ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทำเอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส จากยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* B ให้บริสุทธิ์และการหาลักษณะเฉพาะทางจลนศาสตร์

ชื่อผู้เขียน นายศรัณยู คำเมือง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์ ประธานกรรมการ

อ. ดร. ละเอียด ประพันธดารา กรรมการ

ผศ. ดร. ปรัชญา สมบูรณ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการสกัดและแยกบริสุทธิ์ เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส (GST)ในลูกน้ำระยะที่ 4 ของยุงก้นปล่อง *Anopheles dirus* B โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี แบบต่าง ๆ ดังนี้ Ion-exchange chromatography, S-Hexylglutathione affinity chromatography และHydroxylapatite chromatography สามารถแยกไอโซเอนไซม์ของ GST ได้อย่างน้อย 4 ชนิด คือ พีค 4a พีค 4b พีค 5 และพีค 6 เฉพาะพีค 4a นำไปผ่าน Phenyl sepharose hydrophobic chromatography อีกครั้ง เมื่อนำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย เอสดีเอส-โพลีอคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอริซิส พบว่าเฉพาะพีค 4a เท่านั้นที่ถูกแยกจนบริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 23 kD เมื่อนำ พีค 4a มาศึกษาด้านจลนศาสตร์ พบว่า K_m สำหรับกลูตาไธโอน (GSH) และ 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB) มีค่าเป็น 0.51 และ 0.20 mM ตามลำดับ และ V_{max} ขณะเอนไซม์อยู่ในสารละลาย Bovine serum albumin(BSA) เข้มข้น 9.50 mg/ml มีค่า 280.15 μmol/min/mg ผลการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรท 9 ชนิดพบว่า เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด สามารถใช้สับสเตรทได้อย่างกว้างขวางและคาบเกี่ยวกัน

Thesis Title	Purification and Kinetic Characterization of Glutathione S-Transferases from the Mosquito *Anopheles dirus* B
Author	Mr. Saranyu Khammuang
M.S.	Chemistry
Examining Committee :	
	Assoc. Prof. Dr. Griangsak Chairote — Chairman
	Lecturer Dr. La-aied Prapanthadara — Member
	Asst.. Prof. Dr. Pradya Somboon — Member

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

Abstract

In this study, Glutathione S-transferases in the 4th instar larvae of mosquito *Anopheles dirus* B were extracted and purified by sequencial column chromatography, ion-exchange chromatography, S-hexylglutathione affinity chromatography and hydroxylapatite chromatography. At least four isoenzymes were isolated and designated peak 4a, peak 4b, peak 5 and peak 6. Only peak 4a was further purified using phenyl Sepharose hydrophobic chromatography. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis showed that only peak 4a was purified to homogeneity with a molecular weight of about 23 kD. Kinetic study for purified peak 4a showed that K_m values for glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB) were 0.51 and 0.20 mM respectively and V_{max} in the presence of 9.50 mg/ml bovine serum albumin(BSA) was 280.15 µmol/min/mg. Substrate specificity study showed that all of the isoenzymes had broad and overlapping substrate.

รายการอักษรย่อ

GSH	Glutathione
GST	Glutathione S-transferase
NAD^+	Nicotinamide adenine dinuclotide
%	Percent
D	Dalton
°C	Degree celcius
RH	Relative humidity
mM	Milimolar
µl	Microlitre
cm	Centimetre
O.D.	Optical density
min	Minute
l	Litre
mg	Miligram
µmol	Micromole
ml	Mililitre
M	Molar
g	Gram
rpm	Round per minute
µg	Microgram
kD	Kilodalton
G-3-PD	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
GSSG	Glutathione (oxidized form)
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

GR	Glutathione reductase
CuOOH	Cumene hydroperoxide
λ_{max}	Maximum wave lenght
mS	Milisemen
DDT	1,1-(2,2-tri-Chloroethylidene)bis(4-chlorobenzene)
DCNB	1,2-Dichloro-4-nitrobenzene
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
K_m	Michaelis constant
V_{max}	Maximum velocity
DTT	Dithiothreitol
BSA	Bovine serum albumin

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University