

ผลการทดลอง

1. ผลของสารจับโลหะต่อออกซิเดส แอคติวิตีและการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า

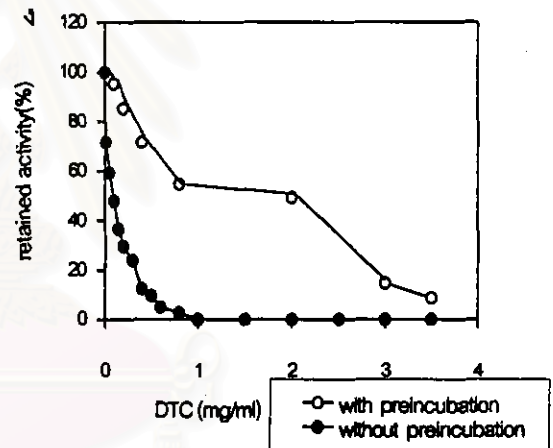
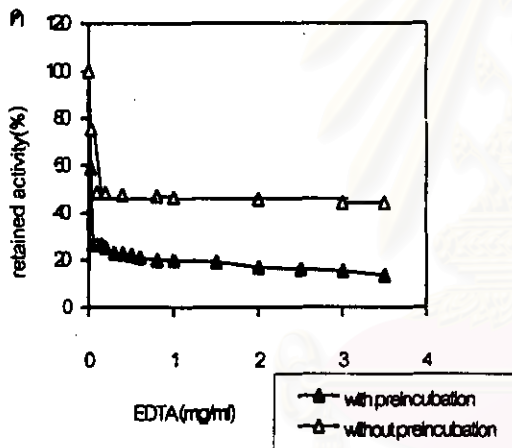
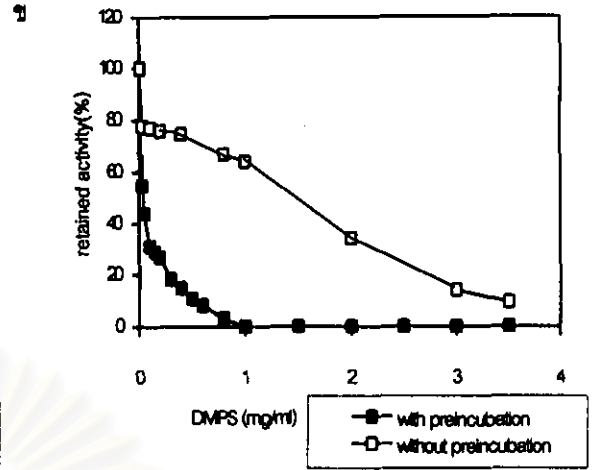
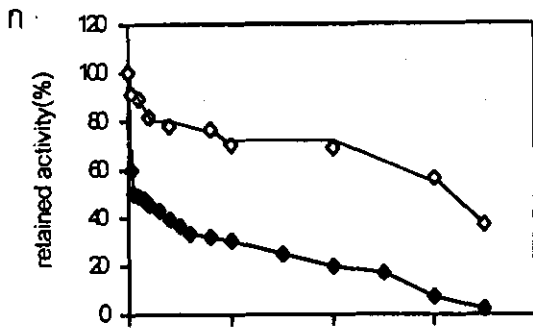
ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเชอรูโลพลาสมีนจำเป็นต้องใช้อะโปเชอรูโลพลาสมีน ซึ่งไม่มีทองแดงจับตัวอยู่ จึงมีความสนใจเลือกใช้สารจับโลหะจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ penicillamine, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS), $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sodium diethyldithiocarbamate (DTC)

จากรายงานของรอสวันต์ (1996) และผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับเชอรูโลพลาสมีน (Morell et al., 1957; Sato et al., 1991; Klemens et al., 1996; Lindley et al., 1997; Musci et al., 1999) พบว่าทองแดงมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมีน

ในการทดลองต่อไปนี้จะติดตามความสามารถในการดึงทองแดงออกด้วยออกซิเดส แอคติวิตีและยืนยันผลด้วยอิเล็กโทรไฟรีซิส

1.1 ผลของสารจับโลหะต่อออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมีน

รูปที่ 6 แสดงว่าเมื่อใช้เชอรูโลพลาสมีนที่มีค่าออกซิเดส แอคติวิตีเท่ากับสารจับโลหะทั้ง 4 ชนิดสามารถลดออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมีนได้ ในช่วงความเข้มข้นใกล้เคียงกัน (1-4 mg/ml) และเมื่อป่มกับสารจับโลหะ นาน 30 นาที ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะทำให้ประสิทธิภาพในการลดออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมีนสูงขึ้น สารจับโลหะทั้งสี่มีความสามารถที่ต่างกันบ้าง กล่าวคือ DMPS และ DTC (รูปที่ 6ข และ 6ง) สามารถลดออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมีนได้หมดที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 1 mg/ml ในขณะที่ penicillamine (รูปที่ 6ค) สามารถลดออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมีนได้หมดที่ 3.5 mg/ml และ $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (รูปที่ 6ด) ไม่สามารถลดแอคติวิตีได้หมดถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นถึง 3.5 mg/ml แล้ว อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณที่จะยับยั้งเอนไซม์ได้ครั้งหนึ่ง จะพบว่าในปริมาณเอนไซม์เท่ากัน $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ 0.01 mg/ml



รูปที่ 6 ผลของ Penicillamine, DMPS, EDTA, DTC ต่อ oxidase activity ของเชอโรไลพลาสมีน

บ่มเชอโรไลพลาสมีน (0.2 mg/ml, 1620 unit) 50 μ l กับสารจับโลหะ 4 ชนิด Penicillamine (ก), 2,3-Dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) (ข), $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ค), Sodium diethyldithiocarbamate (DTC) (ง) ความเข้มข้นต่างๆ ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 ที่ 37 $^{\circ}$ C (ปริมาตรรวม 100 μ l) เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที ดึงสารละลายปริมาตร 30 μ l นำไปวิเคราะห์ activity ที่เหลือตามวิธีทำการทดลองข้อ 3 ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง

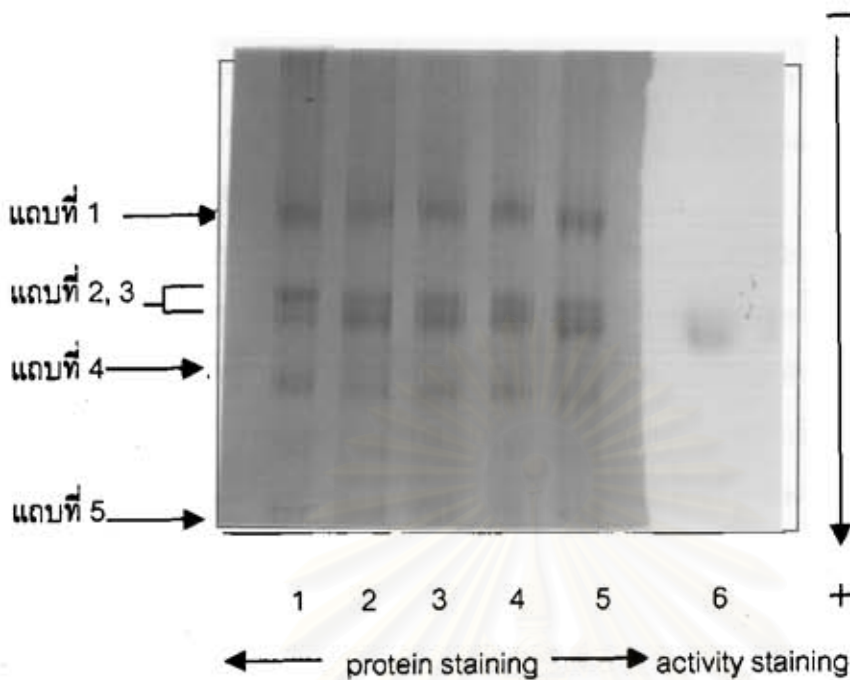
without preincubation คือ วัดแอกติวิตีทันทีที่เติมสารจับโลหะ โดยไม่บ่มตามเวลาข้างต้น

1.2 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ของเซอรูโลพลาสมินในอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่เสียสภาพ (non-denaturing discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis)

สมมติฐานของการทดลองนี้คือ เมื่อสารจับโลหะดึงทองแดงออกจากเซอรูโลพลาสมิน จะทำให้ประจุสุทธิของเซอรูโลพลาสมินเปลี่ยนไป จึงควรติดตามได้ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปที่ 7 แสดงว่าอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของการเคลื่อนที่ของเซอรูโลพลาสมินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารจับโลหะทั้ง 4 ชนิด ยังคงปรากฏโปรตีน 5 แถบ เหมือนกับในเซอรูโลพลาสมินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสารจับโลหะโดยเฉพาะแถบที่ 2 และ 3 ซึ่งมีออกซิเดส แอคติวิตีก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 ผลของสารจับโลหะ EDTA, penicillamine, DMPS, DTC ต่อการเคลื่อนที่ของ
เซอรูโลพลาสตินในอเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่เสียดสภาพ

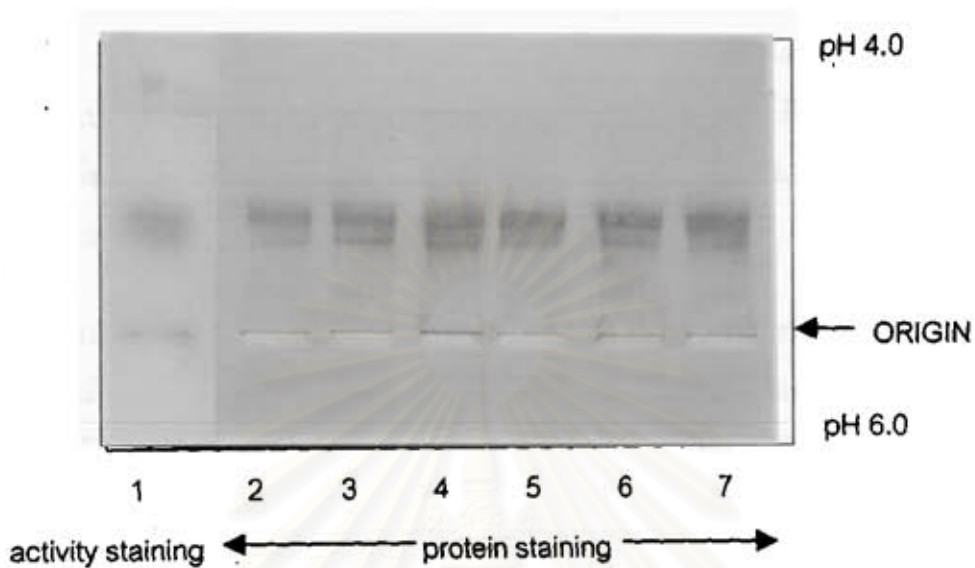
ป่ม 150 μ l เซอรูโลพลาสติน (0.371 mg/ml, 4,898 unit) กับสารจับโลหะ ได้แก่ EDTA, penicillamine ที่ความเข้มข้น 8 mg/ml และ DMPS, DTC ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาตร 150 μ l (ปริมาตรรวม 300 μ l) ที่ 37 $^{\circ}$ C เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที นำมาผ่าน Sephadex G-25 column เพื่อแยกโลหะและสารจับโลหะออกจากโปรตีน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี ultrafiltration 5 เท่า ความเข้มข้นสุทธิประมาณ 1.82 μ g/ μ l นำไปใส่เจลตัวอย่างละ 9.1 μ g

