

การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของกลูตาไธโอน เอส-ทรานส

เฟอเรสในยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* B

Purification and characterization of glutathione S-transferases from the

mosquito *Anopheles dirus* species B

ได้รับทุนวิจัยงบประมาณประจำปี 2539

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผู้เขียนรายงานการวิจัย

ละเอียด ประพันธ์ดารา

สุรางจิตต์ คุตตะเทพ

นงคราญ ลำจวน (พรหมเทศ)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณประจำปี 2539
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ในยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* B

วิธีการแยกสกัดกลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสจากยุงก้นปล่อง *Anopheles gambiae* ได้ถูกนำมาปรับปรุงและใช้สำหรับยุง *An.dirus* พบว่ามี GST อยู่ 5 isoenzymes ที่แยกได้จาก *An.dirus* ได้แก่ GST-4a GST-4b GST-4c GST-5 และ GST-6 isoenzyme 3 ชนิด แรกจัดอยู่ใน Class I ของ GST ในแมลง ส่วน 2 ชนิดหลังเป็น Class II อัตราส่วนของ CDNB conjugating activity ของแต่ละ isoenzyme คิดเป็นร้อยละ 19.6 1.3 1.2 1.55 และ 2.3 ตามลำดับ ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีวศาสตร์ ความจำเพาะต่อสับสเตรท การมีปฏิกิริยากับตัวยับยั้ง และสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ พบว่า isoenzyme ทุกตัวสามารถใช้ CDNB เป็นสับสเตรทได้เป็นอย่างดี ในขณะที่กับสับสเตรทตัวอื่น ๆ ไม่ค่อยดีนัก isoenzyme ทุกตัวยกเว้น GST-5 สามารถเร่งปฏิกิริยา DDT-dehydrochlorination ได้ในระดับต่าง ๆ กัน โดยรวมแล้ว GST isoenzyme ที่แยกได้จาก *An.dirus* จะมีคุณสมบัติทางการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างจาก *An.gambiae* เช่น GST-4a GST-4b GST-4c จาก *An.dirus* สามารถเร่ง DDT-dehydrochlorination ได้ในขณะที่ enzyme เหล่านี้ที่สกัดได้จาก *An.gambiae* ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาชนิดนี้ได้ GST-6 ใน *An.dirus* มี DDTase activity สูงที่สุดในขณะที่ใน *An.gambiae* GST-5 เป็น isoenzyme ที่มี DDTase activity สูงสุด ผลการศึกษาปฏิกิริยาต่อสารเคมีฆ่าแมลงพบว่า GST ใน *An.dirus* สามารถมีปฏิกิริยากับสารเคมีฆ่าแมลงได้ดีมาก ในการศึกษาครั้งก่อนนั้นใน *An.dirus* ได้มีการแยก GST-4a ให้บริสุทธิ์และนำไปศึกษาคุณสมบัติ (Prapanthadara et. al. Characterization of the major form of glutathione S-transferase in the mosquito *An. dirus*. Insect Biochem. Molec. Biol. 1996, 26: 277-285) ส่วนในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัด GST-4c ให้บริสุทธิ์ isoenzyme นี้ มีค่า V 23.2 umole/min/mg ค่า Km CDNB 0.08 mM และ Km GSH 0.18 mM จากการศึกษา 150 พบว่า GST-4c มีคุณสมบัติเป็น heterozygous ซึ่งอาจจะประกอบด้วยหน่วยย่อยสองหน่วยที่ไม่เหมือนกัน

ABSTRACT

Purification and characterization of glutathione S-transferases from the mosquito *Anopheles dirus* species B

The method for isolation of glutathione S-transferase (GST) isoenzymes from *Anopheles gambiae* was slightly modified and employed for the Thai mosquito, *An. dirus* B. There were 5 isoenzymes fractionated, GST-4a, GST-4b, GST-4c, GST-5 and GST-6. The first three isoenzymes belong to insect class I GST and the last two are class II. The percent constitution of each isoenzyme to the total measured CDNB conjugating activity in this species are 19.6, 1.3, 1.2, 1.55 and 2.3 for GST-4a, GST-4b, GST-4c, GST-5 and GST-6 respectively. All these isoenzymes were partially characterized with substrates, inhibitors and various insecticides. All the isoenzymes prefer CDNB as the electrophilic substrates with very low or no detectable activity with other GST general substrates. All the isoenzymes except GST-5 can metabolize DDT to different extents. The *An. dirus* isoenzymes act differently from the correspondent isoenzymes purified from *An. gambiae*. Class I GSTs, GST-4a, GST-4b and GST-4c from the *An. dirus* catalysed DDT-dehydrochlorination whereas *An. gambiae* isoenzymes did not. The majority of DDTase activity in *An. dirus* present in GST-6 instead of in GST-5 as reported for the *An. gambiae*. Inhibition study of *An. dirus* GSTs demonstrates a strongly interaction with various insecticides. GST-4a had been earlier purified and characterized (Prapanthadara *et al.* *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 3, 277-285, 1996). In this paper the second GST isoenzyme of anopheline species, GST-4c, is biochemically purified to homogeneity according to SDS-PAGE. The maximum velocity (V), K_m GSH and K_m CDNB are 23.2 μ mole/min/mg, 0.18 mM and 0.08 mM respectively. Simple I_{50} study of the GST-4c suggests the heterozygous properties of the isoenzyme. It is probably composed of the two distinct subunits.

สารบัญเรื่อง (Table of contents)

เนื้อเรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	7
สารบัญภาพ	8
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
1. บทนำ	10
วัตถุประสงค์ในการศึกษา	11
2. วัสดุและอุปกรณ์การทดลอง	11
2.1 ยุงก้นปล่อง	11
2.2 สารเคมี	11
2.2.1 สารเคมีที่เป็นสปีสเตรทหรือตัวยับยั้ง	11
2.2.2 สารเคมีที่ใช้ทำ column chromatography	12
2.2.3 สารเคมีสำหรับ Electrophoresis	12
2.2.4 สารเคมีที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์	13
2.2.5 สารเคมีที่เป็นยาฆ่าแมลง	13
2.2.6 สารเคมีสำหรับ HPLC ซื้อจาก Sigma	13
2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
2.3.1 เครื่องมือทำ Column chromatography	14
2.3.2 เครื่องอ่าน microtitre plate	14
2.3.3 Refrigerated benchtop centrifuge Beckman	14
2.3.4 micropipet ชนิดต่างๆ	14
3. วิธีการทดลอง	14
3.1 การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์	14
3.1.1 การเตรียมสารละลายเอ็นไซม์หยาบ (crude extract)	14
3.1.2 Q-Sepharose chromatography	15
3.1.3 Affinity chromatography	15

เนื้อเรื่อง

หน้า

3.1.4 Hydroxylapatite chromatography	16
3.1.5 Hydrophobic chromatography	16
3.2 การจัดเก็บเอ็นไซม์ภายหลังการแยกให้บริสุทธิ์	17
3.3 การวัด GST activity	17
3.4 การวัดความเข้มข้นของโปรตีน	18
3.5 การศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์	18
3.5.1 การศึกษาการมีคุณสมบัติ DDT-dehydrochlorinase	18
3.5.2 การศึกษาค่า specific activity ต่อสปีสเตรทชนิดต่าง ๆ	19
3.5.3 การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์	20
3.5.4 การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้ง activity โดยสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ	20
3.5.5 การศึกษาค่า I ₅₀	21
3.5.6 การศึกษาคุณสมบัติการมีปฏิกิริยากับสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ	21
4. ผลการทดลอง	21
4.1 การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์	21
4.3 การศึกษาค่า specific activity ต่อสปีสเตรทชนิดอื่น ๆ	22
4.4 คุณสมบัติทางจลนศาสตร์	23
4.5 คุณสมบัติการถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ	23
4.6 การศึกษาค่า I ₅₀	23
4.7 การศึกษาคุณสมบัติการมีปฏิกิริยาเคมีกับสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ	24
6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
เอกสารอ้างอิง	26

สารบัญตาราง(List of tables)

เนื้อเรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการตรวจวัด activity ต่อสับสเตรทชนิดต่าง ๆ	28
ตารางที่ 2 สรุปการแยกสกัดเอ็นไซม์กลูตาไธโอนเอส-ทรานสเฟอเรสจากลูกน้ำ ยุงก้นปล่อง <i>Anopheles dirus</i> B	29
ตารางที่ 3 สรุปค่า DDT-dehydrochlorinase activity ของเอ็นไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสจากลูกน้ำยุงก้นปล่อง <i>Anopheles dirus</i> B	30
ตารางที่ 4 ผลการศึกษาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอ็นไซม์ GST-4a, GST-4b และ GST-4c โดยใช้ GSH และ CDNB เป็นสับสเตรท	31
ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์การถูกยับยั้งของ GST CDNB conjugating activity โดยสับสเตรทชนิดอื่นๆ	32
ตารางที่ 6 ผลการศึกษาเปอร์เซนต์การถูกยับยั้งของ GST CDNB conjugating activity โดยสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ	33

สารบัญภาพ (List of illustrations)

เนื้อเรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 แผนภูมิขั้นตอนการแยกสกัด GST จากลูกน้ำระยะที่ 4 ของยุงก้นปล่อง <i>An.dirus</i> B	24
รูปที่ 2 กราฟแสดงการแยก GST ให้บริสุทธิ์จากลูกน้ำระยะที่ 4 ของยุงก้นปล่อง <i>An.dirus</i> B โดยวิธี column chromatography	25
รูปที่ 3 SDS-PAGE ของ GST ชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้	26
รูปที่ 4 IC50 plot ของการยับยั้ง activity ของ GST-4c โดยตัวยับยั้ง 3 ชนิด คือ ethacynic acid Bromosulphophthalein และ Cibacron Blue 3 GA	27

