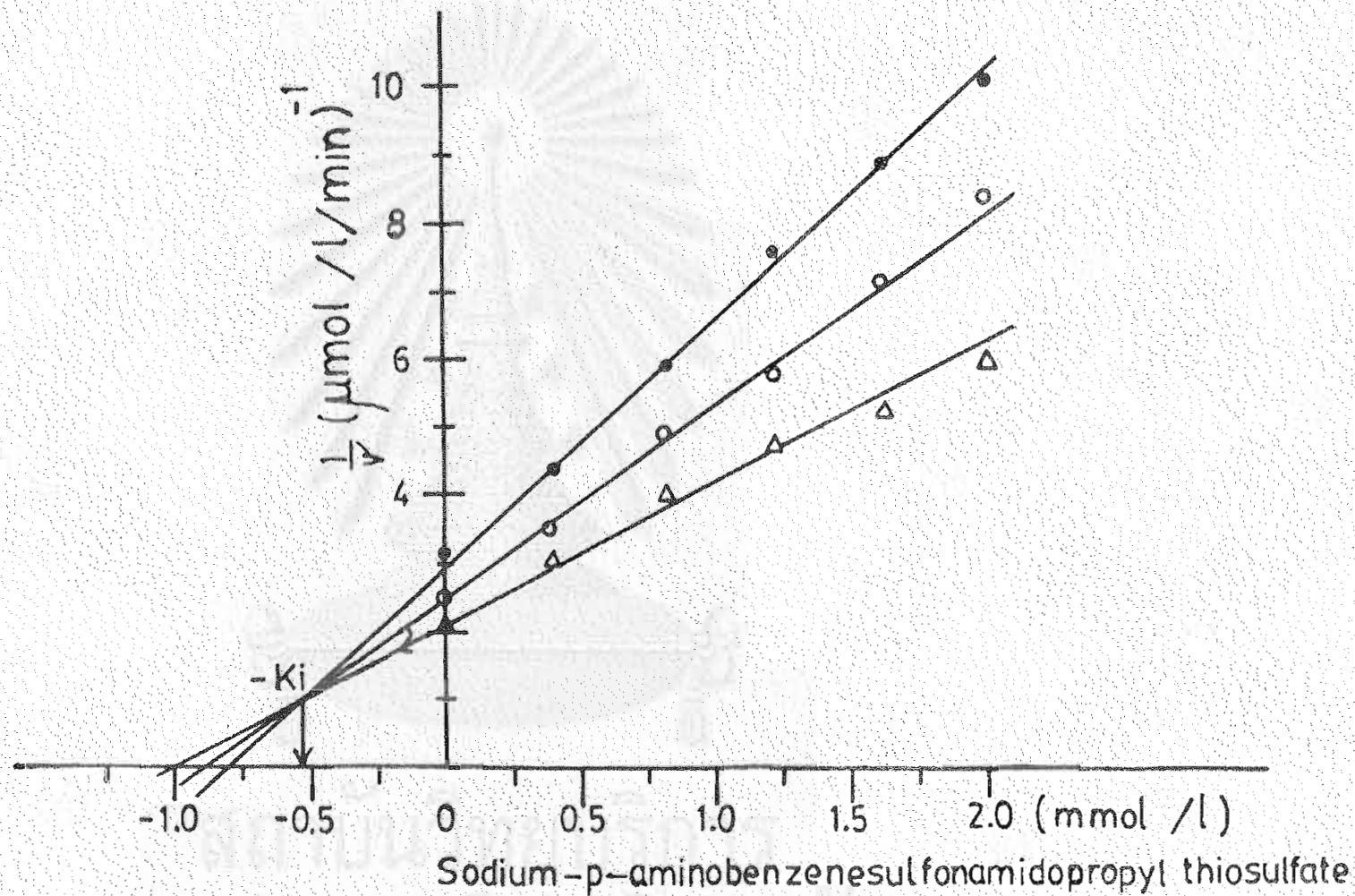
รูปที่ 19

แสดงการพลอตแบบ Dixon Plot ระหว่างความเข้มข้นของ  $N,N'$ -bis(sulfanylyl)-L-cystine กับส่วนกลับของอัตราความเร็วเริ่มต้น สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.58 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 0.4 โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก  $1.73 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (●)  $2.30 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (○) และ  $3.45 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (Δ)  $N,N'$ -bis(sulfanylyl)-L-cystine  $5.03 \times 10^{-4}$  -  $21.30 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 4.20 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากจุดที่เส้นกราฟตัดกันอ่านค่า  $K_i$  เท่ากับ  $3.50 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร



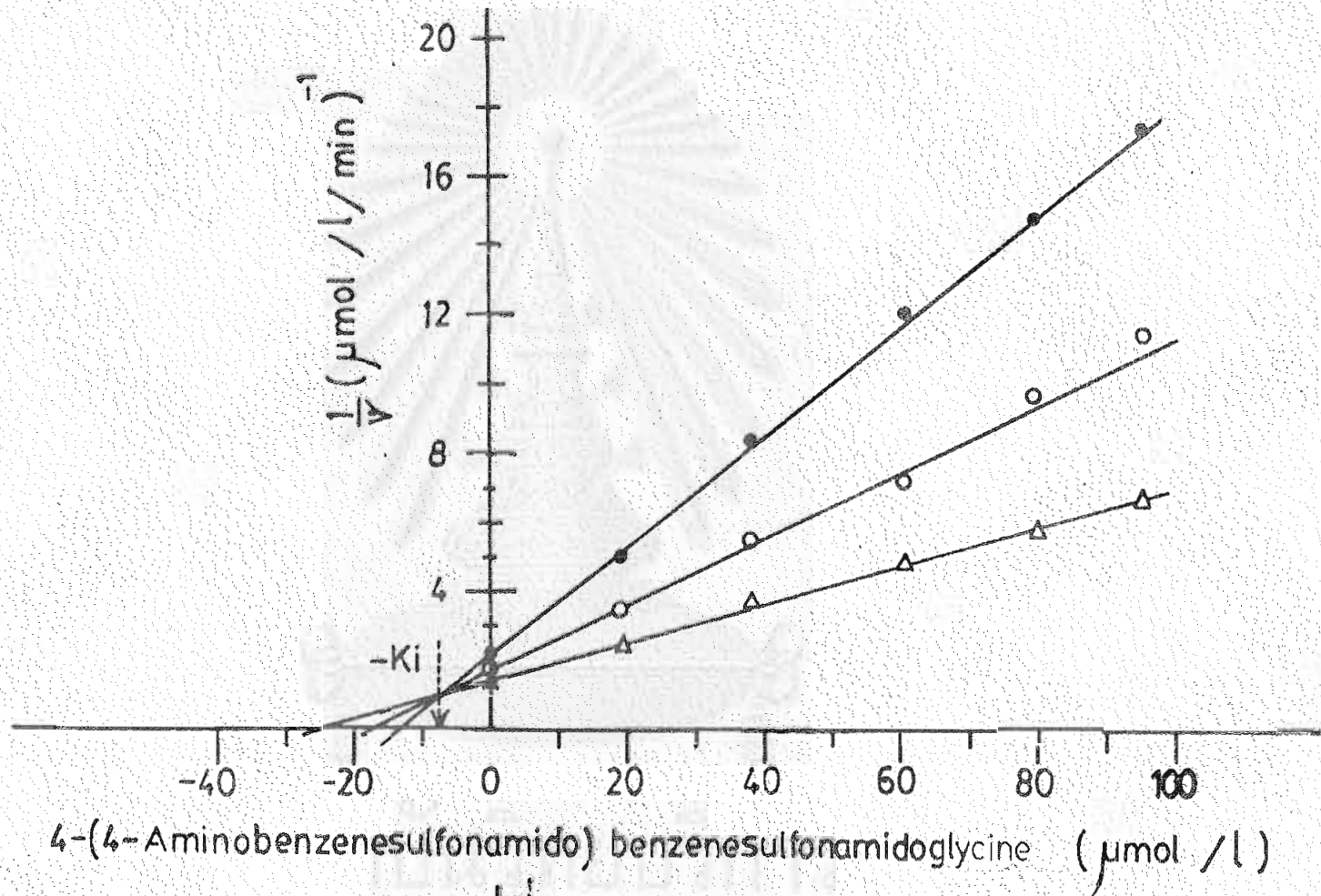
19

รูปที่ 20 แสดงการพลอตแบบ Dixon Plot โดยพลอตระหว่างความเข้มข้นของ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate กับลํานกสับของอัตราความเร็วเริ่มต้น สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 8.58 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์  $5 \times 10^3$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ 6.64 โมล/ลิตร 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $1.73 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (●)  $2.30 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (○) และ  $3.45 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (Δ) ปริมาณ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate  $4.10 \times 10^{-4}$  -  $20.41 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 4.20 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากจุดที่ เส้นกราฟตัดกันอ่านค่า  $K_1$  เท่ากับ  $5.38 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร



รูปที่ 20

รูปที่ 21 แสดงการพลอตแบบ Dixon Plot โดยพลอตระหว่างความเข้มข้นของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine กับ ส่วนกลับของอัตราความเร็วเริ่มต้น สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.58 0.48 โมล/ลิตร แมกนีเซียม-คลอไรด์  $5 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร DHPP ประมาณ  $6.64 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร 2-เมอร์เคพโตเอทานอล 0.40 โมล/ลิตร คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิก  $5.18 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (●)  $8.05 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (○) และ  $11.50 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร (Δ) 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine  $1.90 \times 10^{-7}$  -  $9.50 \times 10^{-7}$  โมล/ลิตร สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีน 4.20 ไมโครกรัม อินคิวเบตที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากจุดที่เส้นกราฟตัดกัน อ่านค่า  $K_i$  เท่ากับ  $7.50 \times 10^{-6}$  โมล/ลิตร



สรุป 21

ตารางที่ 10 แสดงผลการเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่าง  $\frac{K_i}{K_m}$  กับ  $\left[\frac{I}{S}\right]_{0.5}$  ที่ได้จากการทดลองดูความล้มเหลวของเซลล์โพนามาไมด์ในการยับยั้งโตไฮโดรฟเทอโรเอท ซินเทส ที่สกัดจาก E.coli

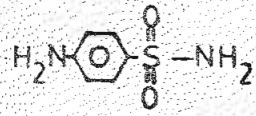
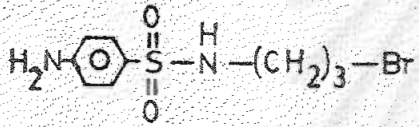
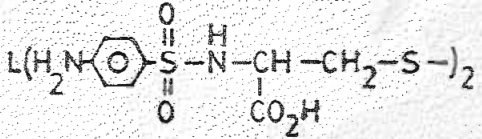
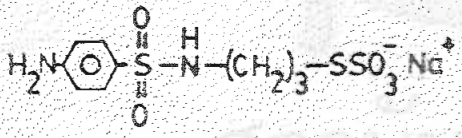
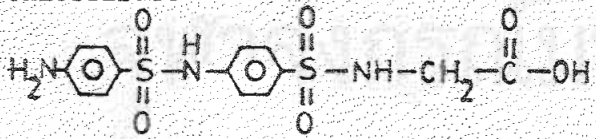
| Inhibitor   | $\frac{K_i}{K_m}$ | $\left[\frac{I}{S}\right]_{0.5}$ |
|---|-------------------|----------------------------------|
| Sulfanilamide   | 15.05             | 18.70                            |
| p-Aminobenzenesulfonamidopropyl bromide                 | 26.25             | —*                               |
| N-N'-Bis(sulfanilyl)-L-cystine                          | 12.25             | 28.04                            |
| Sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate      | 18.83             | 29.13                            |
| 4-(4-Aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine | 0.26              | 0.24                             |

\* ค่า  $\left[\frac{I}{S}\right]_{0.5}$  ไม่ได้เนื่องจากค่า  $I_{50}$  ของ p-Aminobenzenesulfonamidopropyl bromide หาไม่ได้จากการทดลอง



ตารางที่ 11 เป็นตารางสรุปผลการทดลองความสามารถของซิลโฟนาไมด์ใน  
การยับยั้งไดไฮโดรพเทอโรเอท ซินเทส ใน crude enzyme และสารละลายเอนไซม์  
ที่ได้จากแอฟฟิดีโครมาโตกราฟี

ตารางที่ 11 สรุปผลการทดลองผลของซิลโฟนาไมด์ที่มีต่อเอนไซม์ไตไฮโดรฟเทอโรเอท ซินเทส และค่าละลายเอนไซม์ที่ได้จากแอฟฟิดโครมาโตกราฟี

| Inhibitor   | $I_{50}$<br>(mol/l)   | $K_i$<br>(mol/l)      |
|---|-----------------------|-----------------------|
| <br>Sulfanilamide  | $2.15 \times 10^{-3}$ | $4.30 \times 10^{-4}$ |
| <br>p-Aminobenzenesulfonamidopropyl bromide                    | -                     | $7.50 \times 10^{-4}$ |
| <br>N,N'-Bis(sulfanilyl)-L-cystine                           | $3.23 \times 10^{-3}$ | $3.50 \times 10^{-4}$ |
| <br>Sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate       | $3.35 \times 10^{-3}$ | $5.38 \times 10^{-4}$ |
| <br>4-(4-Aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamido glycine | $2.70 \times 10^{-5}$ | $7.50 \times 10^{-6}$ |

## วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การหาปริมาณ DHPP ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการโดยอาศัยความสามารถในการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร (ข้อ 3.8.4) เป็นการหาค่าโดยประมาณของ DHPP เนื่องจาก DPP ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการไม่บริสุทธิ์ แม้ว่าจะทดลองด้วย paper chromatography เพื่อเลือกเอาแฟรคชันที่แสดงจุดเดียวบน paper แล้วนำมาวิเคราะห์ก็ตามยังมีสารประกอบอื่น ๆ ปะปนอยู่ เช่นสารประกอบ monophosphate (Blakley, 1969) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ด้วยไฮโดรเจนไดโอรโอโนไทด์เช่นกัน แต่ไม่เป็นสับสเตรทของไดไฮโดรพเทอโรเรอท เป็นต้น

การหาจำนวนเซลล์ของ E.coli โดยการนับจำนวนโคโลนีที่ก่อกำเนิดบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเพาะเชื้อแอสแตอริ เพื่อที่จะได้ทราบและกำหนดจำนวนแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองให้เท่ากันทุกครั้ง และปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองถ้ามากเกินไปก็จะทำให้ไม่เห็นผลของตัวยับยั้งที่มีต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือเห็นผลไม่ชัดเจน

การที่เลือกซิลโฟนาไมด์ 5 ชนิด คือ sulfanilamide, N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine, sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate, 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine และ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide มาใช้ในการศึกษาเนื่องจาก sulfanilamide มีศกษาการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเรอท อินเทลไดดี โดยทำการยับยั้งแบบแข่งขันในการทดลองนี้จึงใช้ sulfanilamide เป็นตัวเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กับซิลโฟนาไมด์อีก 4 ชนิด เราเลือกใช้ N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine และ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate เพราะสันนิษฐานว่าซิลโฟนาไมด์ทั้ง 2 ชนิดนี้อาจทำหน้าที่เป็น irreversible inhibitor (Foye และคณะ, 1982) และ Thijsen (1977) รายงานว่ากลุ่มของคาร์บอนซิลใน side chain ของกลุ่มที่มาต่อกับไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 แสดงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรพเทอโรเรอท อินเทล ไดดี ซึ่งมิอยู่ในโมเลกุลของ N,N'-

bis(sulfanilyl)-L-cystine และ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzene-sulfonamidoglycine นอกจากนั้นคาร์บอนิลกรุปยังช่วยทำให้ลาร์มีโพลาริตี (polarity) มากขึ้น ซึ่งจะทำให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น การเลือกใช้ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide เพื่อจะดูว่า hydrophobic part ของโบรโมโพรพิลกรุปมีส่วนช่วยเพิ่มความ สามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือไม่

ในการหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) ของ แบคทีเรีย ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอก และในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคส ซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด ที่ทำการทดลอง sulfanilamide เป็นตัวยับยั้งที่ดีที่สุด ค่า MIC ของ sulfanilamide ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอก เท่ากับ  $4.36 \times 10^{-2}$  โมล/ลิตร ในขณะที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคสจะเท่ากับ  $1.31 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร จะเห็นว่ใช้ปริมาณ sulfanilamide น้อยลง 33 เท่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลบี-บรอก มีกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคส ประมาณ 7 เท่า ซึ่งกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเป็นสับสเตรทตัวหนึ่งของไดไฮโดรพเทอโร เอท ซิมเทส จะเป็นตัวขัดขวางการทำงานของซัลโฟนาไมด์ เนื่องจากการยับยั้งนี้เป็นแบบ แข่งขัน (competitive inhibition) จึงต้องใช้ปริมาณซัลโฟนาไมด์มากขึ้น

แม้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคสจะหาปริมาณกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกได้ แต่ในปฏิกิริยาการเกิดสีของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกนี้ไม่จำเพาะต่อกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเพียงตัวเดียว สารที่เป็น primary aromatic amine อื่น ๆ ก็สามารถเกิดสีกับปฏิกิริยานี้ได้ (Toro และ Ackermann, 1975) ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคสตามสูตรอาหาร (ข้อ 3.1.2) จะประกอบด้วยกลูโคส เกลือของฟอสเฟตและซัลเฟต โซเดียมซีเตรท และแคลอะมิโนแอซิดที่ปราศจากวิตามิน ซึ่งไม่ควรมึกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกปะปนอยู่

Thijssen (1974) รายงานค่า MIC ของ sulfanilamide ใน E.coli สายพันธุ์ B ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sauton เท่ากับ  $1.28 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร ซึ่งจากการทดลองเห็นว่าค่า MIC ของ E.coli สายพันธุ์ K<sub>12</sub> ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำกลูโคส เท่ากับ  $1.30 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร ซึ่งต่างจากที่ Thijssen ได้รายงานไว้ประมาณ 10 เท่า อาจเนื่องมาจากว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยง E.coli ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลองความขึ้นและปริมาณออกซิเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งแตกต่างกันได้ ในการทดลอง

จากค่า MIC ที่ได้จากการทดลองตัวบัพยั้งที่ตรงลงมาจาก sulfanilamide ในการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียคือ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide แม้ว่าค่า MIC ของสารชนิดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลซี-บรอกไมโต้ เพราะความสามารถในการละลายน้ำมีจำกัด และการที่มีกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกในอาหารเลี้ยงเชื้อแอลซี-บรอกทำให้ต้องเพิ่มปริมาณของ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าเกลือโคส เราสามารถหาค่า MIC ของ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ได้เท่ากับ  $2.91 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร

ส่วนซัลโฟนาไมด์อีก 3 ชนิด หาค่า MIC ไม่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด เนื่องจากความสามารถในการละลายมีจำกัด ดังที่กล่าวมาแล้วในผลการทดลอง (ข้อ 4.2) ซัลโฟนาไมด์ทั้ง 3 ชนิด นั้นคือ N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine, sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate และ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine สารพวกนี้ละลายน้ำได้ยากอาจเนื่องมาจากขนาดของโมเลกุลซึ่งมีขนาดใหญ่ เมื่อเทียบกับ sulfanilamide แม้ว่าจะมีรูปแบบชนิดช่วยในการละลายน้ำให้ดีขึ้นก็ตาม เช่น N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine และ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine จะมีรูปของคาร์บอซิล ส่วน sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate โยเดี่ยวจะแตกตัวทำให้เกิดไรโอซิลเพอริออน ซึ่งกรุปเหล่านี้จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำทำให้การละลายดีขึ้น