ช่องที่	สารตัวอย่าง
1	เซอรูโลพลาสติน + Na ₂ EDTA.2H ₂ O
2	เซอรูโลพลาสติน + penicillamine
3	เซอรูโลพลาสติน + DMPS
4	เซอรูโลพลาสติน + DTC
5	เซอรูโลพลาสติน
6	เซอรูโลพลาสติน 100 μ g (8,800 unit)

1.3 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของเซอรูโลพลาสมินในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing polyacrylamide gel eletrophoresis)

นำเซอรูโลพลาสมินที่ซื้อมาจาก Sigma มาเปรียบเทียบกับเซอรูโลพลาสมินที่บ่มกับสารจับโลหะ 4 ชนิด คือ penicillamine, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS), $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และ sodium diethyldithiocarbamate (DTC) โดยเลือกให้ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงซึ่งเป็นระบบที่วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของประจุได้แม่นยำกว่าอิเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่เสถียรภาพ มาติดตามเซอรูโลพลาสมินที่ทำปฏิกิริยากับสารจับโลหะทั้ง 4 ชนิด และเนื่องจากเซอรูโลพลาสมินมีค่า $\text{pI} = 4.4$ จึงเลือกดูการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงที่ $\text{pH} 4-6$ ซึ่งครอบคลุมค่า pI ของเซอรูโลพลาสมิน และตรวจวัดออกซิเดส แอคติวิตีในเจลเพื่อหาตำแหน่งของเซอรูโลพลาสมินด้วย ดังรูปที่ 8 พบว่ามีแถบโปรตีนของเซอรูโลพลาสมิน 2 แถบซึ่งตรงกับแถบที่ย้อมแอคติวิตีติดทั้ง 2 แถบ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนของเซอรูโลพลาสมินเมื่อบ่มกับสารจับโลหะชนิดใดชนิดหนึ่ง

ถึงแม้ว่าอิเล็กโทรโฟริซิสแบบไม่เสถียรภาพและไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงจะไม่สามารถตรวจวัดความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของเซอรูโลพลาสมินอันเนื่องมาจากสารจับโลหะ ทั้งนี้อาจเนื่องจากทองแดงฝังตัวอยู่ใน domain ภายในโมเลกุลของเซอรูโลพลาสมินอิเล็กโทรโฟริซิสทั้ง 2 ชนิดข้างต้นตรวจประจุนบนพื้นผิวโมเลกุล จึงไม่สามารถติดตามความแตกต่างนี้ได้



รูปที่ 8 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ของเซอรูโลพลาสมินใน isoelectric focusing polyacrylamide gel

บ่ม 150 ไมโครลิตร เซอรูโลพลาสมิน (0.371 mg/ml, 4,898 unit) กับสารจับโลหะ 4 ชนิด ได้แก่ EDTA, penicillamine ที่ความเข้มข้น 8 mg/ml และ DMPS, DTC ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาตร 150 μ l (ปริมาตรรวม 300 μ l) ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที นำมาผ่าน Sephadex G-25 column เพื่อแยกโลหะและสารจับโลหะออก แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี ultrafiltration 5 เท่า ความเข้มข้นสุทธิประมาณ 1.84 μ g/ μ l นำไปใส่เจลปริมาตร 12 μ l ปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างประมาณ 20 μ g

ช่องที่	สารตัวอย่าง
1	เซอรูโลพลาสมิน 200 μ g (17,710 unit)
2 และ 7	เซอรูโลพลาสมิน
3	เซอรูโลพลาสมิน +DTC
4	เซอรูโลพลาสมิน + DMPS
5	เซอรูโลพลาสมิน +penicillamine
6	เซอรูโลพลาสมิน + Na ₂ EDTA.2H ₂ O

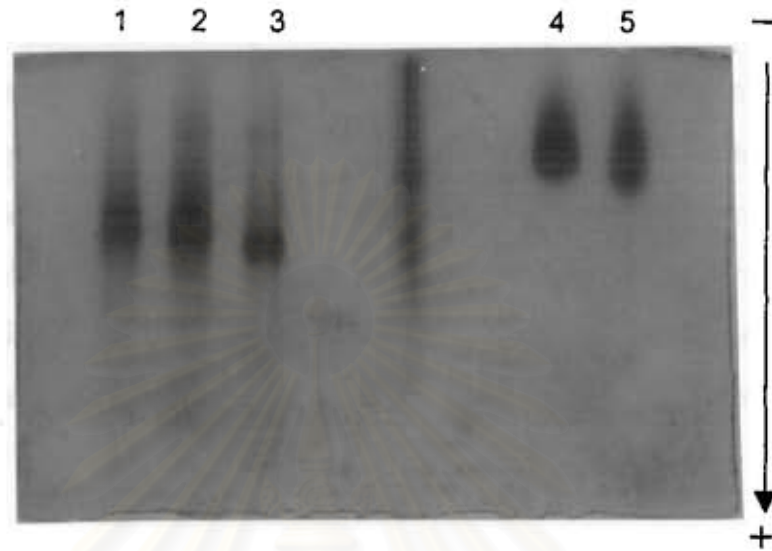
1.4 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของเซอรูโลพลาสมินในยูเรียเจล (urea polyacrylamide gel electrophoresis)

การศึกษานี้อาศัยคุณสมบัติของยูเรีย (urea) ที่สามารถทำให้โปรตีนคลายโครงสร้าง 3 มิติ โดยไปทำลายพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ทำให้โปรตีนซึ่งเดิมมีการม้วนพับเป็นก้อน (globular shape) คลายตัวเป็นสายยาว (rod shape) จากคุณสมบัติดังกล่าวที่ทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformation change) จาก globular shape เป็น rod shape ทำให้การเคลื่อนที่ของโปรตีนช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับในสนามไฟฟ้าในยูเรียเจล (urea polyacrylamide gel electrophoresis)

สมมติฐานของการทดลองนี้คือ เมื่อยังมีทองแดงในโมเลกุล การคลายโครงสร้าง 3 มิติจะน้อยกว่าเมื่อไม่มีทองแดง การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโฮโลเซอรูโลพลาสมิน (holoceruloplasmin) จึงเร็วกว่าในอะโปเซอรูโลพลาสมิน (apoceruloplasmin) ดังผลการทดลองรูปที่ 9 แสดงการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของเซอรูโลพลาสมิน และเซอรูโลพลาสมินที่ทำปฏิกิริยากับสารจับโลหะ DTC ใน 6 M urea gel ที่ pH 8.4 พบว่าเซอรูโลพลาสมิน (ช่องที่ 3) มีแถบโปรตีนหลักที่เคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้เร็วที่สุดในเจลนี้ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารจับโลหะ DTC (ช่องที่ 1 และ 2) โปรตีนนี้จะเคลื่อนที่ช้าลงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐาน การทดลองนี้ได้ยืนยันโดยเปรียบเทียบโฮโลทรานเฟอร์รินซึ่งจับตัวอยู่กับเหล็กและอะโปทรานสเฟอร์รินซึ่งไม่มีโลหะจับอยู่ ได้รูปแบบการเคลื่อนที่คล้ายกัน

จึงกล่าวได้ว่าสารจับโลหะ DTC สามารถดึงทองแดงออกจากโมเลกุลของเซอรูโลพลาสมินได้ ซึ่งทำให้แอกติวิตีลดลงด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ผลของสารจับโลหะต่อการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของเซอรูโลพลาสมินในยูเรียเจลที่ pH 8.4

บ่ม 150 ไมโครลิตร เซอรูโลพลาสมิน (0.371 mg/ml, 4,898 unit) กับสารจับโลหะ DTC ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ปริมาตร 150 μ l (ปริมาตรรวม 300 μ l) ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที นำมาผ่าน Sephadex G-25 column เพื่อแยกโลหะและสารจับโลหะออก แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี ultrafiltration 5 เท่า ความเข้มข้นสุทธิประมาณ 1.84 μ g/ μ l นำไปใส่เจล ปริมาตร 12 μ l ปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างประมาณ 20 μ g

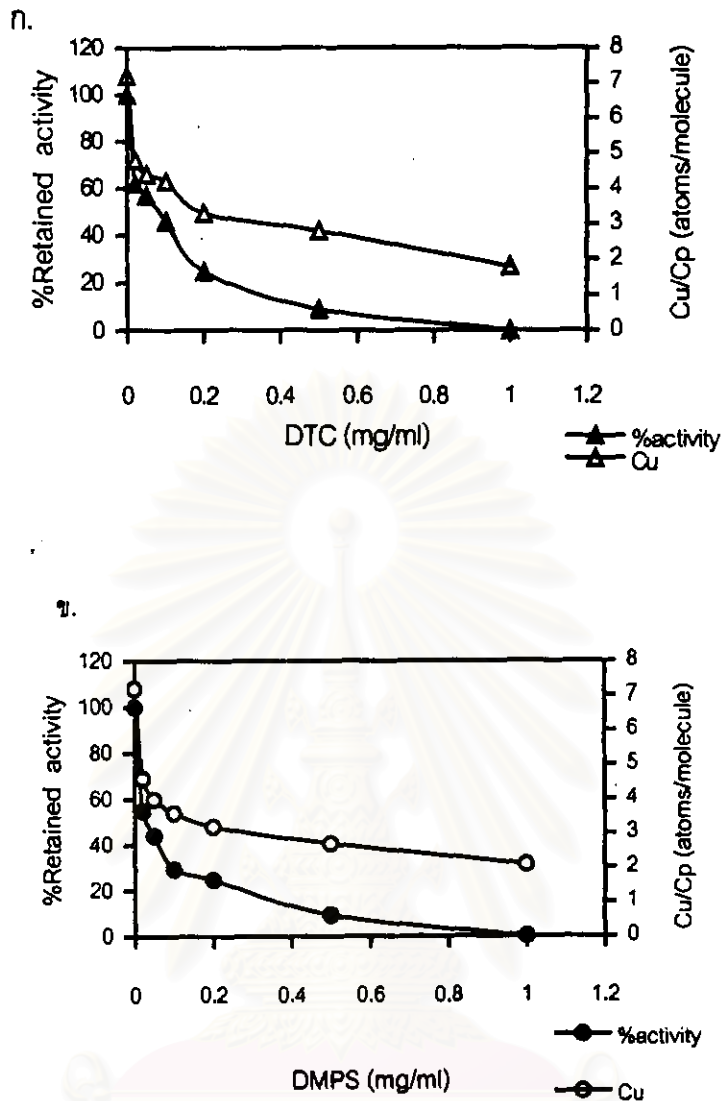
ช่องที่	สารตัวอย่าง
1	เซอรูโลพลาสมินที่มี DTC 4.2 μ g
2	เซอรูโลพลาสมินที่มี DTC 5.6 μ g
3	เซอรูโลพลาสมิน 3.5 μ g
4	อะโปทรานสเฟอร์ริน 6.0 μ g
5	ไฮโลทรานสเฟอร์ริน 6.0 μ g