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ACN	=	Acetonitrile
AUFS	=	Absorbance Unit Full Scale
BSA	=	Bovine Serum Albumin
CDNB	=	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
DDD	=	6,6-Dithiodi-2-naphthol
DDE	=	1,1-Dichloro-2,2-bi-[p-Chlorophenyl]ethane
DDT	=	1,1,1-Trichloro-2,2-bi-[p-chlorophenyl]ethane
DDTase	=	DDT-dehydrochlorinase
GSH	=	Glutathione
GST	=	Glutathione S-transferase
mM	=	milli molar
ml	=	millilitre
NaCl	=	Sodium chloride
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
μ l	=	microlitre
HPLC	=	Hyperformance Liquid Chromatography

1. บทนำ

มาลาเรียเป็นโรคภัยที่คร่าชีวิตผู้คนที่อยู่อาศัยแถบชนบทในเขตร้อนชื้นอยู่เป็นอันมาก มาตรการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคนี้ที่ได้ผลมากที่สุดในปัจจุบัน คือ การควบคุมประชากร ยุงพาหะโดยใช้ยาฆ่าแมลง ในประเทศไทย ปัจจุบันแม้ว่าจะสามารถลดความรุนแรงของการเกิด โรคมาลาเรีย ลงได้แล้วในหลายพื้นที่ แต่มาลาเรียก็ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอยู่ โดยเฉพาะบริเวณท้องที่ห่างไกลท้องที่ป่าเขาและบริเวณชายแดนไทย-ลาว, กัมพูชา และพม่า ดังนั้นใน ปัจจุบันนี้จึงยังมีความจำเป็นในการใช้สารเคมีดีดีที ในการควบคุมยุงพาหะของโรคมาลาเรียอยู่ใน หลายพื้นที่

ปัจจุบันนี้ในประเทศต่าง ๆ รอบ ๆ ประเทศไทย เช่น พม่า, อินเดีย, และศรีลังกา และ ประเทศในแถบอัฟริกา ต้องประสบความล้มเหลวในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคมาลาเรีย เนื่องจากยุงก้นปล่องพาหะได้พัฒนาขึ้นมาดื้อต่อยาฆ่าแมลงต่าง ๆ ที่ใช้อยู่ซึ่งได้แก่ยาจำพวก DDT, HCH, dieldrin และ malathion การจัดการกับปัญหาการดื้อยาในหมู่ประชากรยุงยังไม่ ประสบความสำเร็จ เนื่องจากยังขาดแคลนความรู้ทางวิชาการ และสาเหตุของการดื้อยานั้น ๆ ปัจจุบันนี้มียาฆ่าแมลงชนิดใหม่ ๆ ผลิตออกมาซึ่งมีแนวโน้มจะใช้ได้ผลดีในแง่การกำจัดและควบคุมประชากรยุงพาหะ แต่อย่างไรก็ตามยาฆ่าแมลงชนิดใหม่ ๆ เหล่านี้มีราคาอยู่ในระดับแพง และ ผลข้างเคียงต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงก็ยังคงต้องได้รับการตรวจสอบต่อไปอีกด้วย

กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (Glutathione S-transferase, GSTs) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ช่วยเร่งขบวนการทำลายสารพิษในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ขบวนการดังกล่าวนี้คือการที่ Glutathione (GSH) ไปจับกับสารพิษที่มีคุณสมบัติเป็น electrophile ด้วยปฏิกิริยาที่เรียกว่า "conjugation" ทำให้ได้สารประกอบใหม่ที่ลดความรุนแรงลงไปและยังละลายน้ำได้ดีขึ้น พร้อมทั้งจะถูกกำจัดออกไป (1) สาเหตุที่นักวิจัยมีความสนใจศึกษาถึง GSTs ในแมลงนั้น เนื่องมาจากเอนไซม์นี้มีหน้าที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาฆ่าแมลงต่าง ๆ เช่น organochlorine และ organophosphorus มีรายงานจากการศึกษาเบื้องต้นถึงการดื้อยาในแมลงวันตามบ้าน พบว่าได้ ตรวจพบ activity ที่เพิ่มขึ้นของ GST ในสารละลายโปรตีนที่ได้จากการบดแมลงวันในบัฟเฟอร์ (2, 3,4) ลักษณะการเกิดขึ้นของ GSTs ในสิ่งมีชีวิตนั้น เอนไซม์นี้มีปรากฏเป็นหลายชนิดที่เรียกว่า isoenzyme ซึ่งแต่ละ isoenzyme นั้น จะมีคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างกันออกไป ตามชนิดของยา ฆ่าแมลงที่ทดสอบ เช่น การเร่งการทำลาย DDT นั้น GST เร่งขบวนการ dehydrochlorination ทำให้ DDT สลายตัวเป็น DDE (5) ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นในภาวะที่มี GSH แม้ว่าจะไม่เกิดขบวนการ GSH conjugation ได้มีรายงานว่าขบวนการ dehydrochlorination นี้ เป็นกลไกที่สำคัญ

สำหรับการดื้อยา DDT ในยุงก้นปล่อง (6, 7) ส่วนกรณีสารประกอบ organophosphorus นั้น GST เร่งขบวนการ GSH conjugation (8, 9)

งานวิจัยที่ผ่านมาเราได้แสดงให้เห็นว่า ในยุงก้นปล่อง *An.gambiae* มี GST ปรากฏอยู่เป็นหลาย isoenzyme ซึ่งแต่ละ isoenzyme นั้นมีระดับของ DDT-dehydrochlorinase activity มากน้อยแตกต่างกันออกไป (10) และ GSTs ที่พบในยุงดื้อยา DDT มีระดับ DDT-dehydrochlorinase activity สูงกว่า GSTs ที่พบในยุงที่ไวต่อยา ในการศึกษาครั้งนั้นเรายังไม่สามารถทำการแยกให้บริสุทธิ์ของ isoenzyme แต่ละชนิดเพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ อย่างลึกซึ้งได้ ในการศึกษาที่จะทำต่อไปนี้เราจึงต้องการจะแยกเอา isoenzyme บริสุทธิ์ มาเพื่อทำการศึกษา และเปรียบเทียบคุณสมบัติกับ GSTs อื่น ๆ ที่ได้ศึกษาไว้แล้วในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์ในการศึกษา

ต้องการแยก glutathione S-transferase แต่ละ isoenzyme ให้บริสุทธิ์ และนำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและ enzyme kinetic รวมทั้งความสามารถในการจับสารเคมีฆ่าแมลง

2. วัสดุและอุปกรณ์การทดลอง

2.1 ยุงก้นปล่อง

ยุงก้นปล่องที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ ยุงก้นปล่องชนิด *An.dirus* species B ซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลง ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ยุงสายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์เดียวกับชนิดที่ใช้ในการศึกษาในครั้งก่อน (11) ซึ่งทำการแยกสกัด GST-4a ให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติทางจุลนศาสตร์ ตัวอย่างยุงก้นปล่องที่ใช้ศึกษานี้เป็นลูกน้ำระยะที่ 4 ซึ่งจะถูกนำมาแช่แข็งทันที (Snap frozen) โดยใช้ไนโตรเจนเหลวแล้วแช่เก็บไว้ ณ อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาทดลอง

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีที่เป็นสับสเตรทหรือตัวยับยั้ง

สารเคมีจาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)

Reduced glutathion

S-hexylglutathione

1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene

Ethacrynic acid

Bromosulphophthalein

Cumenehydroperoxide

4-nitropyridine-N-oxide

1,2-Epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) (NADPH) Glutathione reductase

Cibacron Blue 3GA

สารเคมีจาก Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)

1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB)

trans-4-phenyl-3-buten-2-one

p-Nitrophenethyl bromide

2.2.2 สารเคมีที่ใช้ทำ column chromatography

จาก Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)

S-hexylglutathione agarose

จาก Pharmacia LKB (Uppsala, Sweden)

Q-Sepharose

Phenyl Sepharose

จาก Bio-Rad (Richmond, CA)

Hydroxylapatite

Protein assay reagent

2.2.3 สารเคมีสำหรับ Electrophoresis ทั้งหมดซื้อจาก Sigma

Acrylamide

N,N-methylene-bis-acrylamide

N,N,N-Tetramethylethylenediamine

Glycine

Sodium dodecyl sulphate

Ammonium persulphate

Bromophenol Blue

Mercaptoethanol

Protein molecular weight marker ^{ซื้อ}จาก Bio Rad

2.2.4 สารเคมีที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์ ใช้ reagent grade จาก Sigma หรือ BDH

Sodium hydrogen phosphate

disodium hydrogen phosphate

Trizma base

Hydrochloric acid

Sodium chloride

Ethylene glycol

Glycerol

2.2.5 สารเคมีที่เป็นยาฆ่าแมลง ^{ซื้อ}จาก British Greyhound (Birkenhead, Merseyside, U.K.).

p,p-DDT (98.5%)

p,p-DDE (99%)

DDD

Permethrin

Lambda cyhalothrin

Fenitrothion (Sumi)

Deltamethrin

Diazenon

Primingphos-methyl

Chlorpyrifos-ethyl

Temephos

bebdicarb

2.2.6 สารเคมีสำหรับ HPLC ^{ซื้อ}จาก Sigma

Acetonitrile

Methanol

Chloroform

Isopropanol

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.3.1 เครื่องมือทำ Column chromatography

Glass Homogenizer และ Teflon pestle ซื้อจาก Wheaton

คอลัมน์ต่าง ๆ ซื้อมาจากบริษัท Amicon

Peristaltic pump, Fraction collector จาก Pharmacia

PD-10 column, concentration units จาก Millipore

Conductivity meter

PH meter

Refrigerated high speed centrifuge จาก Sorvall

2.3.2 เครื่องอ่าน microtitre plate

Ceres 900 UV900 Hdi (Bio-Tek Instrument Inc.)