การเลือกใช้ความเข้มข้นของซัลโฟนาไมด์ในการทดลองดูความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ E. coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าเกลือโคสเท่ากับ  $9.00 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่มากที่สุดที่สามารถจะเตรียมสารละลายซัลโฟนาไมด์ได้ทั้ง 5 ชนิด พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตใน E. coli ของสารทั้ง 4 ชนิด ต่ำกว่า sulfanilamide มาก ประการแรกอาจเนื่องมาจากว่าขนาดของโมเลกุลทำให้การผ่านเข้าผนังเซลล์ของ E. coli ส่วากขึ้น ประการที่สอง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าเกลือโคสเท่ากับ 6.9 ซัลโฟนาไมด์ทั้ง 3 ชนิด คือ N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine, sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate และ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamido-

glycine จะมีประจุเป็นลบ ซึ่งอาจทำให้การผ่านผนังเซลล์ลำบากขึ้น

Reddy และคณะ (1973) รายงานว่า sulfadiazine ผ่านเข้าเซลล์ของ *E. coli* ด้วยวิธีการลำเลียงแบบแอกทีฟ แต่ Roland และคณะ (1979) รายงานว่า sulfanilamide sulfamethoxazole และ sulfathiazole ผ่านเข้าเซลล์ของ *E. coli* โดยวิธีการแพร่อย่างธรรมดา ส่วน Benedetti และ Rastelli (1981) รายงานว่า มีขบวนการส่งผ่านบางอย่างของผนังเซลล์ทำให้ซิลโฟนาไมด์ไม่สามารถจะผ่านเข้าเซลล์ได้อย่างอิสระ แสดงว่าโครงสร้างทางเคมีของซิลโฟนาไมด์มีความสำคัญในขบวนการซึมผ่านผนังเซลล์

การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีแอฟฟิวดิโครมาโตกราฟีเป็นการแยกโดยใช้ความจำเพาะของการสับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวรับยั้งคือ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine ในการทดลองนี้ได้นำ sepharose 4B ที่แอกติเวทด้วยไอออนเจนโบรไมด์ต่อเข้ากับ 1,2-อีล (3-อะมิโนโพรพิลอะมิโน)อีเทน ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) ซึ่งใช้เป็น spacer arm จะทำหน้าที่ให้ตัวรับยั้งสามารถสับกับเอนไซม์ได้ดียิ่งขึ้น

เมื่อนำ crude enzyme ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อิมัตร์ 20 - 60% มาผ่านคอลัมน์เยลคอสัมด้วยบัฟเฟอร์ I DHPP ในบัฟเฟอร์ I อาจละลายเข้ากับเอนไซม์ก่อน ทำให้เอนไซม์สามารถสับกับ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine  $\text{Mg}^{2+}$  ได้อนหนักหน้าที่ช่วยให้การสับระหว่างเอนไซม์กับตัวรับยั้งดีขึ้น (Swedberg และคณะ, 1979) ไดโททรีอิกอลและ 2-เมอร์เคพโตเอทานอลจะช่วยรักษาสภาพรีดิวซ์ของ DHPP ไม่ให้ถูกออกซิไดส์ได้ง่าย เมื่อโปรตีนอื่น ๆ ถูกชะออกไปจนหมดเปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็นบัฟเฟอร์ II ซึ่งไม่มี DHPP ไดโอโทรฟเทอโรเอทซินเทส ก็จะถูกชะออกจากคอลัมน์ (รูปที่ 8) โซเดียมคลอไรด์ (0.5 โมล/ลิตร) ที่มีในบัฟเฟอร์ I และบัฟเฟอร์ II ใส่เพื่อเพิ่ม ionic strength สำหรับบัฟเฟอร์ I ล้างโปรตีนที่ไม่ต้องการหลุดออกมาได้ดีขึ้น

เมื่อนำมาทดสอบแอกทีวิตีของเอนไซม์และหาปริมาณโปรตีน หาค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์จากแอฟฟิวดิโครมาตัมได้มากกว่าเอนไซม์ใน eil-free extract 209 เท่า และแอฟฟิวดิโครมาตัมมีปริมาณตัวรับยั้งที่สับอยู่กับเอนไซม์เท่ากับ 6.0 โมโครโมลของซิลเฟอร์/มิลลิลิตรของ settled gel เมื่อเทียบกับ Suckling และคณะ (1972) ได้ทดลองแยก

ไดไฮโดรพเทอโรเอท ซีนเทส จาก *E. coli* โดยใช้แอฟฟิติดีโครมาโตกราฟีเช่นกัน โดยใช้ 0.5- (3-อะมิโนโพรพิล) เอมีน  $[(NH_2CH_2CH_2CH_2)_2NH]$  เป็น spacer arm ได้รับความบริสุทธิ์ของ เอนไซม์เพิ่มขึ้น 180 เท่า และมีปริมาณของ 4-(4-aminobenzene sulfonamido) benzenesulfonamidoglycine จับอยู่ที่เฉลี่ยเท่ากับ 1.80 ไมโครกรัม ของซีลเฟอร์/มิลลิลิตรของ settled gel การที่มีปริมาณตัวจับยิ่งในเฉลี่ยที่ทำการทดลองมากกว่าและ spacer arm ที่มีความยาวของ chain แตกต่างกัน อาจจะช่วยทำให้การแยกเอนไซม์ทำได้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

ไดไฮโดรพเทอโรเอท ซีนเทส ที่ได้จากแอฟฟิติดีโครมาโตกราฟี เมื่อนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย diaflo ultrafiltration แบ่งสารละลายเอนไซม์ส่วนหนึ่งมาทำอะโครลาไมด์-4 เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแท่ง (รูปที่ 10) เปรียบเทียบกับ crude enzyme ที่ได้จากตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20 - 60% จะเห็นว่าจากการแยกเอนไซม์โดยใช้แอฟฟิติดีโครมาโตกราฟีเพียงอย่างเดียวก็สามารถลดแถบของโปรตีนที่มีอยู่มากมายใน crude enzyme ให้เหลือเพียง 7 แถบ ของโปรตีน ซึ่งเห็นแถบโปรตีนได้ชัด 3 แถบ และเป็นแถบโปรตีนบาง ๆ 4 แถบ ซึ่งจากการแยกเอนไซม์ด้วยแอฟฟิติดีโครมาโตกราฟีโดยทั่วไป สารละลายเอนไซม์ที่ได้ควรจะมียูนิต์เพียงยูนิตเดียวแต่ก็อาจเป็นไปได้ว่า ในการทดลองนี้ได้โปรตีน 7 แถบ เป็นเพราะว่ามีการจับของโปรตีนชนิดอื่น อยู่ในคอลัมน์แบบไม่จำเพาะกับ เจล (non-specific binding)

สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการแอฟฟิติดีโครมาโตกราฟี เมื่อนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย diaflo ultrafiltration อีกส่วนหนึ่ง เมื่อนำมาทำการศึกษาค่า  $K_m$  ของกรตพารา-อะมิโนเบนโซอิก โดยให้ DHPP ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีอยู่มากเกินพอ (excess) ซึ่งทราบได้จากการทดลองจะเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของ DHPP ต่าง ๆ กัน และใช้ความเข้มข้นของสารละลายอื่น ๆ ในปฏิกิริยาคงที่ จนกระทั่งแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นมีค่าคงที่ ความเข้มข้นของ DHPP ที่ใช้ในการทดลองจะอยู่ในช่วงของความเข้มข้นของ DHPP ที่ให้แอกติวิตีของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นมีค่าคงที่ จากการทดลองโดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์  $K_{12}$  ได้ค่า  $K_m$  เท่ากับ  $2.26 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร เมื่อเทียบกับที่ Richey และ Brown (1969) ใช้ *E. coli* สายพันธุ์ B พบว่า  $K_m$  ของกรตพารา-อะมิโนเบนโซอิกเท่ากับ  $2.50 \times 10^{-6}$  โมล/ลิตร และโดย Swedberg และคณะ (1979) หารค่า  $K_m$  ของกรตพารา-อะมิโนเบนโซอิกได้เท่ากับ

$5.10 \times 10^{-6}$  โมล/ลิตร ใน E.coli สายพันธุ์ C-167 จะเห็นว่าค่า  $K_m$  ที่ได้จาก E.coli สายพันธุ์  $K_{12}$  มากกว่าค่า  $K_m$  ที่หาได้โดย Richey และ Brown ประมาณ 11 เท่า และมากกว่าค่า  $K_m$  ที่หาได้โดย Swedberg และคณะ (1979) ประมาณ 6 เท่า ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ของ E.coli อาจจะมีผลทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการจับกับสับสเตรทได้แตกต่างกัน และเนื่องจากความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกันโดย Richey และ Brown, Swedberg และคณะ ใช้วิธีการแยกเอนไซม์ด้วย sephadex G-100 และ DEAE-cellulose ได้ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ  $10^4$  เท่า ซึ่งต่ำกว่าที่ได้จากการทดลองนี้ประมาณครึ่งหนึ่ง นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการทดลองก็ต่างกัน เช่น อุณหภูมิ, pH และเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบตเป็นต้น โดยในการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส pH 8.58 และเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบตเท่ากับ 10 นาที Richey และ Brown ใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส pH 8.6 และเวลาในการอินคิวเบตเท่ากับ 60 นาที ส่วน Swedberg และคณะ ใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส pH 8.0 และเวลาในการอินคิวเบต 30 - 60 นาที ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่า เราได้ทำการทดลองหาอุณหภูมิ และ pH มาแล้วว่าเป็นสภาวะของการทดลองที่จะทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์มีสูงสุด และเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบตก็เป็นสัดส่วนโดยตรงกับแอกติวิตีของเอนไซม์ ซึ่งเราพบว่าเมื่อใช้เวลาในการอินคิวเบตเกิน 30 นาที แอกติวิตีของเอนไซม์จะไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลาอีกต่อไป

การหาค่า  $I_{50}$  ของซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด ที่มีต่อไดไฮโดรเทอโรเอท ซินเทส ใน crude enzyme ที่ได้จากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20 - 60% พบว่า 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine จะมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไดไฮโดรเทอโรเอท ซินเทสได้ดีที่สุด ( $2.70 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร) รองลงมาจะเป็น sulfanilamide ( $2.15 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร) N,N'-bis(sulfanylyl)-L-cystine ( $3.23 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร) และ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate ( $3.35 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร) ตามลำดับ ส่วน p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ไม่สามารถจะหาค่า  $I_{50}$  ได้ เพราะหาความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองหาค่า  $I_{50}$  เท่ากับ  $1.60 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ประมาณ 25% เท่านั้น เมื่อเทียบกับ Foye และคณะ (1982) ได้ทำการทดลองซัลโฟนาไมด์เหล่านี้ ยกเว้น 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine ในการหา  $I_{50}$  ของ Neisseria



gonorrhoeae พบว่า sulfanilamide จะมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ดีดีทีที่ต่ำสุด ( $5.90 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร) รองลงมาคือ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate ( $1.08 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร) , N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine ( $1.60 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร) และ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ( $2.50 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดีดีทีต่ำสุด จะเห็นว่าลำดับของความสามารถของซิลโฟนาไมด์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีแนวโน้มใกล้เคียงกัน โดยที่สภาวะที่ใช้ในการทดลองเช่น อุณหภูมิ pH และเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบตก็ใกล้เคียงกัน แต่จุดยึดคนละชนิดและความเข้มข้นของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกที่ใช้ในการทดลองต่างกัน จึงอาจทำให้ค่า  $I_{50}$  แตกต่างกันได้

ค่า  $I_{50}$  ของ sulfanilamide ที่หาได้ในการทดลองเมื่อคิดเป็นค่า inhibition index  $\left[ \frac{I}{S} \right] / [S]_{0.5}$  เท่ากับ 18.7 เมื่อเทียบกับ inhibition index ที่หาได้โดย Thijssen (1974) เท่ากับ 10 ค่าที่หาได้ต่างกัน อาจเป็นเพราะ pH ที่ใช้ในการทดลองต่างกัน Thijssen ใช้ pH 8.0 ในการทดลองและสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาต่างกัน กล่าวคือ Thijssen ใช้ ATP, โซเดียมแอสคอร์เบต และ 2-อะมิโน-4-ไฮดรอกซี-6-ไฮดรอกซีเมทิล-7, 8-ไดไฮโดรพเทอริดีนแทน DHPP

จากการหาค่า  $K_i$  โดยใช้ Dixon plot จะเห็นว่า การยับยั้งของซิลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด เป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) โดยเมื่อพลอตส่วนกลับของอัตราความเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา ( $1/v$ ) กับความเข้มข้นของซิลโฟนาไมด์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ คาร์บอน-14-กรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกต่างกัน (รูปที่ 17 - 21) เส้นกราฟที่ได้จะตัดที่จุดเดียวกัน ซึ่งเมื่อลากจากจุดตัดลงมาค่าความเข้มข้นของซิลโฟนาไมด์ที่จุดนั้นจะเป็นค่า  $K_i$  (Dixon และ Webb, 1964)