1.5 ผลของสารจับโลหะ DMPS และ DTC ต่อออกซิเดส แอคติวิตีและปริมาณทองแดงของเชอรูโลพลาสมิน

จากผลการทดลองข้อ 1.1 ได้เลือกสารจับโลหะ DMPS และ DTC (ดังรูปที่ 6ข และ 6ง) ซึ่งสามารถลดออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมินได้สมบูรณ์ โดยใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ 1 มก./มล. มาป่มกับเชอรูโลพลาสมินแล้วผ่าน Sephadex G-25 column ตามวิธีทดลองข้อ 1 เพื่อแยกสารจับโลหะออกจากเชอรูโลพลาสมิน แล้วนำไปวัดค่าออกซิเดส แอคติวิตี และหาปริมาณทองแดงที่ยังคงอยู่บนโมเลกุลของเชอรูโลพลาสมินโดยใช้ graphite furnace atomic absorption spectrophotometer ได้ผลดังในรูปที่ 10 พบว่าทั้งปริมาณทองแดงและค่าออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมินลดลงด้วยเมื่อสารจับโลหะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามระดับการลดของพารามิเตอร์ทั้งสองแตกต่างกันบ้าง กล่าวคือ เมื่อปริมาณทองแดงลดลงเหลือ 2.1 อะตอมต่อโมเลกุลของเชอรูโลพลาสมิน ค่าออกซิเดส แอคติวิตีของเชอรูโลพลาสมินลดลงจนสมบูรณ์แล้ว

ในระหว่างสารจับโลหะทั้งสองนี้ พบว่า DTC สามารถจับกับทองแดงออกจากเชอรูโลพลาสมินได้สมบูรณ์กว่าคือเหลือทองแดงอยู่เพียง 25.7% ในขณะที่ DMPS สามารถดึงทองแดงออกเหลือเพียง 30% จึงสนใจเลือก DTC ใช้ในการเตรียมอะโปเชอรูโลพลาสมิน (apoceruloplasmin) ในขั้นตอนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 ผลของสารจับโลหะ DMPS และ DTC ต่อออกซิเดส แอคติวิตีและปริมาณทองแดงของ เซอูโลพลาสมีน

บ่มเซอูโลพลาสมีน (0.371 mg/ml, 3005 unit) 150 μ l กับ DMPS และ DTC ความเข้มข้นต่างๆดังแสดงในรูปที่ 10ก และ 10ข ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 ที่ 37 $^{\circ}$ C เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที (ปริมาตรรวม 300 μ l) นำไปผ่าน Sephadex G-25 column ตามวิธีทำการทดลองข้อ 1 นำสารละลายเซอูโลพลาสมีนที่ออกจากคอลัมน์ ปริมาตร 30 μ l นำไปวิเคราะห์ activity ตามวิธีทำการทดลองข้อ 3 (ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง) และปริมาตร 200 μ l มาเติม 0.2% HNO₃ (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 2) นำไปวิเคราะห์ปริมาณทองแดงด้วย graphite furnace atomic absorption spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 324.5 nm (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 2.2.1) ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

2. การเติมทองแดงกลับเข้าสู่โมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสมีน (Reconstitution of copper to ceruloplasmin)

สมมติฐานของการทดลองนี้คือ มีทองแดงจำนวนหนึ่งบนโมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสมีนที่สัมพันธ์กับออกซิเดส แอคติวิตี เมื่อนำทองแดงเหล่านี้ออกด้วย DTC แอกติวิตีจึงลดลง และเมื่อเติมทองแดงกลับเข้าไปอีก ทองแดงจะสามารถกลับเข้าสู่ตำแหน่งเดิมบนเซอร์ูโลพลาสมีน ช่วยเร่งปฏิกิริยาได้อีกครั้งหนึ่ง จากวิธีทดลองตามแผนภาพที่ 1 ในภาคผนวก 1 สามารถสรุปผลการทดลองได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 ได้ว่า เมื่อเติม $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}\cdot\text{H}_2\text{O}$ กลับเข้าสู่เซอร์ูโลพลาสมีนที่ได้ทำปฏิกิริยากับ DTC ในอัตราส่วนของจำนวนอะตอมทองแดงต่อโมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสมีน 6 เท่าและ 30 เท่า จะพบว่าทองแดงกลับเข้าสู่เซอร์ูโลพลาสมีนได้ทั้งหมด (พบทองแดง 6.6 และ 6.9 อะตอม/โมเลกุล) และออกซิเดส แอกติวิตีกลับคืนมา 87 % และ 73 % ตามลำดับ ผลข้างต้นแสดงว่าทองแดงมีความสำคัญต่อค่าออกซิเดส แอกติวิตีของเซอร์ูโลพลาสมีน และการจับของทองแดงกับเซอร์ูโลพลาสมีนนั้นสามารถย้อนกลับได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลของการเติมทองแดงกลับเข้าสู่เซอรูโลพลาสมินที่ทำปฏิกิริยากับDTC

Sample	Cu		Activity	
	Cu/Cp atoms/molecule	%	Specific activity(u/μg)	retained activity (%)
Cp ⁽¹⁾	6.8	100	48.6	100
DTC-treated Cp ⁽⁴⁾	1.9	27.9	0	0
DTC-treated Cp+6 folds Cu ⁽⁵⁾	6.6	97.0	42.3	87
DTC-treated Cp+30 folds Cu ⁽⁶⁾	6.9	101.5	35.3	73

ป่มเซอรูโลพลาสมิน 2.25 mg/ml กับ DTC 5 mg/ml ที่ 37°ซ นาน 30 นาที แล้วแยก DTC-treated ceruloplasmin (DTC-treated Cp) ด้วย Sephadex G-25 column เก็บส่วนหนึ่งไว้ นำที่เหลือไปป่มกับ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ด้วยอัตราส่วนจำนวนอะตอมของทองแดงต่อโมเลกุลของเซอรูโลพลาสมินเป็น 6 และ 30 เท่าตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลานาน 30 นาที จึงนำไปแยกทองแดงอิสระออกจาก Sephadex G-25 นำแต่ละส่วนไปวัดออกซิเคิล แอคติวิตี (ตามวิธีการทดลองข้อ 3) ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีการทดลองข้อ 6) และปริมาณทองแดง (ตามวิธีการทดลองข้อ 2.2.1) ตามลำดับ

(รูปที่ 25 แสดงรายละเอียดของการทดลองและการคำนวณอยู่ในภาคผนวก

หมายเลข (1) (4) (5) (6) ใน sample แสดงรายละเอียดการทำ ดังระบุในแผนภาพ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อย่างไรก็ตาม ยังพบเสมอว่าถึงแม้ DTC ลดออกซิเดส แอคติวิตีได้สมบูรณนั้น ยังมีอะตอมของทองแดงเหลืออยู่บนเซอร์คูโลพลาสมินอีกประมาณ 30 % หรือ 2 อะตอมเสมอ ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการจับโลหะบนเซอร์คูโลพลาสมิน จำเป็นต้องใช้อะโปเซอร์คูโลพลาสมินที่ไม่มีโลหะจับอยู่ การทดลองต่อไปนี้จึงใช้อะโปเซอร์คูโลพลาสมินที่เตรียมจากการ reduce $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ โดย 10 mM ascorbic acid (ดังการทดลองในข้อ 9.0) (Morell and Scheinberg, 1957; Musci *et al.*, 1996) แล้วดึงออกด้วย DTC ผลการเตรียมอะโปเซอร์คูโลพลาสมินในงานนี้ได้ใช้อะโปเซอร์คูโลพลาสมินที่มีทองแดงเหลืออยู่ 0.14 อะตอมหรือ 2.0 % ตรงตามผลของ Morell และ Scheinberg

3. ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของอะโปเซอร์คูโลพลาสมินต่อการจับกับทองแดง (Kinetics of copper binding on apoceruloplasmin)

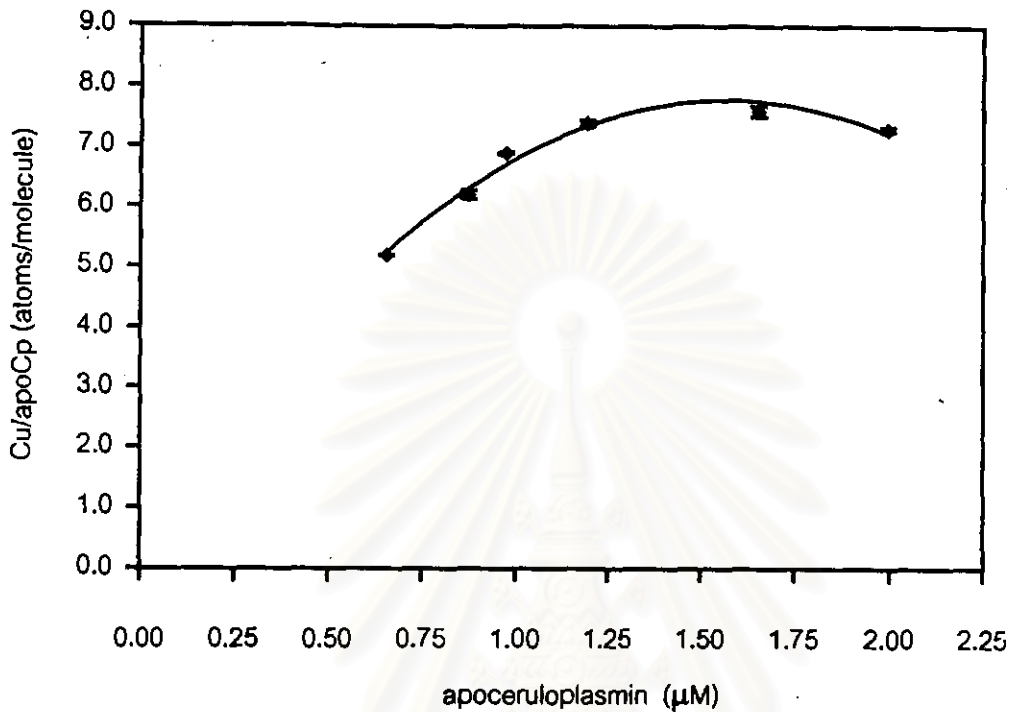
3.1 การหาปริมาณอะโปเซอร์คูโลพลาสมินที่เหมาะสมกับทองแดง

จากรูปที่ 11 ปริมาณของอะโปเซอร์คูโลพลาสมินที่เหมาะสมกับปริมาณทองแดงที่ใช้ และอยู่ในช่วงที่ให้ความเชื่อมั่นของการทดลองสูงอยู่ที่ค่าความเข้มข้นของอะโปเซอร์คูโลพลาสมินน้อยมากคือ ตั้งแต่ 0.5-2.0 μM ซึ่งทองแดงสามารถจับกับอะโปเซอร์คูโลพลาสมินจนอิ่มตัว จึงเลือกความเข้มข้นของอะโปเซอร์คูโลพลาสมินเท่ากับ 1.6 μM ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของอะโปเซอร์คูโลพลาสมินต่อการจับกับทองแดงต่อไป

3.2 จลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างทองแดงกับอะโปเซอร์คูโลพลาสมิน