NUNC Microtitre plate

2.3.3 Refrigerated benchtop centrifuge Beckman

2.3.4 micropipet ชนิดต่าง ๆ

3. วิธีการทดลอง

3.1 การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

3.1.1 การเตรียมสารละลายเอ็นไซม์หยาบ (crude extract) จากลูกน้ำ

นำลูกน้ำยุงแช่แข็งที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C ในปริมาณ 30 กรัมมาทำให้ละลายผสมกับ buffer A (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM DTT) ทำการบดโดยใช้เครื่อง Homogenizer โดยค่อย ๆ แบ่งครั้งละน้อย ๆ ทำหลาย ๆ ครั้ง จนลูกน้ำแหลกละเอียดเป็นเนื้อเดียวกับ buffer A นำสารละลายที่ได้ไปปั่นแยกโดยใช้เครื่องปั่น Refrigerated high speed centrifuge โดยใช้อัตราการปั่น 10,000 g เป็นเวลา 20 นาทีและตั้งอุณหภูมิเครื่องปั่น 4°C ภายหลังปั่นเทแยกส่วนน้ำ (supernatant) เก็บไว้ นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้อุปกรณ์ Swinnex

Disc Filter Holder (Millipore) เพื่อแยกเอาชั้นไขมันออกจาก supernatant เก็บ supernatant ที่ได้
แช่ในกระติกน้ำแข็ง เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

3.1.2 Q-Sepharose chromatography

Q-Sepharose column ที่ใช้มีขนาด 60 ml (4.4 x 4 cm) เตรียมโดยนำ Q-Sepharose gel มาบรรจุใน glass column โดยใช้อัตราเร็วสารละลาย buffer A ไหลผ่าน column 4 ml ต่อนาที
ดำเนินการทดลองในห้องเย็น (Cold room 8°C) ใช้ peristaltic pump เป็นตัวควบคุมอัตราเร็ว
การไหลผ่านของ buffer

นำสารละลาย supernatant ที่เตรียมได้มาผ่านลงใน column โดยอาศัย peristaltic pump จนกระทั่งหมด แล้วจึงล้างด้วย buffer A 300 ml (5x bed volume) ในระหว่างนี้ทำการ
เก็บสารละลายที่ไหลผ่าน column ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่ไม่เกาะติดใน column
(unbound Fraction) และตั้งชื่อว่า peak 1 หลังจากนั้นทำการชะ (elute) โปรตีนต่าง ๆ รวมทั้ง
เอนไซม์ GST ออกจาก column โดยใช้ linear gradient 0-0.30 M NaCl ซึ่งเตรียมใน buffer A
ปริมาตร 150 ml ในขั้นตอน elute นี้ ทำการเก็บสารละลายที่ไหลออกมาจาก column โดยใช้
Fraction collector ในปริมาตร 4ml/Fraction

ทำการตรวจวัดทั้งความเข้มข้นของโปรตีนและ GST activity ในแต่ละ fraction (ดูวิธีวัด
ความเข้มข้นโปรตีนและ GST activity ในหัวข้อ 3.3 และ 3.4) นำ fraction ที่มี GST activity มา
เทรวมกัน (ดู chromatogram ในหัวข้อผลการทดลอง) ว่า peak 2

3.1.3 Affinity chromatography

ใช้ column ขนาด 25 ml (2.2 x 6. cm) บรรจุด้วย S-hexylglutathione agarose ทำการ
equilibrate ด้วย buffer A อัตราเร็วการไหลของ buffer 1 ml/min นำ peak 2 มาปั๊มไล่ลงไปใน
column จนหมด แล้วล้างโดยการปั๊มสารละลาย buffer A ที่มี NaCl 0.2 M เก็บสารละลายที่ไหล
ออกจาก column ตรวจสอบจนไม่มีโปรตีนปนออกมาจึงหยุด สารละลายโปรตีนที่ไหลผ่าน
column ออกมาเทรวมกันเรียกว่า peak 3 (unbound fraction) ทำการชะ (elute) โปรตีนที่เกาะ
อยู่ใน column ด้วย สารละลาย 5 mM s-hexylglutathione ใน buffer A ที่มี NaCl 0.2 M ปริมาตร
100 ml เก็บสารละลายที่ elute ออกมารวมกันเรียกว่า peak 4

นำทั้ง peak 3 และ peak 4 มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ dialysis tube ดูดซับน้ำออกด้วย
น้ำตาลซูโครส 1 คีน ณ อุณหภูมิ 8°C ใน cold room

3.1.4 Hydroxylapatite chromatography

ใช้ column ขนาด 20 ml (2.2 x 5.3 cm) บรรจุด้วย Hydroxylapatite โดยใช้ buffer B (10 mM Sodium phosphate pH 6.5, 0.2 M NaCl, 10 mM DTT) อัตราไหลของ buffer 1 ml/min

นำสารละลายเข้มข้น peak 3 มาทำการเปลี่ยนถ่าย buffer โดยใช้ buffer B ทำได้โดย equilibrate PD-10 column ด้วย buffer B เติมสารละลายเข้มข้น peak 3 ครั้งละ 2.5 ml ลงใน PD-10 column รอจนสารละลายไหลลงใน column จนหมดเติม buffer B 3.5 ml ลงไป และเก็บสารละลายที่ไหลออกมาทันที และจนหมด ก็จะได้ peak 3 อยู่ใน buffer B

ทำสารละลาย peak 3 นี้ มาผ่านเข้าไปใน hydroxylapatite column ด้วยอัตราไหล 1 ml/min จนหมดแล้ว ล้างด้วย buffer B จนกระทั่งตรวจไม่พบมีโปรตีนใด ๆ ถูกชะออกมา ทำการ elute เอ็นไซม์ GST ออกโดยผ่าน buffer C (10 mM Sodium phosphate pH 6.5, 10 mM DTT) 80 ml และ 200 ml linear gradient 10-200 mM Sodium phosphate buffer pH 6.5 ทำการเก็บ fraction 1 ml นำไปวัดค่าความเข้มข้นโปรตีนและ GST activity ในขั้นตอนนี้ GST activity จาก fraction ต่าง ๆ แบ่งออกได้ 2 peak ตั้งชื่อว่า GST-5 และ GST-6

สารละลายเข้มข้น peak 4 จาก affinity chromatography ก็ได้ถูกนำมาแยกสกัดโดยใช้ Hydroxylapatite chromatography เช่นเดียวกันมีข้อแตกต่างกันอยู่ที่ขนาดของ column ใช้ขนาด 10ml (1.6 x 4 cm) เอ็นไซม์ที่เกาะอยู่ใน column ถูก elute ออกมาโดยใช้ buffer C 40 ml และ 100 ml linear gradient GST activity ที่แยกได้แบ่งออกเป็น 3 peak ตั้งชื่อว่า GST-4a GST-4b และ GST-4c ตามลำดับ

3.1.5 Hydrophobic chromatography

chromatography ชนิด hydrophobic นี้ใช้ Phenyl Sepharose เป็นวัสดุในการเตรียม column ขนาดของ column 10 ml (1.6 x 4 cm) buffer ได้แก่ 0.3 M sodium phosphate pH 6.5 ซึ่งมี 2M NaCl เป็นส่วนประกอบเอ็นไซม์ GST ที่จะผ่านการแยกสกัดด้วย column นี้ จะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้หลอด Concentration unit (Millipore) และปั่นในเครื่อง Refrigerated benchtop centrifuge แล้วทำการเปลี่ยนจาก buffer เดิมเป็น buffer D โดยใช้ PD-10 column ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว ทำสารละลายเอ็นไซม์ไปผ่าน column Phenyl Sepharose ที่เตรียมได้ แล้วชะล้างโปรตีนที่ไม่เกาะ (unbound protein) ออกด้วย buffer D จนกระทั่งตรวจวัดไม่พบโปรตีนในสารละลายที่ชะออกมาจาก column ทำการ elute เอ็นไซม์ออกเป็นลำดับดังนี้ 1) 30 ml 0.3 M sodium phosphate buffer pH 6.5 2) 60 ml linear gradient 0.3-0.01 M sodium phosphate buffer pH 6.5 3) 40 ml 25m M Tris-HCl buffer pH 7.4 4) 40 ml 25 mM Tris-HCl buffer pH

7.4 และ 30% ethylene glycol. เก็บ fraction ครั้งละ 1 ml นำมาวัดค่าความเข้มข้นโปรตีนและ GST activity

3.2 การจัดเก็บเอ็นไซม์ภายหลังการแยกให้บริสุทธิ์

เอ็นไซม์ GST ที่แยกสกัดได้ทุกตัวจะนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ concentration units (Millipore) และเปลี่ยนถ่าย buffer จากเดิมมาเป็น 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 เติม glycerol ลงไปจนได้ 40% โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนในสารละลายไม่ต่ำกว่า 0.1 mg/ml ทำสารละลายจัดเก็บในตู้แช่แข็ง -20°C เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

3.3 การวัด GST activity

GST activity โดยทั่วไปวัดโดยใช้ CDNB เป็น electrophilic substrate ความเข้มข้นของ สับสเตรทในสารละลายคือ 10 mM GSH 1 mM CDNB

การเตรียม Reagent ก่อนใช้

10.5 mM GSH ใน 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 6.5

21 mM CDNB ใน ethanol

ผสมสารละลาย GSH และ CDNB ในอัตราส่วน 1 ml ต่อ 50 μl ทันทีก่อนใช้

ดูดสารละลาย buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.0 10 mM DTT) 10 μl ใส่ใน หลุม blank และสารละลาย GST 10 μl ใส่หลุม sample เติมสารละลายสับสเตรทที่ผสมไว้ 200 μl นำเข้าเครื่องอ่านทันที