ในการหาค่า  $K_i$  ของซิลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด ที่มีต่อไดไฮโดรพเทอโรเอทีนินกล่าว พบว่า 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine เป็นตัวยับยั้งที่ดีที่ต่ำสุดเช่นเดียวกับในการหา  $I_{50}$  คือมีค่า  $K_i$  เท่ากับ  $7.50 \times 10^{-6}$  โมล/ลิตร ลำดับที่ยับยั้งดีรองลงมาคือ N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine ( $K_i = 3.50 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร) sulfanilamide ( $K_i = 4.30 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร) sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate ( $K_i = 5.38 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร) และ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ( $K_i = 7.50 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร) เป็นตัวยับยั้งที่ต่ำสุด

จากการทดลองค่า  $K_i$  ของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzene-sulfonamidoglycine เท่ากับ  $7.50 \times 10^{-6}$  โมล/ลิตร) เทียบกับค่า  $K_i$  ที่รายงานโดย Suckling และคณะ (1977) เท่ากับ  $8.0 \times 10^{-7}$  โมล/ลิตร ซึ่งต่างกันประมาณ 9 เท่า อาจเนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการทดลองต่างกันโดยในการทดลองนี้ใช้ pH 8.58 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบต 10 นาที Suckling และคณะ ใช้ pH ในการทดลองเท่ากับ 8.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบต 60 นาที

จากการทดลองหาค่า  $I_{50}$  และ  $K_i$  ของซัลโฟนาไมด์ทั้ง 4 ชนิด จะเห็นว่า

1. ค่า  $I_{50}$  และ  $K_i$  มีความสัมพันธ์ต่อกันโดย เมื่อออกจากค่า  $I_{50}$  และ  $K_i$  ของซัลโฟนาไมด์ (ตารางที่ 11) พบว่า 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzene-sulfonamidoglycine จะมีค่าน้อยที่สุด รองลงมาเป็น N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine และ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate ตามลำดับ จะเห็นว่าลำดับของความสามารถในการยับยั้งของสารทั้ง 3 ชนิด ที่มีต่อการทำงานของไดไฮโดรเพนโทโรเอท ซินเทส เหมือนกัน ซึ่งแสดงว่าใน crude enzyme อาจจะมีสิ่งอื่นที่จะมาขัดขวางและเปลี่ยนแปลงเอนไซม์การยับยั้ง และเมื่อคิดอัตราส่วนของ  $\frac{K_i}{K_m}$  ที่ได้จาก การทดลองหาค่า  $K_i$  และ  $K_m$  เปรียบเทียบกับ  $\left[\frac{I}{S}\right]_{0.5}$  (ตารางที่ 10) ซึ่งตามสมการที่แสดงในวิธีการทดลองข้อ 3.15 ควรจะเท่ากัน จะได้ว่าค่าอัตราส่วนที่คำนวณได้ของ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzene-sulfonamidoglycine ใกล้เคียงกันมาก แสดงว่าวิธีการทดลองหาค่า  $K_i$ ,  $K_m$  และ  $I_{50}$  นั้นควรจะถูกต้อง ส่วนค่าอัตราส่วนของ  $\frac{K_i}{K_m}$  กับ  $\left[\frac{I}{S}\right]_{0.5}$  ของ sulfanilamide, N,N'-bis(sulfanilyl)-L-cystine และ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate ต่างกัน 1.24, 2.29 และ 1.55 เท่าตามลำดับ แต่ค่าอัตราส่วนของ  $\frac{K_i}{K_m}$  น่าจะเชื่อถือได้มากกว่าค่าอัตราส่วน  $\left[\frac{I}{S}\right]_{0.5}$  เพราะ สารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการหาค่า  $K_i$  และ  $K_m$  มีความบริสุทธิ์มากกว่าสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการหาค่า  $I_{50}$

2. ขนาดของโมเลกุลของซัลโฟนาไมด์ไม่มีบทบาทสำคัญอย่างเห็นได้ชัดในการกำหนดความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิดนี้

3. โดยการพิจารณาจากโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลของซัลโฟนาไมด์ พบว่า 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine มีกลุ่มของ benzenesulfonamido 2 กลุ่ม และกลุ่มของคาร์บอกซิล 1 กลุ่ม ซึ่งจะแสดงประจุที่ pH ที่ทำการทดลอง (pH 8.58) อาจจะเป็นไปได้ว่ากลุ่มทั้ง 2 ชนิด ทำให้สารมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สูง

4.  $N,N'$ -bis(sulfanilyl)-L-cystine และ sodium-p-aminobenzenesulfonamidopropyl thiosulfate จะจับกับตำแหน่งรับของเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive inhibition) ซึ่งซัลโฟนาไมด์อีก 2 ชนิด คือ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide และ 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine ก็จับกับเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive inhibition) เช่นกัน

5. การเพิ่มโบรโมโพรพิลกรุปเข้าไปในโมเลกุลของซัลโฟนาไมด์ เช่นใน p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide ไม่ทำให้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ sulfanilamide แสดงว่า hydrophobic part ของโบรโมโพรพิลกรุปไม่ช่วยในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ให้ดีขึ้น

งานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการพิจารณาโครงสร้างที่เหมาะสมของซัลโฟนาไมด์ที่จะนำมาใช้ในการยับยั้งไดไฮโดรพเทอโรเรอเทอซินเทส ทั้งใน whole cell system และ cell-free system ให้มีความสามารถในการยับยั้งสูงขึ้น โดยการพิจารณาลักษณะและขนาดของ R กลุ่มที่เหมาะสมที่จะนำมาแทนที่ไฮโดรเจนบนตำแหน่งของไฮโดรเจนตำแหน่งที่ 1 ของซัลโฟนาไมด์

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อเลี้ยง E.coli ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าเกลือ ค่า MIC ของ sulfanilamide และ p-aminobenzenesulfonamidopropyl bromide เท่ากับ  $1.31 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร และ  $2.91 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร ตามลำดับ

2. จากการทดลองศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ E.coli เมื่อใช้ซัลโฟนาไมด์ทั้ง 5 ชนิด ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ  $9.00 \times 10^{-4}$  โมล/ลิตร พบว่า sulfanilamide เป็นตัวยับยั้งได้ดีที่สุด
3. จากการทดลองใช้ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและ เอนไซม์ที่แยกได้จากแอฟฟิดีคอลลัมน์ พบว่า 4-(4-aminobenzenesulfonamido) benzenesulfonamidoglycine มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด
4. การแยกเอนไซม์โดยวิธีแอฟฟิดีโครมาโตกราฟีได้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 209 เท่า และได้แถบของโปรตีนที่เห็นได้ชัด 3 แถบ และแถบโปรตีนบาง ๆ 4 แถบ ในการทำอะโครลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
5. ในการศึกษาคุณสมบัติของ เอนไซม์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 45 - 46 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 8.58  $K_m$  ของกรดพารา-อะมิโนเบนโซอิกเท่ากับ  $2.86 \times 10^{-5}$  โมล/ลิตร

เอกสารอ้างอิง

- Baker, B.R. in Design of Active-Site-Directed Irreversible Enzyme Inhibitor, John Wiley & Sons, Inc., 1967 : 202-203.
- Benedetti, P.G. and Rastelli, A. "A Structure Activity Relationships in Dihydropteroate Synthase Inhibition by Sulfanilamides : Comparision with the Antibacterial Activity." Journal of Medicinal Chemistry. 24(4), (1981) : 454 - 457.
- Bell, P.H., and Roblin, R.O. "Studies in Chemotherapy. VII. A Theory of the Relation of Structure to Activity of Sulfanilamide Type Compounds." Journal of American Chemical Society. 64(1942) : 2905 - 2917.
- Blakley, R.L. in The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1969.
- Back, L., Miller, G.H., Schaper, K.J. and Seydel, J.K. "Sulfonamide Structure-Activity Relationships in a Cell-Free System : 2) Proof for the Formation of a Sulfonamide-Containing Folate Analog." Journal of Medicinal Chemistry. 17(1), (1974) : 23-28.
- Brown, G.M., Weisman, R.A. and Molnar, D.A. "The Biosynthesis of Folic Acid : I) Substrate and Cofactor Requirements for Enzymatic Synthesis by Cell-Free Extracts of Escherichia coli." The Journal of Biological Chemistry. 236(9), (1961) : 2534 - 3543.
- Brown, G.M. "The Biosynthesis of Pteridines." Advances in Enzymology. 35(1971) : 41.

- Brueckner, A.H. "Sulfanilamide Activity As Influenced by Variation in pH of Culture Media." Yale Journal of Biology and Medicine. 15(1943) : 813.
- Cook, A.M. "Comparative Studies of Methods of Evaluating Antibacterial Substances : Part I Evaluation of Bacteriostatic Action." Journal of Pharmacy Pharmacology, 6(1954) : 629-637.
- Cowles, P.B. Yale Journal of Biology and Medicine. 14(1942) : 599 cited by Suttimool, W. "Possible Mechanism of Action and Inhibition by Sulfonamides of Dihydropteroate Synthase from Sulfanilamide-Resistant Neisseria Gonorrhoeae." Ph.D. Thesis, Massachusetts College of Pharmacy and Allied Health Sciences, (1979) : 12.
- Cuatrecasas, P. "Protein Purification by Affinity Chromatography." Journal of Biological Chemistry. 245(1970) : 3059-3065.
- Davis, B.J. "Disc Electrophoresis II : Method and Application to Human Serum Proteins." Annals of the New York Academy of Sciences. 121(1964) : 404 - 427.
- Dieffenbacher, A., Mondelli, R. and Philipsborn, W.v. "Protonenresonanzspektren van Pteridinen V(1) 2-Amino-4-oxo-3,4-dihydropteridine." Helvetica Chimica Acta. 49(1966) : 1355.
- Dixon, M. and Webb, E.C. in Enzyme, Academic Press, New York (1964): 328 - 329.
- Ferone, R. "The Enzymic Synthesis of Dihydropteroate and Dihydrofolate by Plasmodium berghei." Journal of Protozoology. 20(3), (1973) : 459-464.

- Ferone, R. and Webb, S.R. "Kinetic Studies of Escherichia coli Dihydropteroate Synthetase." Chemistry and Biology of Pteridine. Pfleiderer, W., Ed., de Gruyter, Berlin, (1975) : 61 - 69.
- Forrest, H.S. and Walker, J. "The Effect of Hydrazine on the Condensation of Certain  $\alpha$  - Ketols and Related Substances with 2 : 4 : 5-Tri amino-6-hydroxypyrimidine." Journal of the Chemical Society, (1949) : 2077-2082.
- Foye W.O., Kauffman, J.M. and Suttimool, W. "Synthesis of  $\omega$  -(4 -Aminophenylsulfonamido) alkyl Disulfides and Thiosulfates and their Activity against Dihydropteroate Synthase from Sulfanilamide-Resistant Neisseria gonorrhoeae." The Journal of Pharmaceutical Sciences, 71(7), (1982) : 799-802.
- Friedklin, M., Crawford, E.J. and Misra, D. "Reduction of Folate Derivatives with Dithionite in Mercaptoethanol." Federation Proceedings. 21(1962) : 176.
- Futterman, S. "Enzymatic Reduction of Folic Acid and Dihydropteroic Acid." The Journal of Biochemical Chemistry. 228(1957) : 1031-1038.
- Garrett, E.R. and Wright, O.K. "Kinetic and Mechanisms of Action of Drugs on Microorganism VII; Quantitative Adherence of Sulfonamide Action on Microbial Growth to a Receptor-Site Model." The Journal of Pharmaceutical Science. 56(12), 1967) : 1576-1584.
- Ho, R.I., Corman, L. and Foye, W.O. "Synthesis and Biological Evaluation of 2-Amino-4-Hydroxy-6-Hydroxymethylpteridine Pyrophosphate." Journal of Pharmaceutical Sciences. 63(1974) : 2077-2082, a.