เมื่อใช้อะโปเซอร์คูโลพลาสมินที่ 1.6 μM แล้วแปรค่าความเข้มข้นของทองแดงจะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 12 ซึ่งอ่านค่าจำนวนทองแดงที่จับต่อโมเลกุลและค่าคงที่ของการแตกตัวได้ดังแสดงในตารางที่ 9 และเมื่อนำค่าการจับของทองแดงที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย double reciprocal plot และ Scatchard plot ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 13, 14 และตารางที่ 9

Effect of Apoceruloplasmin Concentration on Cu Binding

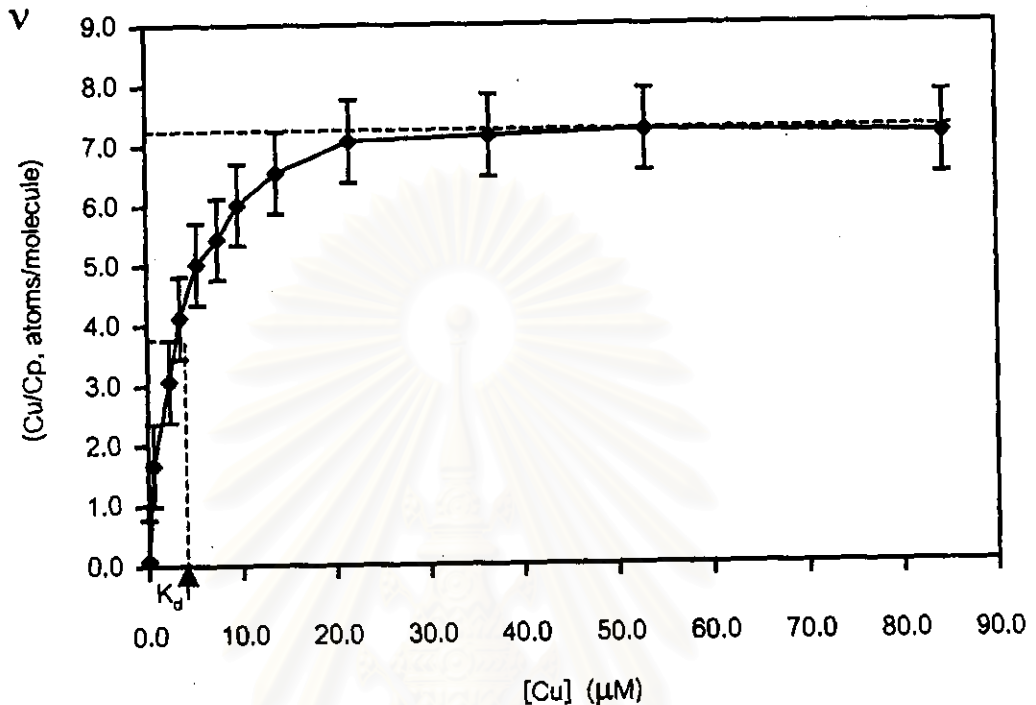


รูปที่ 11 ผลของความเข้มข้นของอะโปเซอรูโลพลาสมีนต่อการจับกับทองแดง

บ่มอะโปเซอรูโลพลาสมีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 140 µl กับ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 127.2 µM (ปริมาตรรวม 280 µl) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที นำสารละลายมาผ่าน Sephadex G-25 column (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 1) เก็บสารละลายส่วนที่เป็นอะโปเซอรูโลพลาสมีน 900 µl นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 6) วิเคราะห์แอกติวิตี (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 3) และวิเคราะห์ปริมาณทองแดง (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 2.2.1) ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 4 ค่า

v คือ ทองแดงที่จับกับอะโปเซอรูโลพลาสมีน หน่วยเป็นอะตอม/โมเลกุล

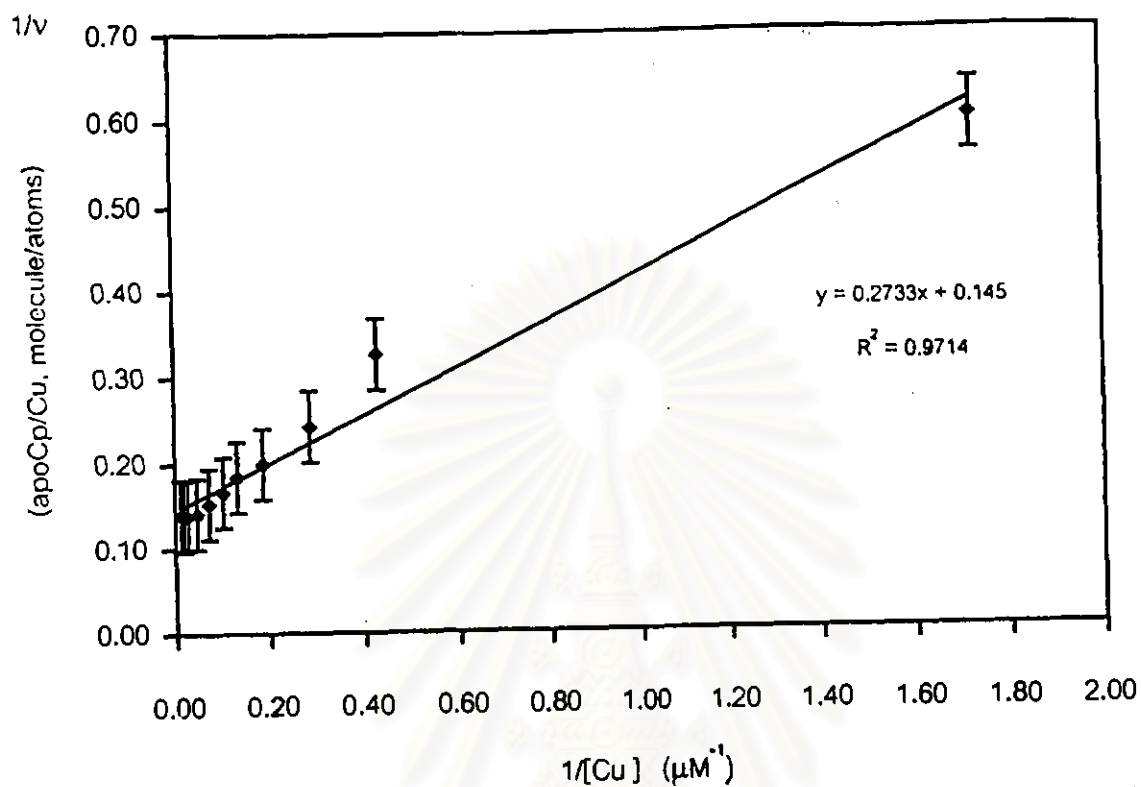
Saturation Curve of Copper on Apoceruloplasmin



รูปที่ 12 การเขียนกราฟแบบ Saturation curve ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินกับทองแดง บ่มอะโปเซอรูโลพลาสมิน (0.84 mg/ml) ปริมาตร 70 μ l กับ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 (ปริมาตรรวม 280 μ l) ความเข้มข้นสุดท้ายของอะโปเซอรูโลพลาสมินเท่ากับ 1.60 μ M ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที นำสารละลายมาผ่าน Sephadex G-25 column (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 1) เก็บสารละลายส่วนที่เป็นอะโปเซอรูโลพลาสมิน 900 μ l นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 6) วิเคราะห์แอกติวิตี (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 3) และวิเคราะห์ปริมาณทองแดง (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 2.2.1) ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 4 ค่า

v คือ ทองแดงที่จับกับอะโปเซอรูโลพลาสมิน หน่วยเป็นอะตอมต่อโมเลกุล

Double Reciprocal Plot of Cu Binding to Apoceruloplasmin

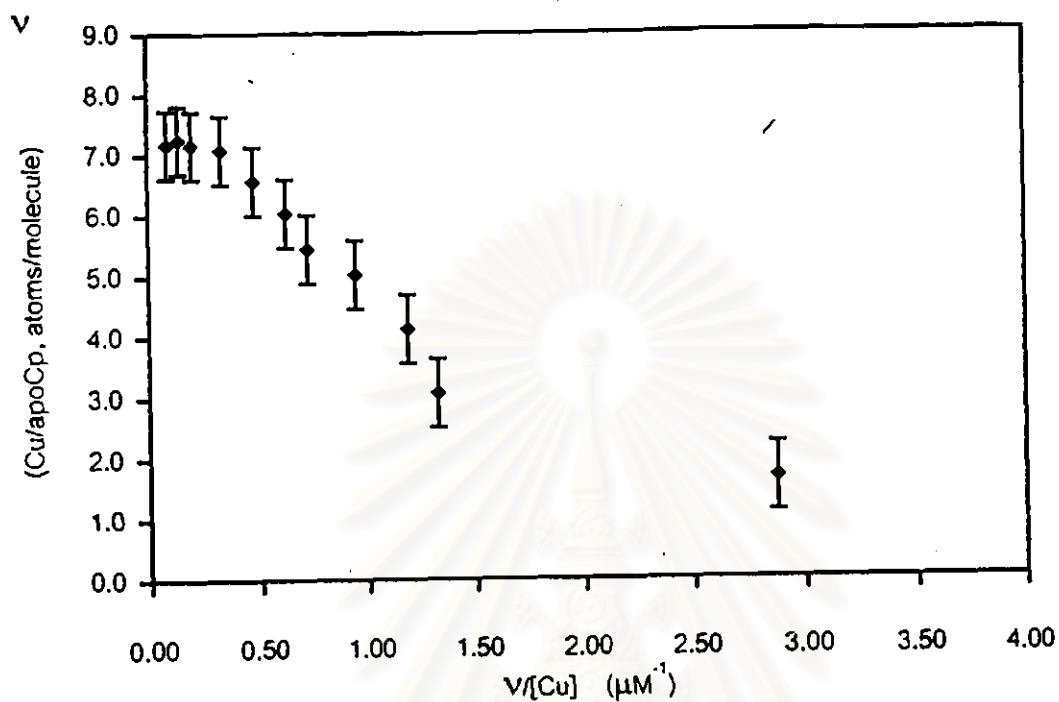


รูปที่ 13 การเขียนกราฟแบบ Double Reciprocal Plot ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสติน กับทองแดง
นำค่าที่ได้จากรูปที่ 16 มาเขียนกราฟในรูปแบบ Double Reciprocal Plot ดังสมการ

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk[A]}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Scatchard Plot of Cu Binding on Apoceruloplasmin



รูปที่ 14 การเขียนกราฟแบบ Scatchard Plot ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินกับทองแดง นำค่าที่ได้จากรูปที่ 12 มาเขียนกราฟรูป Scatchard plot ตามสมการ

$$v = n - K_d \frac{v}{[A]}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากสมการ

$$v = \frac{nk[A]}{1+k[A]} \dots \dots \dots (1) \quad (\text{Van Holde et al., 1998})$$

เมื่อ v คือ ปริมาณโลหะที่จับเชอรูโลพลาสมีนต่อไมเลกุลของเชอรูโลพลาสมีน

$[A]$ คือ ความเข้มข้นของโลหะอิสระ

n คือ ปริมาณโลหะที่จับกับเชอรูโลพลาสมีนสูงสุด

k คือ ค่าคงที่ของการจับตัว (association constant หรือ binding constant)