การอ่านค่า GST activity ใช้เครื่อง Ceres 900 ซึ่งมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ชื่อ KCJR สำหรับวัด enzyme kinetic อ่านที่ความยาวคลื่น 340 nm นาน 2 นาที เป็นจำนวน 12 จุด ณ อุณหภูมิห้อง 26°C ค่าที่วัดออกมาได้จะเป็นค่า slope ของค่า absorption ต่อนาที (mOD/min)

การคำนวณค่า GST activity คำนวณได้จาก สมการกฎของเบียร์ (Beer's law)

$$OD = \epsilon I c$$

โดยค่า OD คือ การดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น

ϵ คือ ค่า molar extinction coefficient มีค่าเท่ากับ $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

I คือ light path มีค่า 0.6 cm

c คือ ความเข้มข้นของ product ที่เพิ่มขึ้น

จากกฎของเบียร์สามารถทำให้ง่ายขึ้นได้ ดังนี้

$$\text{specific activity} = \frac{\text{mOD/min} \times 21}{5.76 \times C}$$

โดยที่ C คือความเข้มข้นโปรตีนในสารละลาย GST ตั้งต้น หน่วยวัดของ specific activity เป็น $\mu\text{mole/min/mg}$

3.4 การวัดความเข้มข้นของโปรตีน

เตรียมน้ำยาตรวจวัดโปรตีนโดยการเจือจาง น้ำยาเข้มข้น Bio Rad Protein Reagent ด้วย น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 น้ำยาเจือจางนี้เก็บไว้ในตู้เย็น 4°C ใช้ได้นานไม่เกิน 1 เดือน เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 mg/ml เพื่อทำ standard curve

วิธีการตรวจวัด ดูดน้ำกลั่นหรือ buffer 10 μl ใส่ลงในหลุม blank ดูดสารละลายมาตรฐานและสารละลายเอ็นไซม์ที่ต้องการวัดอย่างละ 10 μl ลงในหลุมอื่นใน microtitre plate เติมสารละลายเจือจางของน้ำยาตรวจวัดโปรตีน 300 μl ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้ผสมกันดี ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจึงวัดค่า absorption โดยใช้ program KCJR ในเครื่อง ceres 900 โดยอ่านค่าที่ความยาวคลื่น 595 nm. ภายหลัง program จะคำนวณ standard curve และอ่านค่าความเข้มข้นของสารละลายเอ็นไซม์ออกมาเป็นหน่วย mg/ml

3.5 การศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์

3.5.1 การศึกษาการมีคุณสมบัติ DDT-dehydrochlorinase

ในสารละลายที่ทำปฏิกิริยาประกอบด้วยเอ็นไซม์ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟต pH 6.5 และ *pp*-DDT 0.05 mM GSH 10 mM ให้ปฏิกิริยาดำเนินไปนาน 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28°C เมื่อจบปฏิกิริยาจึงเติม dicofol ลงไปให้ได้ปริมาณ 5 nmole (50 μl 0.1 mM) แล้วจึงสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

สรุปสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย

950 μl เอ็นไซม์ใน 10 mM GSH และโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

50 μl *pp*-DDT (0.1 mM ใน Ethanol)

50 μl dicofol (0.1 mM ใน Ethanol)

วิธีการสกัด เดิมคลอโรฟอร์ม 1.5 ml ลงในสารละลายปฏิกิริยา เขย่าเบา ๆ โดยใช้เครื่องเขย่า IKA-VIBRAX-VXA (JANKE&KUNKEL) นาน 5 นาที นำมาปั่นโดยเครื่อง bench top centrifuge 2000 rpm 10 นาที ดูดชั้นของคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) เก็บไว้ ทำการสกัดซ้ำจนครบ 3 ครั้ง เทชั้นคลอโรฟอร์มรวมกันลงในหลอดทดลอง (ใช้หลอดแก้ว) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้เย็นจนคลอโรฟอร์มระเหยไปหมด (1 คืน) จึงนำสารตัวอย่างเก็บไว้ -20°C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

การเตรียมสารตัวอย่างมาตรฐาน ประกอบด้วย

50 μl *pp*-DDT 0.1 mM

25 μl *pp*-DDE 0.2 mM

50 μl dicofol 0.1 mM

ทุกอย่างเตรียมใน Ethanol ดูดสารละลายมาตรฐานใส่หลอดแก้วรวมกันทิ้งไว้ให้ Ethanol ระเหยไปหมดจึงนำมาใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้ระบบ HPLC นำสารที่สกัดได้มาละลายใน isopropanol 100 μl และตัวทำละลาย mobilephase 100 μl (mobilephase ประกอบด้วย methanol : acetonitrile : น้ำ ในอัตราส่วน 72.5 : 12.5 : 15 โดยปริมาตร) ระบบ HPLC ประกอบด้วย Waters Model 510 HPLC mp

Waters 490 Programmable Mutli Wavelength detector

Waters Data Module 745 integrator

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ 20 μl ฉีดเข้าไปใน Waters Radial-PAK cartridge column ชนิด 8 NVC 18 (4 micron) และ Guard-PAK precolumn โดยใช้ Rheodyne model 7215 manual injector และ 20 μl loop อัตราการไหลของ mobilephase 0.8 ml/min โดยตัวความไวของตัววัดที่ 0.5 AUFS และความยาวคลื่น 236 nm peak ที่ได้ถูกคำนวณโดยใช้ Data module 745 integrator เทียบกับ internal standard ดังที่เตรียม (dicofol) ปริมาณของ DDE ที่เกิดขึ้นคิดเป็น nmole/mg protein คำนวณได้โดยเปรียบเทียบกับ standard (*pp*-DDT และ *pp*-DDE) ที่เตรียมไว้ก่อน

3.5.2 การศึกษาค่า specific activity ต่อสปีสเตรทชนิดต่าง ๆ

วิธีการหาค่า specific activity ต่อสปีสเตรทชนิดต่าง ๆ ใช้วิธีของ Habig et al.(12) โดยใช้ความเข้มข้นของสปีสเตรทดังตารางข้างล่าง การเตรียม stock solution เตรียม GSH ความเข้มข้น 1.05 เท่า และ electrophilic substrate 21 เท่า ของที่ระบุไว้ในตาราง เมื่อจะวัดปฏิกิริยานำสารละลาย GSH ผสมกับ electrophilic substrate ในอัตราส่วน 1 ml ต่อ 50 μl แล้วจึงใช้ Blank ของปฏิกิริยา คือใช้ buffer 20 μl ผสมกับสารละลายสปีสเตรทที่ผสมแล้ว 400 μl เพื่อตั้งค่าศูนย์ในเครื่อง แล้วจึงนำเอ็นไซม์ 20 μl ผสมสารละลายสปีสเตรท 400 μl นำไปอ่านค่า โดยใช้

เครื่อง spectrophotometer และโปรแกรม kinetic ค่า specific activity คำนวณได้ตามกฎของ เบียร์และค่า Molar extinction coefficient ตามตารางที่ 1

การวัด activity โดยมี cumene hydroperoxide เป็นสับสเตรทใช้วิธีของ Wendel (1981) โดยเตรียมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

25 mM Potassium phosphate buffer pH 7.6

160 Units/mg หรือ 1.3 mg/ml glutathione reductase (GR) (from yeast)

5.9 mM GSH เตรียมในบัฟเฟอร์

5.5 mM NADPH เตรียมในบัฟเฟอร์

52.5 mM cumene hydroperoxide

การเตรียมสารละลายผสมของสับสเตรทก่อนใช้ทันที เตรียมในอัตราส่วนคือ

GSH 850 μ l

NADPH 50 μ l

GR 5 μ l

Cumene hydroperoxide 50 μ l

การเริ่มปฏิกิริยา เติมสารละลายผสมสับสเตรท 200 μ l ลงในสารละลายเอ็นไซม์ 10 μ l ในหลุมของ microtitre plate อ่านค่า OD ที่ 340 nm นาน 10 นาที ใช้บัฟเฟอร์แทนเอ็นไซม์ในการทำ blank

3.5.3 การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์

การศึกษานี้ใช้ CDNB เป็น electrophilic substrate โดยการวัดค่า activity ของเอ็นไซม์ ดังกล่าวไว้ใน ข้อ 3.5 แต่มีการวัดที่ความเข้มข้นของทั้ง GSH และ CDNB ต่าง ๆ กัน นำค่า specific activity ที่คำนวณได้ในแต่ละความเข้มข้นมาคำนวณหาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์คือ K_m และ V ตามหลักการของ 2-substrate enzyme kinetics ดังกล่าวไว้ในหนังสือของ (14)

3.5.4 การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้ง activity โดยสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ

วิธีการศึกษาทำโดยการใช้การวัด activity ตามข้อ 3.3 แต่มีการเติมสารยับยั้งลงไป เพื่อเปรียบเทียบกับ control สารละลายต่าง ๆ ที่ใช้มีดังนี้

10.5 mM GSH

42 mM CDNB

42 x mM ตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ

ตัวยับยั้งที่ใช้ในการทดสอบเป็นสารที่วัดว่าเป็น electrophilic substrate ทั่ว ๆ ของ GST เช่นกัน แต่เนื่องจากสารเหล่านี้ตามรายงานก่อน ๆ มา (11, 13) พบว่ามักจะไม่มีเกิด conjugation