- Ho, R.I., Corman, L. Morse, S.A. and Artenstein, M.S. "Alteration in Dihydropteroate Synthase in Cell-Free Extracts of Sulfanilamide-Resistant Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae." Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 5(4), (1974) : 388 - 392, b.
- Iwai, K. and Kabashi, M. "The Biosynthesis of Folic Acid and Pteridine Cofactor(s) and Its Regulation." Chemistry and Biology of Pteridines, Pfeleiderer, W., Ed., de Gruyter, Berlin, (1975) : 341 - 359.
- Iwai, K. and Okinaka, O. "Radioassay for Dihydropteroate-Synthesizing Enzyme Activity." Methods in Enzymology. 66(1980) : 560 - 564.
- Jaenicke, L. and Chan, P.C. Angew.Chem. 72(1960) : 752 cited by Suttimool, W. "Possible Mechanism of Action and Inhibition by Sulfonamides of Dihydropteroate Synthase from Sulfanilamide-Resistant Neisseria Gonorrhoeae." Ph.D. Thesis, Massachusetts College of Pharmacy and Allied Health Sciences, Boston, (1979) : 8.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." Journal of Biological Chemistry. 193(1951) : 265 - 275.
- Luria, S.E., Adams, J.N. and Teng, R.C. "Transduction of Lactose Utilizing Ability among Strains of Escherichia coli and Shigella dysenteriae and the Properties of the Transducing Phage Particles." Virology. 12(1960) : 348 - 390.
- McCullough, J.L. and Maren, T.H. "Dihydropteroate Synthetase from Escherichia coli by Sulfones and Sulfonamides." Antimicro-



bial Agent and Chemotherapy. 3(1974) : 665-669, a.

McCullough, J.L. and Maren, T.H. "Dihydropteroate Synthetase from Plasmodium berghei : Isolation, Properties and Inhibition by Dapsone and Sulfadiazine." Molecular Pharmacology. 10 (1974) : 140-145, b.

Nagai, M. "Studies on Sepiapterin Reductase : Further Characterization of the Reaction Product." Archives of Biochemistry and Biophysics. 126(1968) : 426 - 435.

Okinaka, O. and Iwai, K. "A Radioassay for Dihydropteroate-Synthesizing Enzyme Activity." Analytical Biochemistry. 31(1969) : 174.

Ortiz, P.J. and Hotchkiss, R.D. "The Enzymatic Synthesis of Dihydrofolate and Dihydropteroate in Cell-Free Preparation from Wild-Type and Sulfonamide-Resistant Pneumococcus." Biochemistry. 5(1) , (1966) : 67-73.

Ortiz, P.J. "Dihydrofolate and Dihydropteroate Synthesis by Partially Purified Enzymes from Wild-Type and Sulfonamide-Resistant Pneumococcus." Biochemistry 9(2), (1970) : 355-361.

Reedy, M.S., Williams, F.D. and Reinhold, G.W. Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 4(1973) : 254 - 258 cited by Roland, S., Ferone, R., Harvey, R.J., Styles, V.L. and Morrison, R.W. "The Characteristics and Significance of Sulfonamide as Substrates for Escherichia coli Dihydropteroate Synthase." The Journal of Biological Chemistry. 254(20), (1979) : 10337 - 10345.

- Richey, D.P. and Brown, G.M. "The Biosynthesis of Folic Acid : IX Purification and Properties of The Enzymes Required for the Formation of Dihydropterotic Acid." The Journal of Biological Chemistry. 244(6), (1969) : 1582-1592.
- Roblin, R.O. and Bell, P.H. "The Relation of Structure to Activity of Sulfanilamide Type Compounds." Annals New York Academy of Science. 44(1943) : 449.
- Roland, S., Ferone, R., Harvey, R.J., Styles, V.L. and Morrison, R.W. "The Characteristics and Significance of Sulphonamide as Substrates for Escherichia coli Dihydropterotic Synthase." The Journal of Biological Chemistry. 254(20), (1979) : 10337-10345.
- Shiota, T., Disraely, M.N. and McCann, M.P. "The Enzymatic Synthesis of Folate-like Compound from Hydroxymethyldihydropteridine Pyrophosphate." The Journal of Biological Chemistry. 239(7), (1964): 2259-2266.
- Shiota, T., Baugh, C.M., Jackson, R. and Dillard, R. "The Enzymatic Synthesis of Hydroxymethyldihydropteridine Pyrophosphate and Dihydrofolate." Biochemistry. 8(12), (1969) : 5022 - 5028.
- Steers, E. Jr. Cuatrecasas, P. and Pollard, H.B. "The Purification of  $\beta$ -Galactosidase from Escherichia coli Affinity Chromatography." The Journal of Biological Chemistry. 16(1) , (1971) : 196 - 200.
- Strouts, C.R.N., Wilson, H.N., Parry-Jones, R.T., in Chemical Analysis, Vol, III, Oxford University Press, London, 1962,

- Suckling, C.J., Sweeney, J.R. and Wood, H.C.S. "Dihydropteroate Synthase : Purification by Affinity Chromatography and Mechanism of Action." Journal of Chemical Society Perkin Transaction I. (1977) : 439 - 442.
- Swedberg, G., Casteusson, S. and Skold, O. "Characterization of Mutationally Altered Dihydropteroate Synthase and Its Ability to Form a Sulfonamide-Containing Dihydrofolate Analog." Journal of Bacteriology (1979) : 129-136.
- Thijssen, H.H.W. "A Simplified Radioassay Method for Dihydropteroate Synthase Activity in Escherichia coli and Its Application for an Inhibition Study of p-Aminobenzoic Acid Derivatives." Analytical Biochemistry. 53(1973) : 579.
- \_\_\_\_\_. "Relation between Structure of Sulphonamides and Inhibition of H<sub>2</sub>-pteroate Synthesis in Escherichia coli." Journal of Pharmacy and Pharmacology. 26(1974) : 228-234.
- \_\_\_\_\_. p-Aminobenzoic Acid Derivatives as Inhibitors of the Cell-Free H<sub>2</sub>-Pteroate Synthesizing System of Escherichia coli." Journal of Medicinal Chemistry. 20(2), (1977) : 233-236.
- Toro, G. and Ackerman, P.G. "Toxicology." Practical Clinical Chemistry. Little Brown and Company, Boston, (1975) : 682 - 684.
- Weber, K. and Osborn, M. "The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." The Journal of Biological Chemistry. 244(16), (1969) : 4406-4412.

Weisman, R.A. and Brown, G.M. "The Biosynthesis of Folic Acid :  
V) Characteristics of the Enzyme System that Catalyzes  
the Synthesis of Dihydropterotic Acid." The Journal of  
Biological Chemistry. 239(1), (1964) : 326 - 331.

Woods, D.D. Br.J.Exp. Pathol. 21(1940) : 74 cited by Thijssen,  
H.H.W. "p-Aminobenzoic Acid Derivatives as Inhibitors of  
the Cell-Free H<sub>2</sub>-Pterooate Synthesizing System of Escherichia  
coli." Journal of Medicinal Chemistry. 20(2), (1970) : 233-  
236.

Zakrzewski, S. Evidence of the Chemical Interaction between  
2-Mercaptoethanol and Tetrahydrofolate." The Journal of  
Biological Chemistry. 241(2), (1966) : 2957-2961.

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนภาพร สายอุบล เกิดวันที่ 8 มีนาคม พ.ศ.2500 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา จุลชีววิทยา จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2522