และ K_d คือ ค่าคงที่ของการแตกตัว (dissociation constant) ซึ่งเป็นส่วนกลับของ k

เราสามารถเขียนกราฟแบบ saturation curve ได้ดังรูปที่ 12 จากผลการทดลองนี้ สามารถอ่านค่า n ได้ 7.25 อะตอม/ไมเลกุล และค่า K_d 3.20 μM

เมื่อเปลี่ยนสมการรูปไฮเพอร์โบล่าให้เป็นเส้นตรงแบบ double reciprocal plot ดังนี้

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk[A]} \dots \dots \dots (2)$$

เราสามารถเขียน double reciprocal plot ได้ดังรูปที่ 13 จากผลการทดลองนี้ สามารถอ่านค่า n ได้ 6.90 อะตอมต่อไมเลกุล และค่า K_d 3.66 μM

และเมื่อเปลี่ยนสมการรูปไฮเพอร์โบล่าให้เป็นเส้นตรงตามสมการของ Scatchard ดังนี้

$$\frac{v}{[A]} = nk - kv \dots \dots \dots (3)$$

ย้ายข้างสมการ (3) และจัดรูปใหม่

$$v = n - \frac{1}{k} \frac{v}{[A]}$$

$$\text{หรือ } v = n - K_d \frac{v}{[A]} \dots \dots \dots (4)$$

ผลที่ได้จาก Scatchard plot (รูปที่ 14) ไม่สามารถนำมาลากกราฟเส้นตรงเพื่อหาค่า K_d ได้ แต่แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของเชอรูโลพลาสมีนที่จับกับทองแดงได้มีหลายชนิด

(heterogeneity)

ตารางที่ 9 Dissociation constant และค่าจำนวนทองแดงที่จับกับอะโปเซอรูโลพลาสมิน สูงสุด (n) จากการเขียนกราฟแบบ Saturation curve แบบ Double reciprocal plot และแบบ Scatchard plot

Kinetic parameter	Saturation curve	Double reciprocal plot	Scatchard plot
Dissociation constant (K_d) (μM)	3.20	3.66	n.d.
Maximun binding (n)	7.25	6.90	n.d.

*n.d. = not determined



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

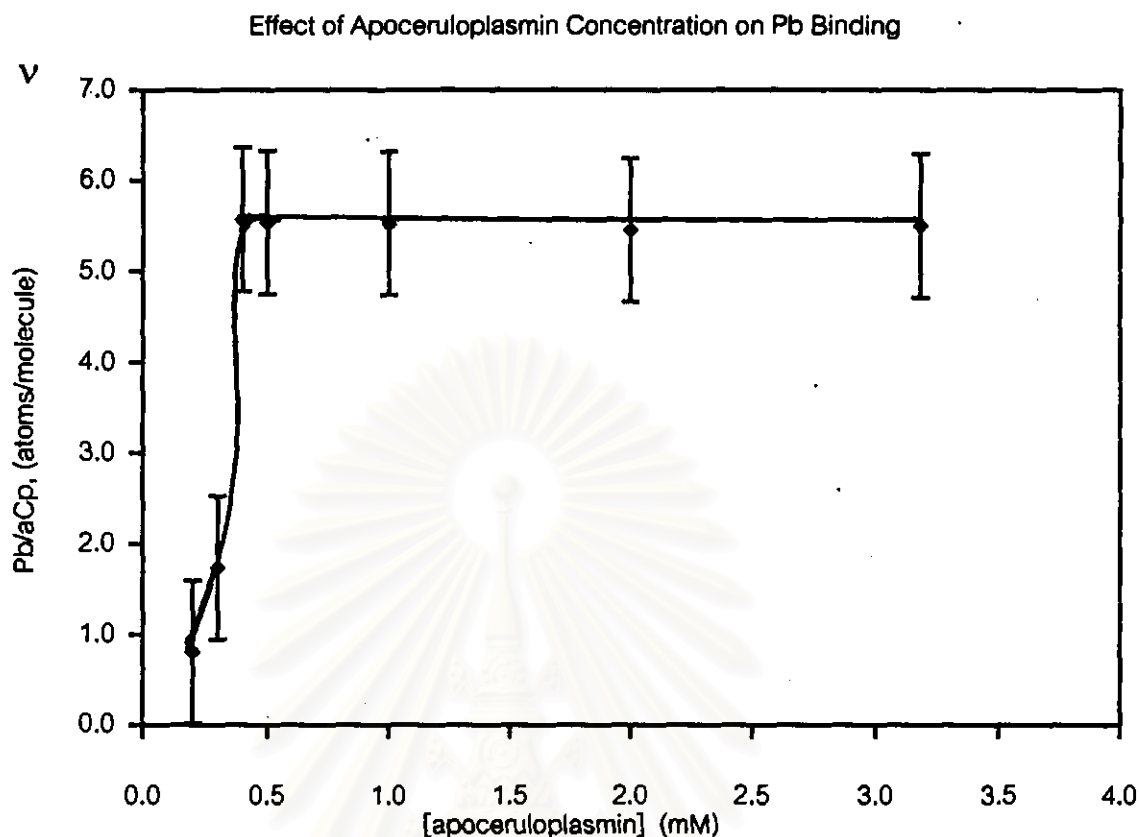
4. ผลของการศึกษาจลนพลศาสตร์ของอะโปเซอรูโลพลาสมินต่อการจับกับตะกั่ว (Kinetics of lead binding on apoceruloplasmin)

4.1 การหาปริมาณอะโปเซอรูโลพลาสมินที่เหมาะสมกับตะกั่ว

นำอะโปเซอรูโลพลาสมินที่เตรียมจากวิธีทำการทดลองข้อ 8.0 มาหาปริมาณความเข้มข้นของอะโปเซอรูโลพลาสมินที่เหมาะสมกับตะกั่วที่มีค่าตั้งแต่ 0.4-3.0 μM (รูปที่ 15) อะโปเซอรูโลพลาสมินจับกับตะกั่วจนอิ่มตัวตั้งแต่ 1 μM ขึ้นไปจึงเลือกความเข้มข้นของอะโปเซอรูโลพลาสมินเท่ากับ 1.60 μM ซึ่งเท่ากับในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของทองแดง ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการจับกับตะกั่วต่อไป

4.2 จลนพลศาสตร์ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว

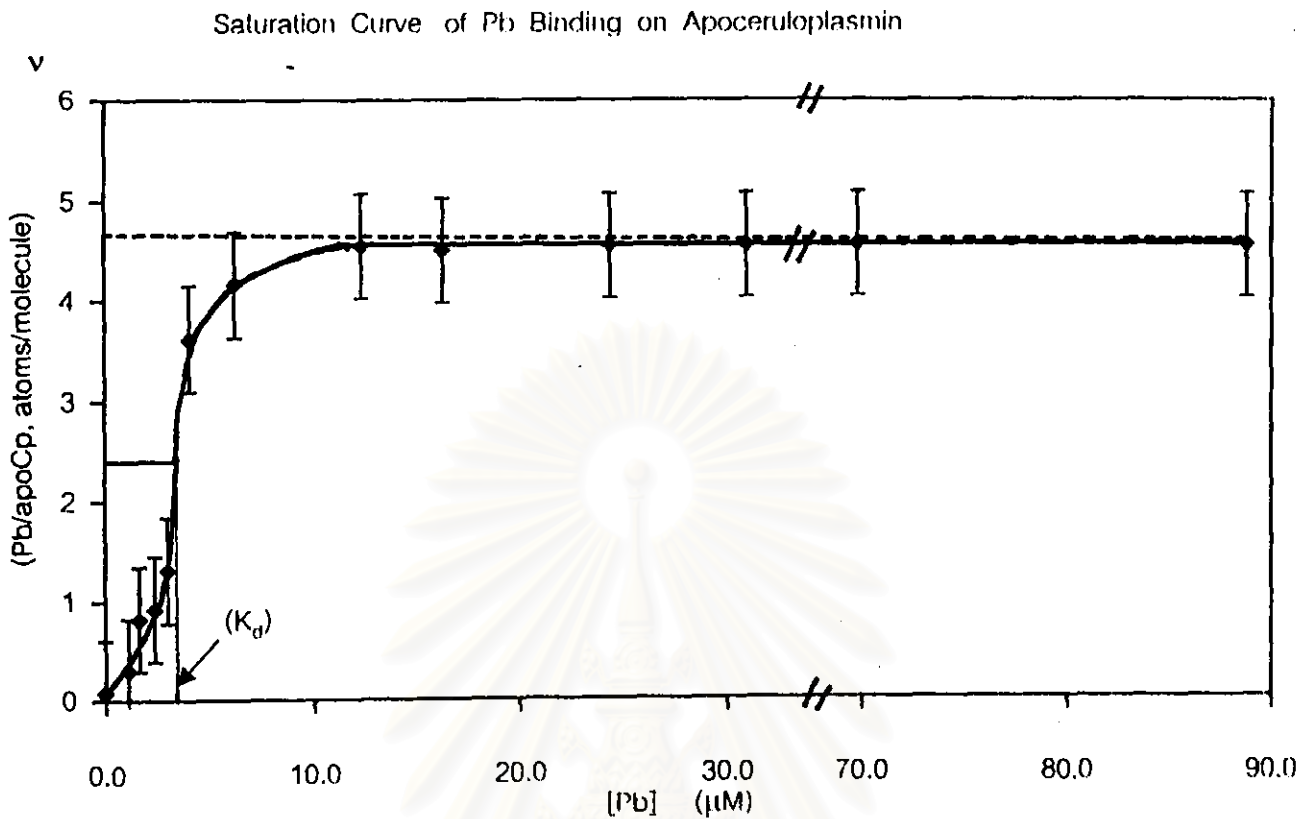
เมื่อใช้อะโปเซอรูโลพลาสมินที่ 1.6 μM แล้วแปรค่าความเข้มข้นของตะกั่วจะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 16 พบว่ารูปร่างของกราฟเป็นแบบ sigmoidal ไม่ใช่ไฮเพอร์โบล่า และเมื่อนำค่าการจับของตะกั่วที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย double reciprocal plot และแบบ Scatchard plot ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 17, 18 และรูปที่ 19



รูปที่ 15 ผลของความเข้มข้นของอะโปเซอรูโลพลาสมีนต่อการจับกับตะกั่ว

บ่มอะโปเซอรูโลพลาสมีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 140 μ l กับ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 127.2 μ M (ปริมาตรรวม 280 μ l) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที นำสารละลายมาผ่าน Sephadex G-25 column (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 1) เก็บสารละลายส่วนที่เป็นอะโปเซอรูโลพลาสมีน 900 μ l นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 6) วิเคราะห์แอกติวิตี (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 3) และวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 2.2.2) ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 4 ค่า