โดย GST จากยุง การทดลองครั้งนี้จึงต้องการศึกษาว่าแม้ว่าปฏิกิริยา conjugation จะไม่เกิดแต่ interaction อื่น ๆ มีหรือไม่ ด้วยยังเหล่านี้นี้เป็นชนิดและความเข้มข้นเดียวกับที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

วิธีการทำ assay ทำ control คือ การวัด activity ปกติควบคุมไปกับการทำ test ที่มี inhibitor การเตรียมสารละลายผสมสลับสเตรททั้งแบบ control และแบบ test ทำดังนี้

control GSH 1 ml CDNB 25 ul Ethanol 25 ul

test GSH 1 ml CDNB 25 ul ตัวยับยั้ง 25 ul

มีการทำ blank ในแต่ละ assay ในทุก ๆ กรณี

3.5.5 การศึกษาค่า I50

ค่า I50 คือค่าความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่สามารถยับยั้ง activity ของเอนไซม์ได้ 50% พอ ดี โดยที่หากทำการ plot graph % activity กับ $\log [I]$ จะได้ Sigmoid curve และค่า I50 คำนวณได้จากกราฟนี้โดยจุดที่ $[I] = I50$ จะอยู่ตรงจุดกึ่งกลางของ Sigmoid curve ที่มีค่า slope เป็นค่าลบตัวเลขสูงสุดไม่เกิน 0.58 (1)

วิธีการทดลองใช้ตัวยับยั้งที่ต้องการทดสอบ 3 ชนิดคือ cibacron blue3GA Bromosulphophalein และ ethacrynic acid โดยทำการวัดค่า activity ของเอนไซม์เปรียบเทียบกับ ภายใต้ control และการใส่ตัวยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ได้ % activity ตั้งแต่ 0-100% เมื่อเทียบกับ control นำค่าที่ได้มา plot graph ระหว่าง % activity กับ $\log[I]$ และคำนวณค่า I50 โดยใช้โปรแกรม Graph Pad PRISM Version 2.01

3.5.6 การศึกษาคุณสมบัติการมีปฏิกิริยากับสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ

วิธีการทดลองทำเหมือนข้อ 3.5.4 โดยความเข้มข้นสุดท้ายของสารฆ่าแมลงในปฏิกิริยามีค่า 0.1 mM ทั้งหมด ยกเว้น malathion และ diazinon มีค่า 1.0 mM

4. ผลการทดลอง

4.1 การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสกัด GST ให้บริสุทธิ์ แสดงไว้ในรูปที่ 1 กราฟแสดงการแยก GST จากโปรตีนอื่น ๆ โดยใช้ column chromatography แสดงได้ในรูปที่ 2 จากสารละลายสกัดหยาบเมื่อผ่าน Q-Sepharose column จะได้ 2 peak โดย peak 1 คือโปรตีนต่าง ๆ ที่ไม่เกาะติดกับ Q-Sepharose และตรวจพบ GST activity น้อยกว่า 10% เนื่องจากมีส่วนประกอบของ

โปรตีนอื่นปนเปื้อนมากมายจึงมิได้นำมาศึกษาต่อ peak 2 คือโปรตีนต่าง ๆ รวมทั้ง GST ที่เกาะติดกับ Q-Sepharose ประกอบด้วย GST ทั้งหมด มากกว่า 90% และพบว่าผ่านการสกัดให้บริสุทธิ์ขึ้น 5.4 เท่า เมื่อนำ peak 2 มาแยกผ่าน Shexylglutathione column พบว่า GST แยกออกเป็น 2 peak โดย peak 3 มี GST ประมาณ 20% peak 4 มีประมาณ 80% ผลการแยก peak 3 และ peak 4 โดยอาศัย hydroxylapatite column ได้ GST-5 GST-6 GST-4a GST-4b และ GST-4c ตามลำดับ ในการทดลองได้นำ GST 5 ทั้งชนิด มาทำการแยกสกัดต่อโดยอาศัย Phenyl Sepharose column พบว่า GST-5 GST-6 และ GST-4a ถูกทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยมีค่าความบริสุทธิ์ 73.0 6.1 และ 462.6 ตามลำดับ ส่วน GST-4b ไม่สามารถเกาะกับ Phenyl Sepharose ใน column ได้ จึงไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีนี้ได้ GST-4c แตกต่างจาก GST ชนิดอื่น ๆ คือ มีความบริสุทธิ์ตั้งแต่ผ่าน hydroxylapatite column ตารางค่าความบริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่าง ๆ แสดงไว้ใน ตารางที่ 2

โปรตีน GST ชนิดต่าง ๆ ภายหลังแยกให้บริสุทธิ์ นำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ SDS-PAGE รูปที่ 3 แสดงให้เห็นความบริสุทธิ์ของ GST-4a และ GST-4c ในขณะที่ GST-4b GST-5 และ GST-6 ยังคงมีโปรตีนชนิดอื่น ๆ ปนอยู่ แถบโปรตีนที่เป็น GST-4a และ GST-4c มีขนาดโมเลกุลเมื่อเทียบกับ standard molecular weight marker ได้ ประมาณ 23 kD แถบโปรตีนของ GST-4b มีแถบเข้มที่สุดอยู่บริเวณ 23 kD เช่นกัน ส่วน GST-5 และ GST-6 ไม่แน่ใจว่าแถบโปรตีนของ GST อยู่บริเวณไหน เท่าที่มีรายงานการศึกษา GST ในแมลงชนิดต่าง ๆ GST จะมีขนาดโมเลกุลของหน่วยย่อยอยู่ระหว่าง 16-35 kD

4.2 การศึกษาคูณสมบัติ DDT-dehydrochlorinase

ค่า DDT-dehydrochlorinase activity ของ GST แต่ละชนิดที่แยกได้ แสดงไว้ในตารางที่ 3 เอ็นไซม์ทุกชนิดยกเว้น GST-5 ต่างสามารถเร่งปฏิกิริยา DDT-dehydrochlorination ได้ในระดับแตกต่างกัน ค่ารวมของ DDT-dehydrochlorination พบมากที่สุด ใน GST-6 รองลงมาได้แก่ GST-4c GST-4a และ GST-4b ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่า specific activity ติดต่อหน่วย mg โปรตีน สูงสุดคือ GST-4c GST-6 ซึ่งมีโปรตีนอื่นเจือปนอยู่มากมายกว่า GST อื่น ๆ มีค่า specific activity สูงสุดเป็นที่ 2 ผลการศึกษานี้อาจจะแสดงให้เห็นว่า หากสามารถแยก GST-6 จนบริสุทธิ์ได้ อาจจะเป็น GST ที่มีค่า specific activity สูงที่สุด

4.3 การศึกษาค่า specific activity ต่อสปีสเตรทชนิดอื่น ๆ

สปีสเตรทที่ใช้ในการศึกษามี 9 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 ผลการทดลองพบว่า ทั้งหมดนี้มีเพียง 2 ชนิดที่ GST ที่สกัดได้จากยุงก้นปล่อง *An.dirus* B สามารถใช้เป็นสับได้ คือ CDNB และ DCNB โดยที่ CDNB เป็นสปีสเตรทที่ดีที่สุดซึ่งเอ็นไซม์ทุกตัวใช้ได้ส่วน DCNB นั้นมี

เพียง GST-4a และ GST-6 ที่ใช้ได้โดยมีค่า specific activity 0.60 ± 0.02 และ 0.88 ± 0.04 nole/mn/mg ตามลำดับ

4.4 คุณสมบัติทางจลนศาสตร์

คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ที่ศึกษาเป็นแบบ Michaelis-Menten steady state kinetic ตัวกลาง (parameter) ที่สนใจคือค่า K_m และ V โดยทำการศึกษาใน GST-4b และ GST-4c ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 4 ค่า K_m แสดงถึงความชอบ (affinity) ต่อสับสเตรต จะเห็นได้ว่า GST-4a คล้าย ๆ กับ GST-4b ในขณะที่ GST-4c นั้นต่างออกไป ค่า K_{cat} ของ GST-4b คำนวณไม่ได้เนื่องจากเอนไซม์ไม่บริสุทธิ์เพียงพอ เมื่อเปรียบเทียบ GST-4a กับ GST-4c ซึ่งต่างได้รับการสกัดจนบริสุทธิ์แล้ว จะเห็นว่า GST-4a มีค่า V สูงกว่า GST-4c 7.5 เท่า อีกทั้งประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา glutathione conjugation ต่อ CDNB (K_{cat}) ก็มากกว่าด้วย ค่า K_{cat}/K_m แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการใช้สับสเตรตตัวนั้น ๆ เช่น แม้ว่า GST-4a จะมี affinity ในการจับกับ GSH และ CDNB ได้น้อยกว่า GST-4c แต่เมื่อจับแล้วกลับเร่งให้ปฏิกิริยาดำเนินไปได้ดีกว่า ดังแสดงได้จากค่า K_{cat}/K_m ที่มากกว่าถึง 3-4 เท่า

4.5 คุณสมบัติการถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ

ศึกษาโดยการหาเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้ง ตัวเลขผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูง ๆ แสดงว่าสารตัวนั้นสามารถมีปฏิกิริยากับ GST นั้น ๆ ได้มาก เช่นอาจมีการเกาะติด (binding) แม้ว่าจะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา glutathione conjugation ได้ก็ตาม เช่น Bromosulphophthalein และ ethacrynic acid

4.6 การศึกษาค่า I_{50}

กราฟแสดงการ plot fractional activity กับ $\log [I]$ แสดงดังใน รูปที่ 4 ค่า I_{50} ที่คำนวณได้จากกราฟมีค่า 0.002 ± 0.001 0.001 ± 0.001 และ 1.58 ± 0.50 μM สำหรับ Cibacron blue 3GA Bromosulphophthalein และ Ethacrynic acid ตามลำดับ ค่าต่าง ๆ เหล่านี้ต่างจากค่าของ GST-4a $10 - 10^2$ เท่า ค่า slope สูงสุดตรงจุด $I = I_{50}$ เท่ากับ -0.58 แสดงว่าความสัมพันธ์ระหว่างหน่วยย่อยทั้งสองของ GST-4c หรือนัยหนึ่งหมายถึง GST-4c ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน

4.7 การศึกษาคุณสมบัติการมีปฏิกิริยาเคมีกับสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ

เนื่องจากการศึกษาคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยา glutathione conjugation กับสารฆ่าแมลงนั้น เราไม่สามารถติดตามวัดการดำเนินปฏิกิริยาไปได้โดยตรง จึงทำการศึกษาโดยการวัด % ความสามารถยับยั้ง GST activity ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 6 จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า GST -6 ซึ่งมีความสามารถเร่งปฏิกิริยา DDT-dehydrochlorination ได้ดีเป็นอันดับ 2 รองจาก GST-4c กลับไม่มีปฏิกิริยาใด ๆ ต่อสารฆ่าแมลงไม่ว่าชนิดไหน ๆ ที่ทดลองแม้แต่กับ DDT ผลการทดลองนี้อาจจะแสดงให้เห็นได้ว่า แม้ว่า GST-6 จะมีความสามารถในการเร่ง glutathione conjugation กับ CDNB ได้ไม่ดีเท่า GST ตัวอื่น ๆ แต่ความสามารถในการจับกับสารเคมีฆ่าแมลงก็ยิ่งน้อยลงไปอีก จากการที่ GST-6 สามารถเร่งปฏิกิริยา DDT-dehydrochlorination ให้ดี แสดงให้เห็นว่า GST-6 มีความสามารถจับกับ CDNB ได้มากและดีกว่าการจับกับ DDT

GST-5 ในทางตรงกันข้าม แม้จะตรวจไม่พบค่า DDT-dehydrochlorination activity แต่ DDT ก็ยังสามารถยับยั้ง GST activity ได้เล็กน้อย เช่นใน GST-4a, GST-4b และ GST-4c ถูกยับยั้งได้มากที่สุดโดยสารฆ่าแมลงเกือบทุกชนิดที่ทดสอบยกเว้น γ -HCH Diazinon และ Bendiocarb

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการแยกสกัด GST ชนิดต่าง ๆ จากยุงก้นปล่อง *An.dirus* B มากกว่าก่อนหน้านี้การศึกษาและแยกสกัด GST ได้เคยทำได้ในยุงชนิด *An.gambiae* (13) แต่เนื่องจากยังไม่ประสบผลสำเร็จและไม่ได้ GST ที่บริสุทธิ์ออกมาศึกษาคุณสมบัติ การศึกษาในครั้งนี้พบว่า จำนวนชนิดของ GST ใน *An.dirus* B มีอยู่ 5 ชนิด น้อยกว่าของ *An. gambiae* ซึ่งมีอยู่ถึง 7 ชนิด เปรียบเทียบจากการใช้วิธีการเดียวกันในการแยกสกัด และจำนวนโปรตีนที่ปนเปื้อนใน *An.dirus* B มีน้อยกว่าจึงทำให้สามารถแยกสกัดให้บริสุทธิ์ได้ GST-4a ได้มีการสกัดและศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว (Prapanthadara et al. 1996) ในครั้งนี้เราสามารถแยกสกัด GST-4c ให้บริสุทธิ์ได้เช่นเดียวกับ GST-4a

ในรายงานที่ตีพิมพ์ไปก่อนหน้านี้ (13) ยังไม่ทราบว่า GST -4c ปนอยู่ในส่วนของ GST -4b ที่รายงานออกไป แต่การศึกษาครั้งนี้เมื่อมีการปรับปรุงชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ elute ใน hydroxylapatite column พบว่า GST-4b แต่เดิม ในครั้งนี้ถูกแยกออกเป็น GST-4b และ GST-4c โดยที่คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของ GST ทั้งสองนี้แตกต่างกัน GST-4c ที่แยกสกัดได้คิดเป็น 1.2 % ของ CDNB conjugating activity ทั้งหมดใน *An.dirus* และคิดเป็น DDT-dehydrochlorination activity 17.7% ซึ่งนับเป็นอันดับ 2 รองจาก GST-6 (81.4%) เนื่องจาก

GST-4c นี้มีความบริสุทธิ์ที่แสดงได้จาก SDS-PAGE (รูปที่ 3) จึงเป็นโอกาสดีในการจะนำมาศึกษาต่อไปถึงโครงสร้างต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ DDT-dehydrochlorinase activity

การมีส่วนสำคัญของ GST ต่อการดื้อต่อสารเคมีฆ่าแมลงที่นอกเหนือจาก DDT ได้มีผู้ศึกษาและตีพิมพ์ไว้ เช่น ในแมลงวัน (4) หน้าที่ของ GST คือเป็นกลไกลำดับที่ 2 ในขบวนการย่อยสลายสารพิษ เช่น oxon ซึ่งเป็น analog ของ fenitrothion ในยุงก้นปล่องชนิด *An.subpictus* (15) ในการศึกษาที่เคยตีพิมพ์เมื่อไม่นานมานี้ GST class I ที่สังเคราะห์โดยอาศัยวิธี recombinant จากทั้งยุงก้นปล่อง *An.dirus* และ *An.gambiae* สามารถมีปฏิกิริยาได้เป็นอย่างดีกับสารเคมีฆ่าแมลงหลาย ๆ กลุ่มคือกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส กลุ่มไพรีทรอยด์ และกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (11) ในการศึกษาจากเอ็นไซม์ที่แยกได้จากตัวลูกน้ำยุงต่าง ๆ ก็ให้ผลการทดลองยืนยันการมีปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีฆ่าแมลงเหล่านี้กับ GST จากยุง

GST ชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จาก *An.dirus* จัดได้ว่าเป็นชนิดที่สอดคล้อง (correspondence) กับ GST ใน *An.gambiae* จึงได้มีการตั้งชื่อคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามคุณสมบัติปฏิกิริยาของเอ็นไซม์จากยุงทั้ง 2 species ก็ยังมีความต่างกันอยู่มาก เช่น GST-5 จาก *An.dirus* มีความเป็น hydrophobicity มากกว่า GST-5a จาก *An.gambiae* ส่วน GST-6 จาก *An.dirus* ถูก elute จาก Phenyl Sepharose column ด้วยสภาพอะปเฟอร์เดียวกับ GST-6b ใน *An.gambiae*

แม้ว่าค่ารวมของ DDT-dehydrochlorinase activity ของ *An.gambiae* กับ *An. Dirus* จะใกล้เคียงกัน แต่การกระจายของ DDT-dehydrochlorinase ใน GST แต่ละชนิดต่างกันไป DDT-dehydrochlorinase ใน *An.gambiae* ส่วนใหญ่จะพบใน GST-5a แต่ใน *An.dirus* จะพบใน GST-4c โดยที่ GST -5 ไม่มี DDT-dehydrochlorinase activity เลย จากผลการศึกษาทางชีวเคมีใน GST จากยุงโดยตรง อาจสามารถแบ่ง GST ชนิดต่าง ๆ ออกได้เป็น 2 class class I คือกลุ่มที่สามารถเกาะติดกับ S-hexylglutathione column ได้แก่ GST-4a GST-4b และ GST-4c GST ทั้งหมดในกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อ CDNB conjugation ในระดับสูง แต่มี DDT ase activity ต่ำ clan II คือกลุ่มที่ไม่เกาะติดกับ S-hexylglutathione column ได้แก่ GST-5 และ GST-6 ในแมลงวันและแมลงหวี่ก็ได้มีการแบ่ง GST ออกเป็น 2 class (Fournier et al. 1992) จากการศึกษาโครงสร้างพื้นฐานทางด้านลำดับกรดนิวคลีอิกและเปรียบเทียบกันพบว่า GST class I ของทั้งยุงก้นปล่อง แมลงวันและแมลงหวี่เป็น class เดียวกัน อย่างไรก็ตาม GST-4a ใน *An.dirus* มี N-terminal ต่างจากลำดับกรดนิวคลีอิกใน GST อื่น ๆ ใน class I ด้วยเหตุนี้อาจจะยังไม่เป็นที่แน่ใจว่ามี GST class เล็ก ๆ อื่น ๆ อยู่ใน class I

ในการศึกษาบางแห่ง ได้รายงานไว้ว่า GST ในแมลงวันอยู่ใน clan Theta (16, 17) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่า GST ในแมลงเหมือนกับ GST ใน class Theta เพียง 40% ตามหลักการที่ Mannervik et al. (18) ว่า GST ใด ๆ ใน class เดียวกัน มีลำดับกรดอะมิโน

เหมือนกันมากกว่า 50% นอกจากนี้ GST ใน class Theta จะไม่ใช่ CDNB เป็นสับสเตรตแต่ใช้ 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane และ p-nitrophenethyl bromide (19) แต่ GST ในยุง กันป่องใช้ CDNB เป็นสับสเตรต จึงสรุปได้ว่าการจัดแบ่ง class ของ GST ควรจะแตกต่างจาก GST ในคน