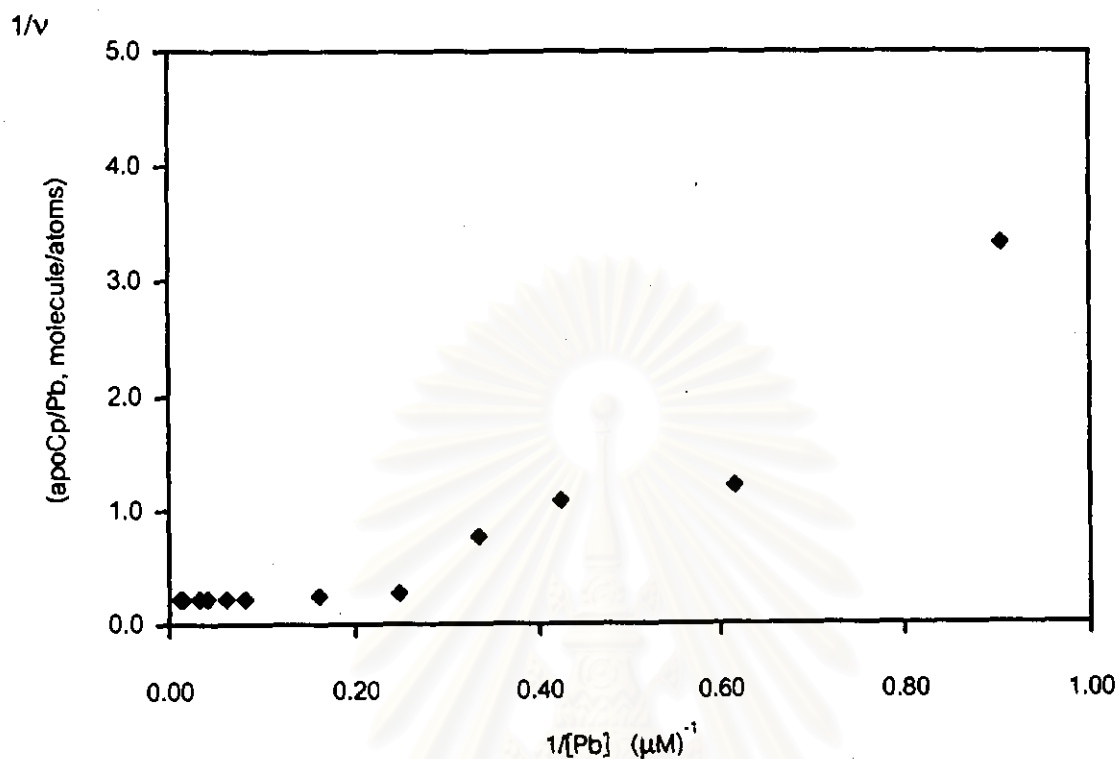
v คือ ตะกั่วที่จับกับอะโปเซอรูโลพลาสมีน หน่วยเป็นอะตอมต่อโมเลกุล



รูปที่ 16 การเขียนกราฟแบบ Saturation curve ของผลการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว บ่มอะโปเซอรูโลพลาสมิน (0.84 mg/ml) ปริมาตร 70 μ l กับ $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้นต่าง ๆ ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 (ปริมาตรรวม 280 μ l) ความเข้มข้นสุดท้ายของอะโปเซอรูโลพลาสมินเท่ากับ 1.60 μ M ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที นำสารละลายมาผ่าน Sephadex G-25 column (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 1) เก็บสารละลายส่วนที่เป็นอะโปเซอรูโลพลาสมิน 900 μ l นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 6) วิเคราะห์แอกติวิตี (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 3) และวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 2.2.2) ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 4 ค่า

v คือ ตะกั่วที่จับกับอะโปเซอรูโลพลาสมิน หน่วยเป็นอะตอม/โมเลกุล

Double Reciprocal Plot of Pb Binding on Apoceruloplasmin



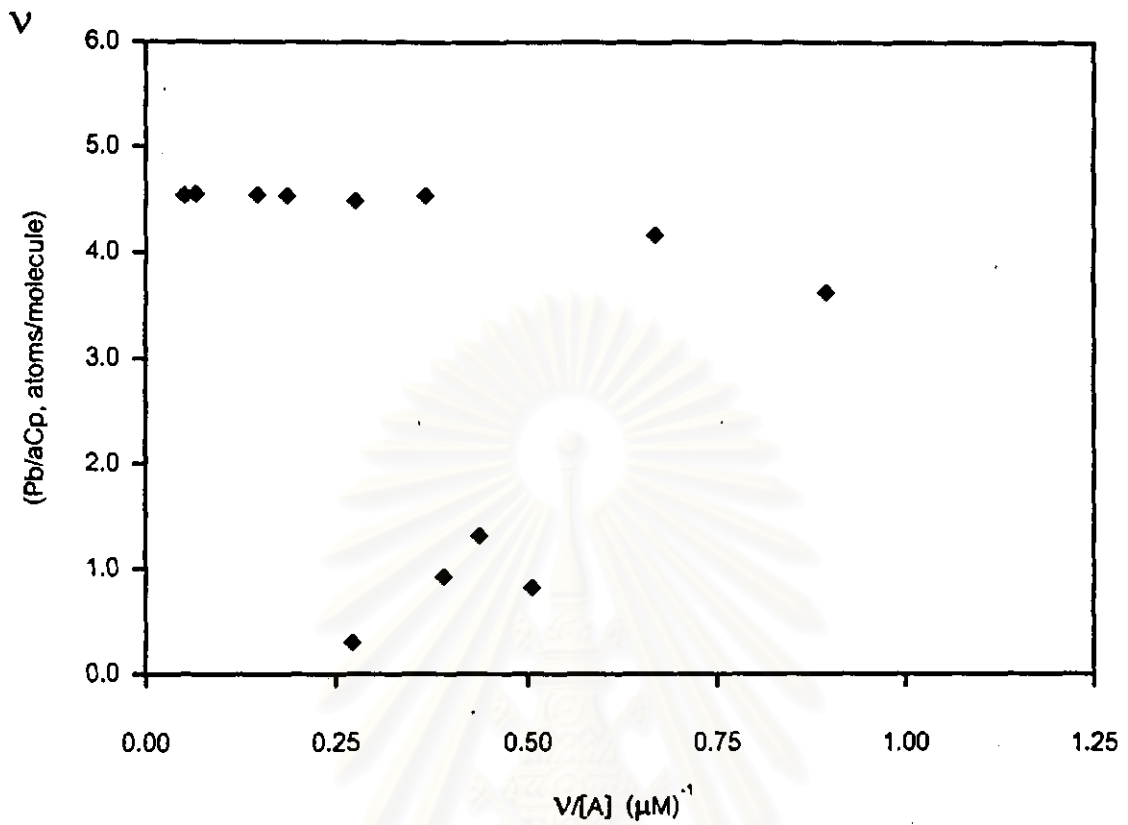
รูปที่ 17 การเขียนกราฟ Double Reciprocal Plot ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมิน กับตะกั่ว

นำค่าที่ได้จากรูปที่ 16 มาเขียนกราฟในรูปแบบ Double Reciprocal Plot ดังสมการ

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk[A]}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Scatchard Plot of Pb Binding on Apocerutoplasmin

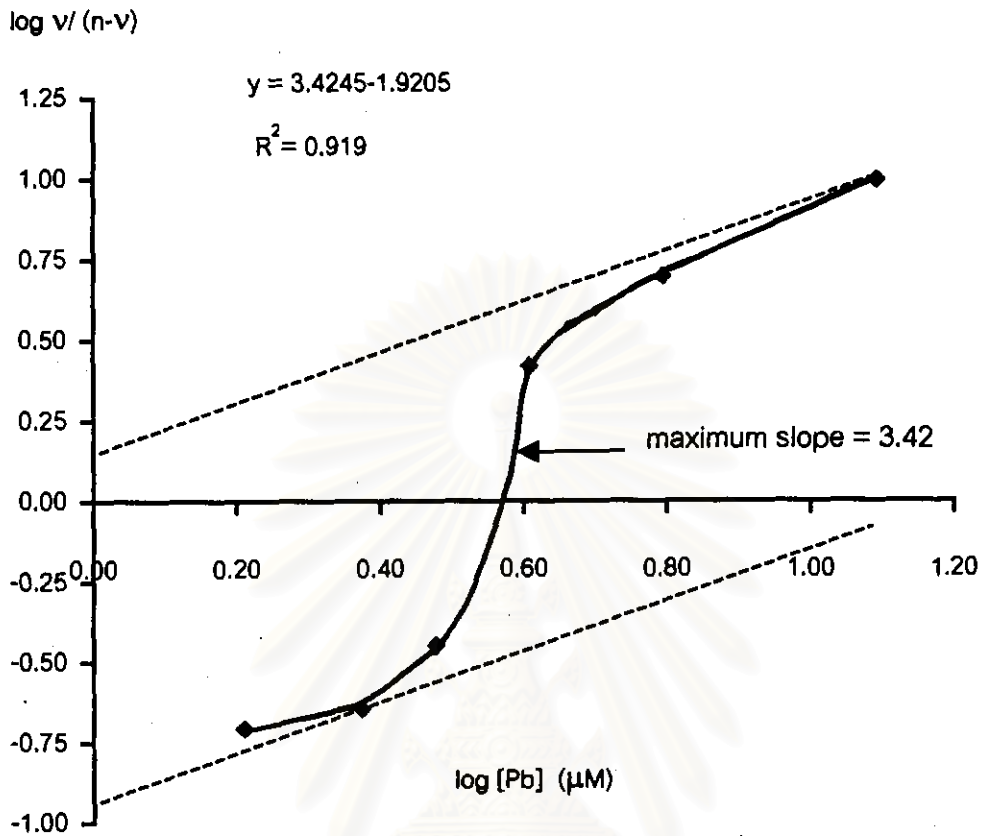


รูปที่ 18 การเขียนกราฟแบบ Scatchard Plot ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโพลาสมินกับตะกั่ว นำค่าที่ได้จากรูปที่ 16 มาเขียนกราฟรูป Scatchard plot ตามสมการ

$$v = n - K_d \frac{v}{[A]}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Hill Plot of Pb Binding on Apoceruloplasmin



รูปที่ 19 การเขียนกราฟแบบ Hill Plot ของการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว
นำค่าที่ได้จากรูปที่ 16 มาเขียนกราฟรูป Hill Plot ดังสมการ

$$\log \frac{v}{(n-v)} = \log k_n + n_H \log [A]$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากสมการที่ (1). เราสามารถเขียนกราฟแบบ saturation curve ได้ดังรูปที่ 16 จากผลการทดลองนี้สามารถอ่านค่าจำนวนตะกั่วที่จับกับอะโปเซอรูโลพลาสมินเท่ากับ 4.60 อะตอมต่อโมเลกุล และค่าคงที่ของการแตกตัว (K_d) 3.45 μM แต่ลักษณะของกราฟเป็นรูป Sigmoidal ไม่ใช่ไฮเพอร์โบลา ดังนั้นการจับตัวของตะกั่วกับอะโปเซอรูโลพลาสมิน น่าจะเป็นแบบ cooperativity กราฟแบบ double reciprocal plot (รูปที่ 17) และแบบ Scatchard plot (รูปที่ 18) จึงไม่ให้กราฟรูปเส้นตรง แสดงว่าการจับระหว่างตะกั่วเป็นแบบ positive cooperation binding

การที่ Saturation curve มีลักษณะเป็นรูป sigmoidal ไม่ใช่ไฮเพอร์โบลา จึงต้องใช้สมการของ Hill มาอธิบายการจับระหว่างอะโปเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว แทนสมการของ Scatchard ดังสมการ (5)

$$\log \frac{v}{(n-v)} = \log k_n + n_H \log [A] \dots \dots \dots (5)$$

เมื่อ n_H = maximum Hill slope

K_n = ค่าคงที่ของการรวมตัว (association constant)

จากรูปที่ 19 พบว่าค่า maximum Hill slope (n_H) = 3.42

โดยสำหรับแบบ strong binding มีค่า dissociation constant คือ 1.10 μM และจำนวนตะกั่วที่จับกับอะโปเซอรูโลพลาสมิน (n) คือ 2.54 อะตอมต่อโมเลกุล

โดยสำหรับแบบ weak binding มีค่า dissociation constant คือ 2.67 μM และจำนวนตะกั่วที่จับกับอะโปเซอรูโลพลาสมิน (n) คือ 2.84 อะตอมต่อโมเลกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

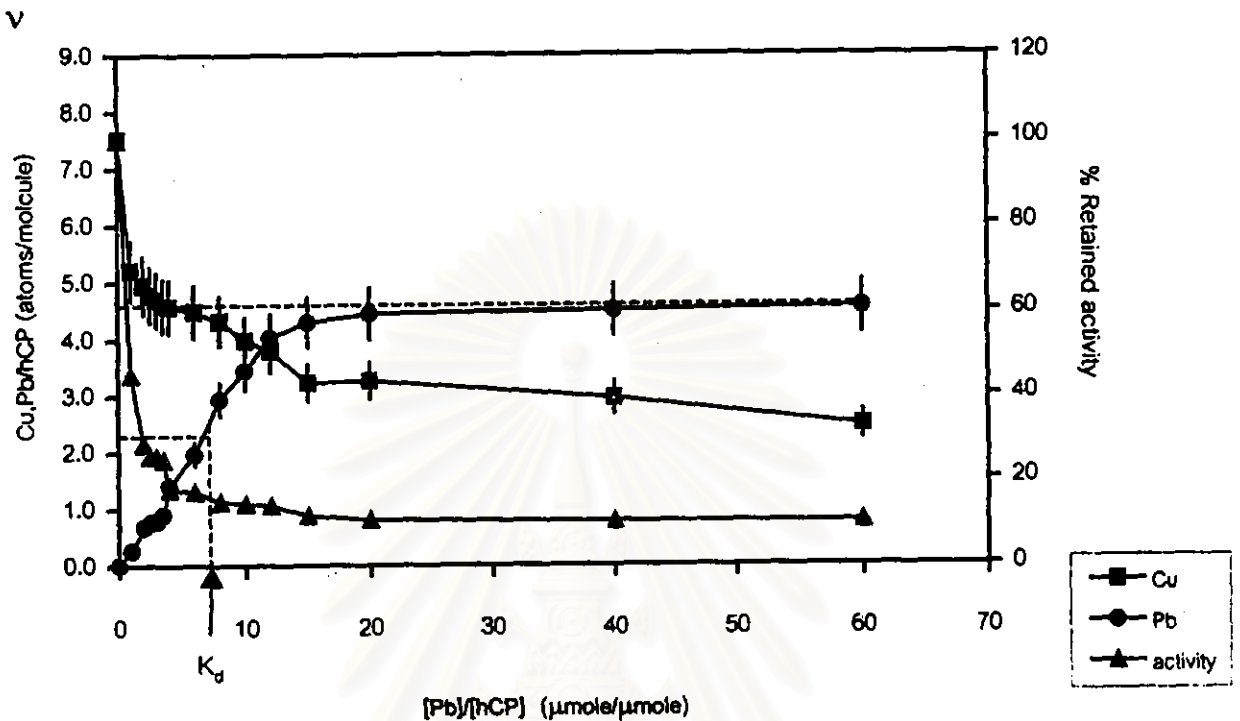
5. ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมีนต่อการจับกับตะกั่ว (Kinetics of lead binding on holoceruloplasmin)

เนื่องจากในสภาวะปกติเซอร์ูโลพลาสมีนในร่างกายอยู่ในรูปที่มีทองแดง 90% (holoceruloplasmin) (Kingston *et al.*, 1977; Takahashi *et al.*, 1984) ดังนั้นเพื่อทำนายความสามารถของตะกั่วที่แทนที่ทองแดงในเซอร์ูโลพลาสมีน จึงได้ศึกษาจลนพลศาสตร์ของไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมีนต่อการจับตะกั่ว และในขณะที่เดียวกันก็ติดตามปริมาณทองแดงที่เหลืออยู่บนโมเลกุลของเซอร์ูโลพลาสมีน และออกซิเดส แอคติวิตีด้วย

ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 20-24 จากรูปที่ 20 พบว่าตะกั่วสามารถจับกับไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมีนได้ เมื่อปริมาณของตะกั่วในไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมีนเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณทองแดงและค่าออกซิเดส แอคติวิตีจะลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณตะกั่วที่จะเข้าจับกับไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมีนเป็นจำนวนมากก็ตาม อัตราส่วนจำนวนโมลของตะกั่วต่อไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมีนตั้งแต่ 1-60 เท่า พบว่าที่อัตราส่วนจำนวนโมลของตะกั่วเป็น 20 เท่าปริมาณตะกั่วที่เข้าจับกับไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมีนเริ่มอิ่มตัว และไม่เปลี่ยนแปลงจนถึงอัตราส่วนของจำนวนโมลเป็น 60 เท่า ปริมาณทองแดงในโมเลกุลของไฮโดรเซอร์ูโลพลาสมีนยังคงเหลืออยู่คือ 2.74 อะตอมต่อโมเลกุล และค่าออกซิเดส แอคติวิตีเหลืออยู่ 10.3%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effect of Pb Concentration on Cu and Oxidase activity on Holoceruloplasmin



รูปที่ 20 ผลของความเข้มข้นของตะกั่วต่อการลดลงของทองแดงและออกซิเดส แอคติวิตีของ

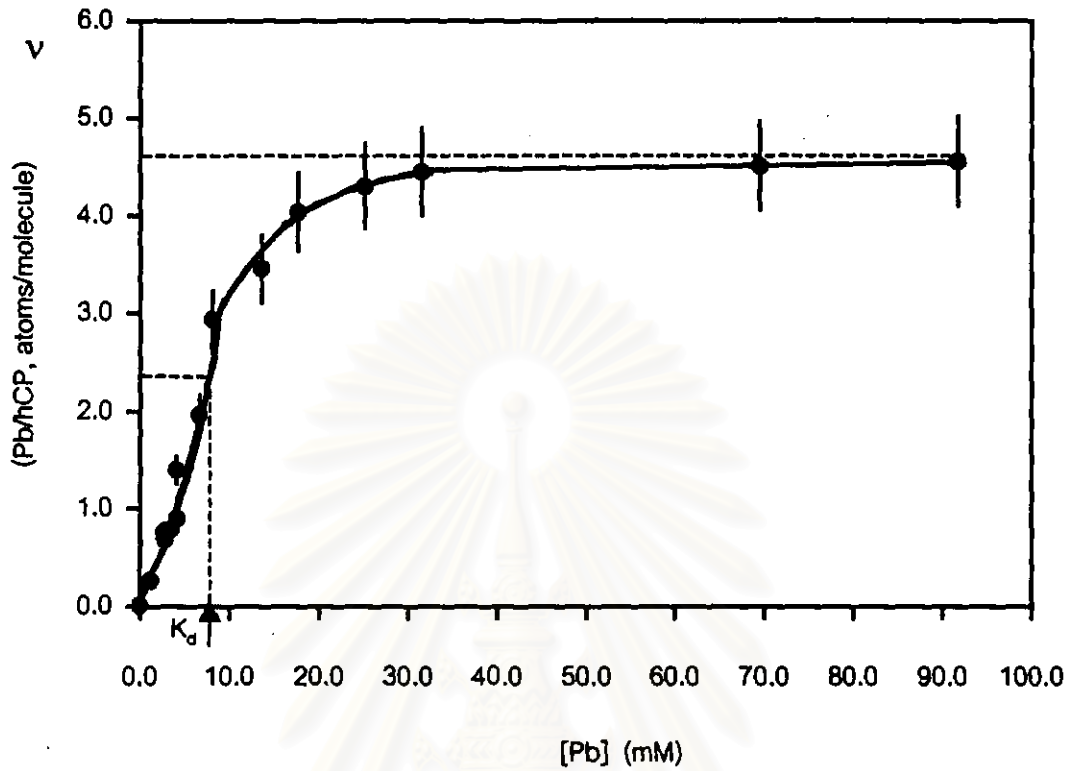
โฮโลเซอรูโลพลาสมีน

ปมโฮโลเซอรูโลพลาสมีน (0.84 mg/ml, 1923.5 unit) ปริมาตร 70 μl กับ

$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1.59, 3.18, 4.77, 5.56, 6.36, 9.54, 12.72, 19.08, 23.85, 31.80, 38.16, 76.32 และ 95.4 μM ใน 0.01 M acetate buffer, pH 6.0 (ปริมาตรรวม 280 μl) ความเข้มข้นสุดท้ายของโฮโลเซอรูโลพลาสมีนเท่ากับ 1.59 μM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลา 30 นาที นำสารละลายมาผ่าน Sephadex G-25 column (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 1) เก็บสารละลายส่วนที่เป็นโฮโลเซอรูโลพลาสมีน 900 μl นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 6) วิเคราะห์ออกซิเดส แอคติวิตี (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 3) วิเคราะห์ปริมาณทองแดงและตะกั่วโดยวิธี graphite furnace atomic absorption (ตามวิธีทำการทดลองข้อ 2.2.1 และ 2.2.2) ผลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 การทดลอง

v คือ ทองแดงหรือตะกั่วที่จับโมเลกุลโฮโลเซอรูโลพลาสมีน หน่วยเป็น อะตอมต่อโมเลกุล

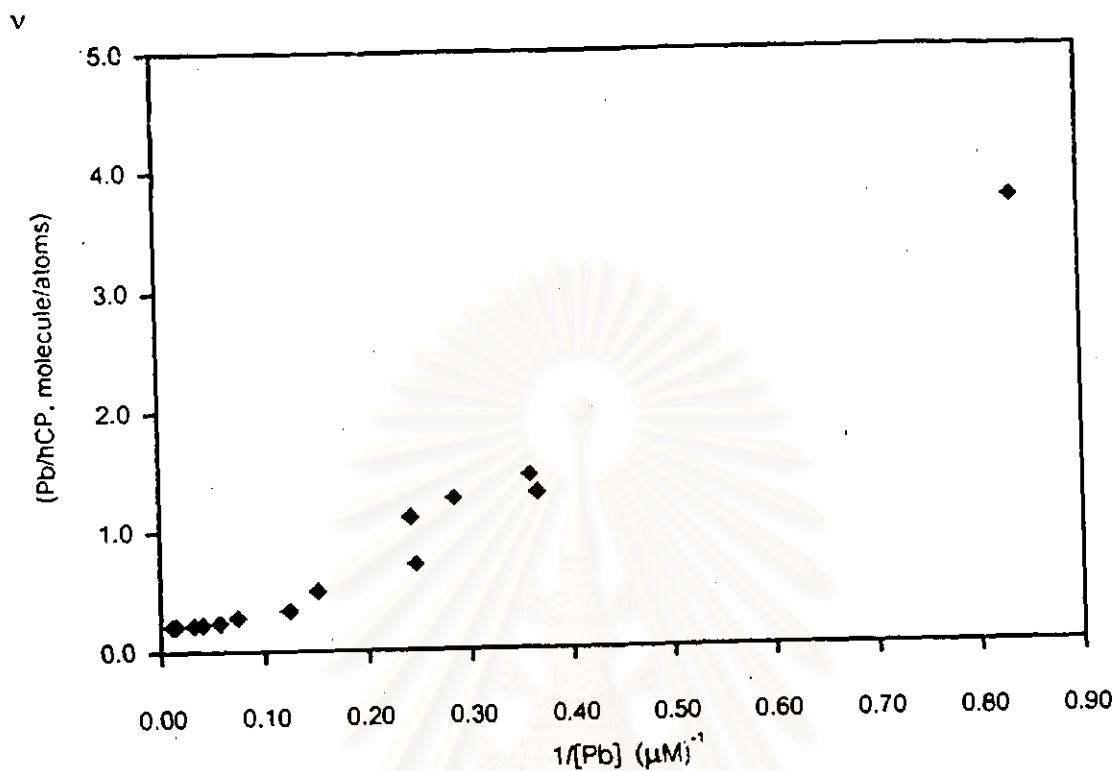
Saturation Curve of Pb Binding on Holoceruloplasmin