เอกสารอ้างอิง

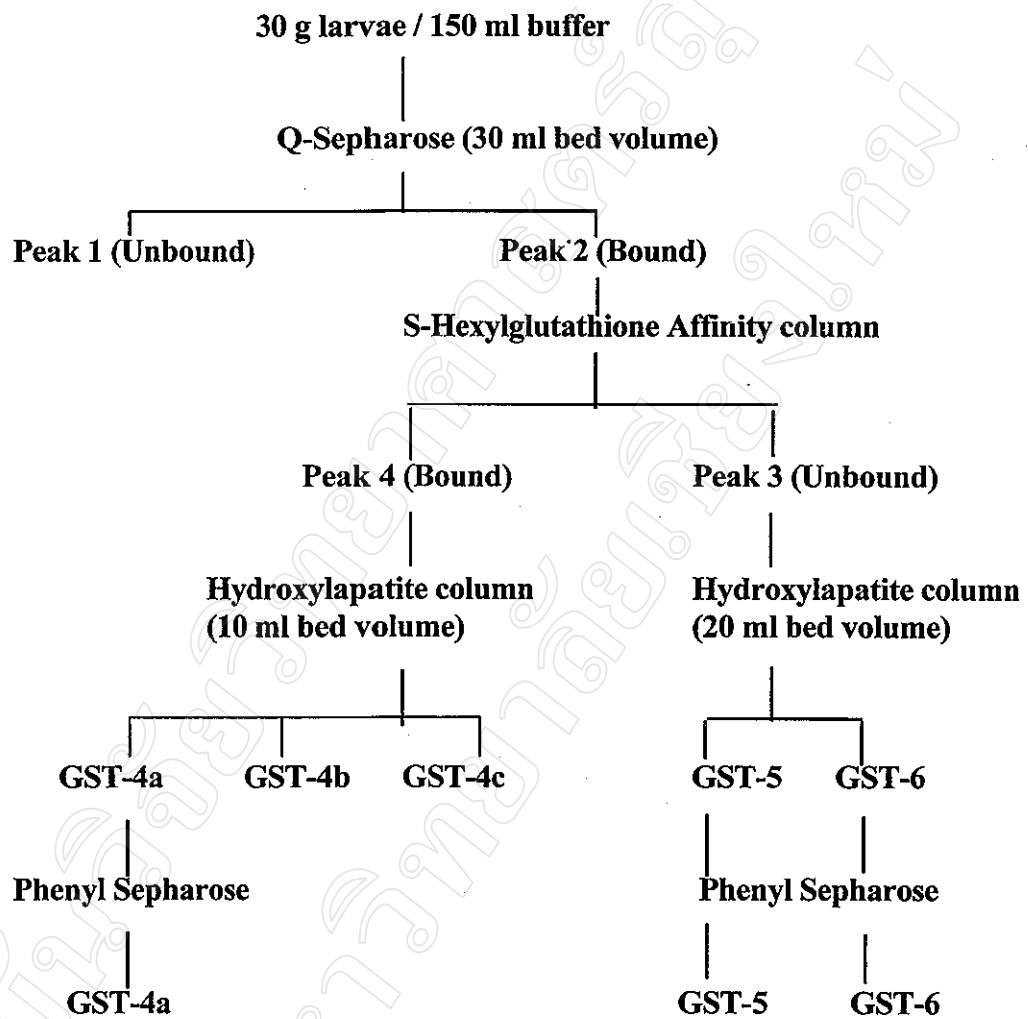
1. Mannervik, B. and Danielson, U.H. Glutathione S-transferases: Structure and catalytic activity, CRC Crit. Rev. Biochem. (1988) 23, 283-337.
2. Motoyama, N. and Dauterman, W.C. Interstrain comparison of glutathione-dependent reaction in susceptible and resistant houseflies. Pestic. Biochem. Physiol., 1975, 5, 480-495.
3. Clark, A.G. and Dauterman, W.C. The characterization by affinity chromatography of glutathione S-transferases from different strains of house fly. Pestic. Biochem. Physiol., 1982, 17, 307-314.
4. Clark, A.G., Shamaan, N.A., Sinclair, M.D. and Dauterman, W.C., Insecticide metabolism by multiple glutathione S-transferase in two strains of the housefly, *Musca domestica* (L), Pestic. Biochem. Physiol., 1986, 25, 169-175.
5. Hassall, K.A. , The biochemistry and uses of pesticides : Structure, metabolism, mode of reaction and uses in crop protection (Hassall, K.A. Ed.), MacMillan, London, 1990.
6. Brown, A.W.A., Insecticide resistance in mosquitoes : A pragmatic review, J. Am. Mosq. Control Assoc., 1986, 2, 123-140.
7. Herath, P.R.J., Jayawardena, K.G.I., Hemingway, J. and Harris, J., DDT-resistance in *Anopheles culicifacies* giles and *An. Subpictus grassi* (Diptera: culicidae) from Sri Lanka : a field studies on the mechanisms and changes in gene frequency after cessation of DDT spraying, Bull. Ent. Res., 1988, 78, 717-723.
8. Lamoureux, G.L. and Rusness, D.G., The role of glutathione and glutathione S-transferases in pesticide metabolism selectivity and mode of action in plants and insects. In Glutathione : Biochemical and Medical aspects (D.Dolphin, O. Avramovic and R. Poulson Eds.), pp. 153-196, A Wiley-Intersciences Publication John Wiley & Son. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1989.

9. Hayed, J.D. and Wolf C.R., Role of glutathion Transferases in drug resistance. In Glutathione conjugation : Mechanism and biological significance (Helmet Sies and Brian Ketterer Eds.) pp. 315-355, Academic Press Ltd. London, 1988.
10. Prapanthadara, L., Heminway, J. and Ketterman, A.J., Partial purification and characterization of glutathione S-transferases involve in DDT-resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. Pestic. Biochem. Physiol. 1993, 47, 119-133.
11. Prapanthadara, L., Ranson, H. Somboon, P. and Hemingway, J. Cloning, expression and characterization of a class I insect glutathione S-transferase from the mosquito *An. dirus*. Insect Biochem. Mol. Biol., 1998, 28: 321-329.
12. Habig, W. H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, J. Biol. Chem. 1974, 249 : 7130-7139.
13. Prapanthadara, L., Koottathep, S., Promtet, N., Hemingway, J. and Ketterman, A. J. (1996) Characterization of the major form of glutathione S-transferase in the mosquito *An. dirus*. Insect Biochem. Molec. Biol. 1999, 26: 277-285.
14. Dixon, M. and Webb, E.C., Enzymes (Dixon, M. and Webb, E.C. Eds.) Academic Press, New York, 1979.
15. Hemingway, J., Miyamoto, J. and Herath, P.R.J., A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance gene in *Anopheles* : Supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. Pestic. Biochem. Physiol. 1991, 39 : 49-56.
16. Wilce, M.C.J., Board, P.G., Feil, S.C., Parker, M.W., Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. EMBO J., 1995, 14, 2133-2143.
17. Pemble, S.E., Taylor, J.B., 1992. An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-Theta glutathione transferase cDNA sequences. Biochem. J. 287, 957-963.
18. Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R., Pickett, C.B., Sato, K., Widersten, M., Wolf, C.R., Nomenclature for human glutathione transferases. Biochem. J., 1992, 282, 305-306.

19. Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M., Ketterer, B., Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem. J.*, 1991, 274, 409-414.

รูปที่ 1

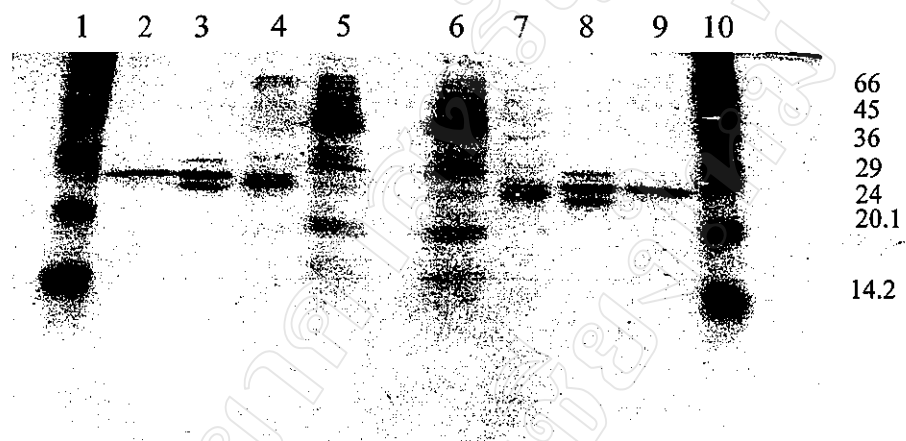
แผนภูมิขั้นตอนการแยกสกัด GST จากลูกน้ำระยะที่ 4 ของยุงก้นปล่อง *An.dirus* B



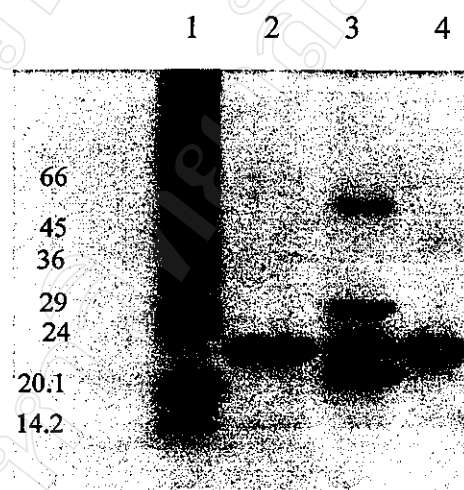
รูปที่ 2

กราฟแสดงการแยก GST ให้บริสุทธิ์จากลูกน้ำระยะที่ 4 ของยุงก้นปล่อง An.dirus B

- A). Sepharose column เมื่อนำสารละลายสกัดหยาบจากลูกน้ำระยะที่ 4 มาผ่าน column เก็บส่วนของ peak ที่ 1 ทิ้งไป ส่วน peak ที่ 2 เก็บ fraction ละ 4 ml นำมาวัดค่าความเข้มข้นโปรตีน และ GST activity
- B) Hydroxylapatite column เมื่อนำ peak 3 จาก affinity column มาแยกด้วย hydroxylapatite column เก็บส่วนที่ไม่เกาะติดใน column ทิ้งไป elute GST ที่เกาะใน column ด้วยบัฟเฟอร์ดังกล่าวไว้ในวิธีการทดลอง เก็บ fraction ละ 1 ml นำมาวัดค่าความเข้มข้นโปรตีนและ GST activity GST ที่แยกได้ คือ GST-5 และ GST-6
- C) และ D) Phenyl Sepharose column แสดงการแยกสกัด GST-5 และ GST-6 ออกมาจากโปรตีนอื่น ๆ เมื่อ elute ด้วยบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังกล่าวได้ในวิธีการทดลอง
- E) Hydroxylapatite column แสดงการแยกสกัด GST-4a GST-4b และ GST-4c จาก peak 4 โดยการ elute ด้วยบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ดังกล่าวไว้ในวิธีการทดลอง
- F) Phenyl Sepharose column แสดงการแยกสกัด GST-4a ให้บริสุทธิ์ดังกล่าวไว้ในวิธีการทดลอง



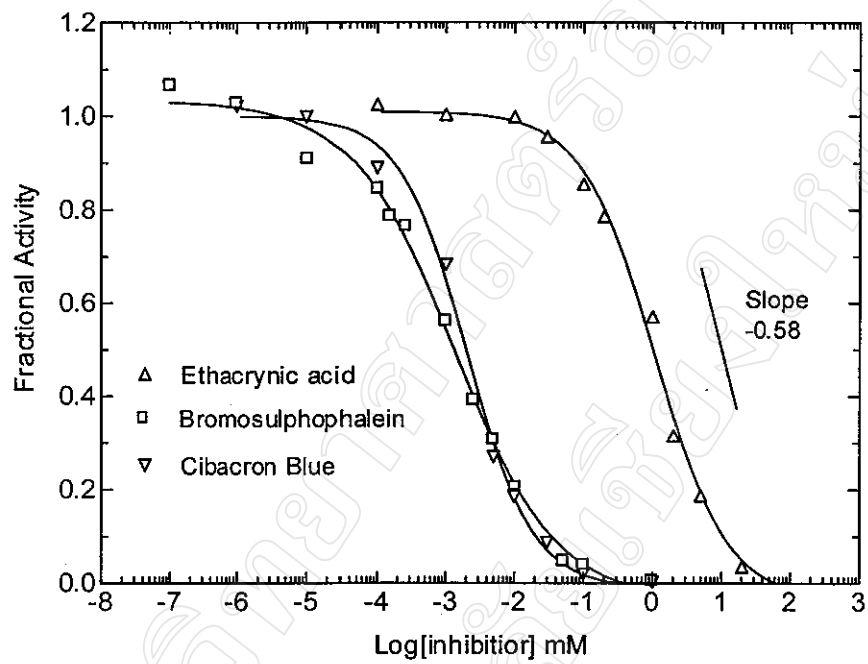
A



B

รูปที่ 3 SDS-PAGE ของ GST ชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้

A) Lane 1 และ 10 คือ standard molecular weight marker ; Lane 2 และ 9 = 1 ug GST -4a ; Lane 3 และ 8 = 2 ug ของ GST-4b และ GST-4c ที่ยังไม่ได้แยกออกจากกัน ; Lane 4 และ 7 = 2 ug GST-5 ; Lane 5 และ 6 = 10 ug GST-6



รูปที่ 4

IC₅₀ plot ของการยับยั้ง activity ของ GST-4c โดยตัวยับยั้ง 3 ชนิด คือ ethacrynic acid Bromosulphophthalein และ Cibacron Blue 3 GA

ตารางที่ 1

สภาวะที่ใช้ในการตรวจวัด activity ต่อสปีสเตรทชนิดต่าง ๆ

Substrate	[substrate]	pH	$\lambda_{\max}$	$\Delta\epsilon$
	mM		Nm	$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
1,2-Dichloro-4-nitrobenzene	1.0	7.5	345	8.5
4-Nitropyridine-N-oxide	0.2	7.0	295	7.0
p-Nitrophenethyl bromide	0.1	6.5	310	1.2
1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propane	1.0	6.5	360	0.5
Bromosulphophthalein	0.03	7.5	330	4.5
trans-4-phenyl-3-buten-2-one	0.05	6.5	290	-24.8
Ethacrynic	0.2	6.5	270	5.0

ตารางที่ 2
สรุปการแยกสกัดเอ็นไซม์กลูตาไธโอนเอส-ทรานสเฟอเรสจากลูกน้ำยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus B*

Fractions	Protein (mg)	GST activity ($\mu\text{mol/min}$)	Specific activity ($\mu\text{mol/min/mg}$)	% Yield	fold
Crude supernatant	958.72	308.99	0.322	100	1
Q-Sepharose column					
Peak I	353.80	12.88	0.036	4.2	-
Peak II	97.55	168.67	1.73	54.6	5.37
S-hexylglutathione column					
Peak III	95.55	18.83	0.20	6.10	-
Peak IV	1.24	57.78	46.74	18.7	145.2
Hydroxylapatite column					
GST-4a	ND	60.41	ND	19.6	ND
GST-4b	0.033	4.08	85.86	1.3	266.6
GST 4c	0.167	3.62	21.62	1.2	67.1
GST-5	9.80	4.90	0.50	1.55	1.55
GST-6	11.66	7.20	0.62	2.3	1.92
Phenyl Sepharose column					
GST-4a	0.302	55.13	149.08	17.8	462.6
GST-5	0.089	2.10	23.51	0.7	73.0
GST-6	1.74	3.41	1.96	1.1	6.1

ตารางที่ 3
สรุปค่า DDT-dehydrochlorinase activity ของเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรสจาก
ลูกน้ำยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* B

Isoenzymes	nmol / unit GST	nmol/mg protein	nmol/g larvae	GST / g larvae (μ mol/min)
GST 4a	0.11 ± 0.02	15.80	0.27	2.52
GST 4b	1.06 ± 0.74	90.93	0.18	0.17
GST 4c	60.53 ± 14.55	1,308.74	9.08	0.15
GST 5	< 0.03	< 0.71	< 0.01	0.20
GST 6	139.20 ± 48.37	272.83	41.76	0.30

ค่าต่างๆที่แสดงไว้เป็นค่าเฉลี่ย (means) ได้จากการทดลองอย่างน้อย 4 ครั้ง หน่วยของ DDTase activity คิดเป็น nmole DDE ที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 4
ผลการศึกษาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ GST-4a, GST-4b และ GST-4c โดยใช้
GSH และ CDNB เป็นสับสเตรท.

Constant	GST 4a [*]	GST-4b	GST 4c
V _m (μmole/min/mg)	179.75 ± 5.64	92.89 ± 8.56	24.38 ± 1.84
K _{m(GSH)} (mM)	0.87 ± 0.10	0.97 ± 0.51	0.30 ± 0.07
K _{m(CDNB)} (mM)	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.09	0.10 ± 0.01
k _{cat} (s ⁻¹)	149.85	ND	18.69
k _{cat} /K _{m(GSH)} (mM ⁻¹ s ⁻¹)	172.24	ND	62.30
k _{cat} /K _{m(CDNB)} (mM ⁻¹ s ⁻¹)	713.57	ND	186.9

^{*} ตัวเลขคัดมาจาก Prapanthadara *et al.*, 1996. ND = ไม่ได้คำนวณ

ตารางที่ 5
เปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งของ GST CDB conjugating activity โดยสับสเตรทชนิดอื่น ๆ

Substrates	% inhibition				
	GST4a	GST4b	GST4c	GST5	GST6
4-Nitropyridine <i>N</i> -oxide	7.35	5.74	13.20	25.18	2.17
<i>p</i> -Nitrophenethyl bromide	22.84	18.20	42.11	11.08	0
1,2-Epoxy-3-(<i>p</i> -nitrophenoxy) propane	0	0	12.44	8.99	0
Bromosulphophthalein	95.1	92.00	84.80	93.24	87.02
<i>trans</i> -4-phenyl-3-buten-2-one	0	0	0	10.17	16.34
Ethacrynic acid	99.74	100	100	100	95.02
1,2-Dichloro-4-nitrobenzene	11.48	6.61	32.92	14.31	0

ค่าต่างๆที่แสดงไว้เป็นค่าเฉลี่ย (means) ได้จากการทดลองอย่างน้อย 4 ครั้ง

ตารางที่ 6

ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งของ GST CDNB conjugating activity โดยสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ

Insecticides	% inhibition				
	GST 4a	GST 4b	GST 4c	GST 5	GST 6
<u>Organochlorines</u>					
DDT	95.6	70.9	62.1	6.1	0
DDE	89.8	66.8	49.0	38.7	0
Gamma-HCH	0	0	27.3	0	0
<u>Pyrethroids</u>					
Permethrin	100	60.8	62.4	7.7	0
Lambda cyhalothrin	100	76.4	69.1	0	0
Deltamethrin	100	83.3	77.7	20.0	0
<u>Phosphorothioates</u>					
Diazinon	24.7	0	14.9	0	0
Fenitrothion	51.8	47.9	44.9	37.3	0
Pirimiphos-methyl	34.4	25.0	20.4	13.5	0
Chlorpyrifos-ethyl	80.2	46.0	41.7	9.3	0
Temephos	100	76.9	68.2	46.7	0
<u>Carbamate</u>					
Bendiocarb	12.9	0	19.7	2.4	0

ความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงที่ใช้ คือ 0.1 mM ยกเว้น diazinon ใช้ขนาด 1.0 mM ค่าต่างๆที่แสดงไว้เป็นค่าเฉลี่ย (means) ได้จากการทดลองอย่างน้อย 4 ครั้ง