รูปที่ 21 การเขียนกราฟแบบ Saturation curve ของการจับระหว่างโฮโลเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว นำค่าที่ได้จากรูปที่ 20 มาเขียนกราฟเฉพาะโฮโลเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว v คือ ตะกั่วที่จับอยู่กับโฮโลเซอรูโลพลาสมิน หน่วยเป็นอะตอมต่อโมเลกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Double Reciprocal Plot of Pb Binding on Holoceruloplasmin



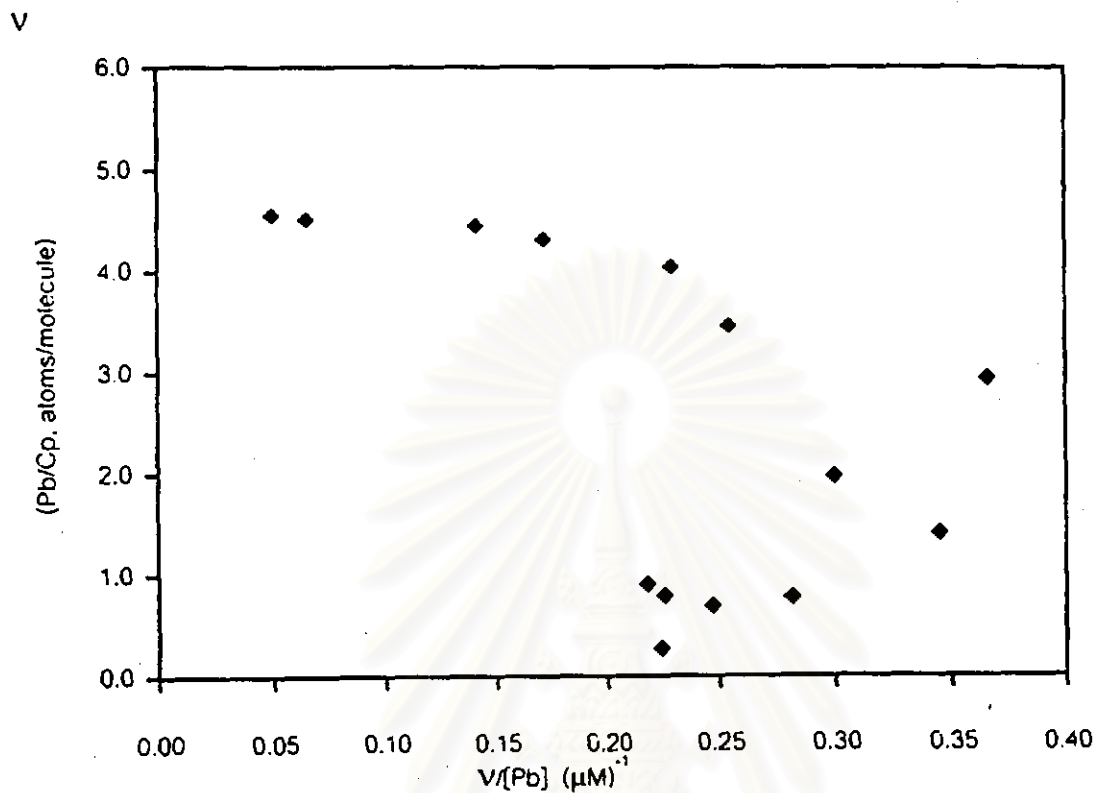
รูปที่ 22 การเขียนกราฟแบบ double reciprocal plot ของการจับระหว่างโฮโลเซอรูโลพลาสมีน กับตะกั่ว

นำค่าที่ได้จากรูปที่ 20 มาเขียนกราฟรูป double reciprocal plot ตามสมการ

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk[A]}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Scatchard Plot of Pb Binding on Holoceruloplasmin

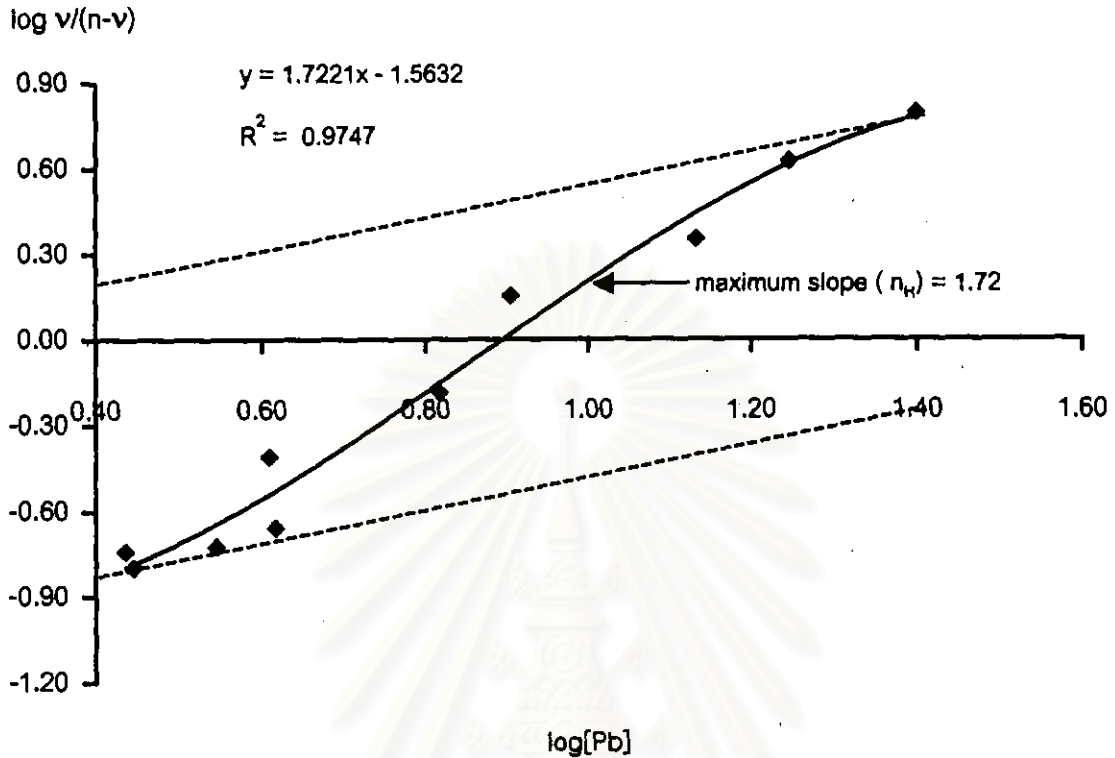


รูปที่ 23 การเขียนกราฟแบบ Scatchard plot ของการจับระหว่างโฮโลเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว นำค่าที่ได้จากกราฟรูปที่ 20 มาเขียนกราฟรูป Scatchard plot ตามสมการ

$$\frac{v}{[A]} = nk - vk$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Hill Plot of Pb Binding on Holoceruloplasmin



รูปที่ 24 การเขียนกราฟแบบ Hill plot ของการจับระหว่างโฮโลเซอรูโลพลาสมินกับตะกั่ว
นำค่าที่ได้จากรูปที่ 20 มาเขียนกราฟรูปแบบ Hill plot ตามสมการ

$$\log \frac{v}{(n-v)} = \log k_n + n_H \log[A]$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำข้อมูลจากรูปที่ 21 มาเขียนกราฟแบบ saturation curve พบว่าการเข้าของตะกั่วที่จับกับไฮโดรอกซิโลพลาสมินได้รูปกราฟแบบ saturation curve เป็นแบบ sigmoidal ไม่เป็นไฮเพอร์โบล่าที่ชัดเจน ดังนั้นรูปกราฟแบบ Double reciprocal plot (รูปที่ 22) และแบบ Scatchard plot (รูปที่ 23) จึงไม่เป็นเส้นตรง แสดงว่าการจับระหว่างไฮโดรอกซิโลพลาสมินกับตะกั่วเป็นแบบ positive cooperativity

จากสมการที่ (1) เราสามารถเขียนกราฟแบบ saturation curve ได้ดังรูปที่ 21 จากผลการทดลองนี้สามารถอ่านค่าจำนวนของตะกั่วที่จับกับไฮโดรอกซิโลพลาสมิน (n) ได้ 4.60 อะตอมต่อโมเลกุล และค่าค่าคงที่ของการแตกตัว (K_d) เท่ากับ $6.95 \mu\text{M}$ แต่ลักษณะของกราฟเป็นรูป sigmoidal ไม่ใช่รูปไฮเพอร์โบล่า ดังนั้นการจับตัวของตะกั่วกับไฮโดรอกซิโลพลาสมินน่าจะเป็นแบบ cooperativity และจาก double reciprocal plot (รูปที่ 22) จึงไม่ให้ออกกราฟเป็นเส้นตรง

การที่ saturation curve มีลักษณะเป็นรูป Sigmoidal ไม่ใช่แบบไฮเพอร์โบล่า จึงต้องใช้สมการของ Hill มาอธิบายการจับตัวของตะกั่วกับไฮโดรอกซิโลพลาสมิน เพื่อใช้อธิบายการจับแบบ cooperativity แทนสมการ Scatchard ซึ่งใช้อธิบายได้เฉพาะเมื่อไม่มีความเกี่ยวข้องระหว่างแต่ละ binding site แสดงในรูปที่ 23 ดังสมการ (5)

ค่า (n) จากรูปที่ 24 พบว่าค่า maximum Hill slope (n_H) คือ 1.72 ซึ่งมีค่ามากกว่า 1 แสดงว่าการจับของตะกั่วกับไฮโดรอกซิโลพลาสมินคาดว่าเป็นแบบ positive cooperative binding

โดยสำหรับแบบ strong binding มีค่า dissociation constant คือ $0.54 \mu\text{M}$ และจำนวนตะกั่วที่จับกับไฮโดรอกซิโลพลาสมิน (n) คือ 1.49 อะตอมต่อโมเลกุล

โดยสำหรับแบบ weak binding มีค่า dissociation constant คือ $2.80 \mu\text{M}$ และจำนวนตะกั่วที่จับกับไฮโดรอกซิโลพลาสมิน (n) คือ 1.79 อะตอมต่อโมเลกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย