บทคัดย่อ

การวิจัยนี้แยกบริสุทธิ์ไลโซไซม์จากไข่ขาวของกลุ่มสัตว์เลื้อยคลานได้สี่ชนิด ได้แก่ SSTL A, SSTL B ซึ่งได้จากไข่ขาวของตะพาบน้ำ (soft shell turtle) ASTL ได้จากไข่ขาวของตะพาบน้ำ (Asiatic soft shell turtle) และ GSTL ได้จากไข่ขาวของเต่าตนุ (green sea turtle) ซึ่งเป็นเต่าทะเลชนิดหนึ่ง ด้วยเทคนิค cation exchanger column chromatography และ gel filtration chromatography เมื่อนำไลโซไซม์ทั้งสี่ชนิดมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า SSTL A, SSTL B และ ASTL มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือประมาณ 14.8 kDa ส่วน GSTL มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15.2 kDa ยืนยันผลของ lysozyme activity ทั้งสี่ชนิดที่แยกบริสุทธิ์ได้โดย refolding gel จากการทดสอบโปรตีนที่อยู่ในรูป native conformation โดย Native PAGE พบว่าไลโซไซม์ของสัตว์เลื้อยคลานแต่ละชนิดมีของกรดอะมิโนที่มีประจุแตกต่างกันโดยพบว่า SSTL B วิ่งเข้าหาขั้วลบได้เร็วที่สุดในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานและวิ่งได้ใกล้เคียงกับ HEWL จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีพบว่าไลโซไซม์จากตะพาบน้ำ (SSTLs และ ASTL) สามารถทำงานได้ดีที่ pH 6.0 แต่ตรงกันข้ามกับไลโซไซม์จากไข่ขาวของเต่าทะเลที่สามารถทำงานได้ดีที่สอง pH คือ pH 6.0 และ pH 8.0 และจากการศึกษา Thermostability ที่อุณหภูมิ 90^0C พบว่าไลโซไซม์ทั้งสี่ชนิดยังสามารถทำงานได้เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงโดย ASTL ยังมี activity สูงสุดประมาณ 60% จากการศึกษาโครงสร้างระดับปฐมภูมิของเอนไซม์ไลโซไซม์สี่ชนิดพบว่า SSTL A SSTLB และ ASTL มีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ 131 ตัว ซึ่งต่างจาก GSTL โดยมีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ 130 ตัว และพบว่าทางปลาย N (N-terminal sequencing) ของ SSTLs และ ASTL มีการ insertion ด้วยกรดอะมิโน Gly ซึ่งเคยมีรายงานพบในนกบางชนิดเช่นไก่ฟ้า (pheasant lysozyme) และนอกจากนี้ยังพบ insertion ของ Gly ระหว่างตำแหน่งที่ 47 และ 48 นอกจากนี้พบว่า SSTL A และ SSTL B มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกันมากโดยมีการ substitutions เพียงสามตำแหน่งคือ *ตำแหน่ง* Lys97 *ใน* SSTL A *เปลี่ยนเป็น* Arg *ใน* SSTL B, Gly122 *ใน* SSTL A *เปลี่ยนเป็น* Gln *ใน* SSTL B และ Asp126 ใน SSTL A เปลี่ยนเป็น Gly *ใน* SSTL B สำหรับการศึกษา peptide mapping ระหว่าง SSTL A, SSTL B และ ASTL พบว่า เกิด substitution ขึ้นใน ASTL อย่างน้อย 4 ตำแหน่งคือ Leu8 เปลี่ยนเป็น Ala, Ala41 เปลี่ยนเป็น Gly, Lys71 เปลี่ยนเป็น Asp และ Leu83 เปลี่ยนเป็น Met เมื่อเปรียบเทียบกับ SSTL B นอกจากนี้จากการศึกษาเปรียบเทียบกับ C-type lysozyme ชนิดอื่นๆพบว่า ในกลุ่มของ reptile lysozymes จะมีการ substitutions เกิดขึ้นที่บริเวณ binding subsite คือ site E และ site F เมื่อเทียบกับ HEWL คือ Phe34, Arg45, Thr47 และ Arg114 จะถูกแทนที่โดย His, Tyr, Arg และ Tyr ซึ่งการ

substitutions นี้อาจจะมีผลกระทบต่อ catalysis mechanism ของเอนไซม์ และการ substitutions ในตำแหน่งที่ 8 และตำแหน่งที่ 83 ใน ASTL จะพบเป็นครั้งแรกในกลุ่มของ C-type lysozyme

รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่มีการพบ C-type lysozymes สองชนิดในไข่ขาวของสัตว์เลื้อยคลาน และมีการศึกษาทั้งทางด้านโครงสร้างและหน้าที่ของไลไซไซม์เปรียบเทียบเป็นกลุ่ม ซึ่งพบว่า โครงสร้างระดับปฐมภูมิของเอนไซม์ไลโซไซม์ในกลุ่มของสัตว์เลื้อยคลานจะแตกต่างจากไลโซไซม์ในกลุ่มของสัตว์ปีก และการเกิด amino acid substitutions ในระหว่างกลุ่มของ reptile lysozyme พบว่าส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณผิวของโมเลกุลซึ่งอาจจะมีผลต่อ binding affinity ของเอนไซม์และเซลล์แบคทีเรีย และนอกจากนี้กลไกการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มของ reptile กับสับสเตรตชนิดต่างๆ จะมีการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ : ตะพาบน้ำ; ไลโซไซม์ชนิด C; การแยกบริสุทธิ์; ไลโซไซม์จากสัตว์เลื้อยคลาน; ไลโซไซม์จากตะพาบน้ำ

Abstract

Cation exchange column chromatography and gel filtration chromatography were used to purify four types of reptile lysozymes : SSTL A and SSTL B, from the egg white of soft shelled turtle, ASTL from the egg white of Asiatic soft shell turtle and the fourth lysozyme, GSTL, from the egg white of green sea turtle. The molecular masses of purified lysozymes were estimated to be 14.8, 14.8, 14.8 and 15.2 kDa for SSTL A, SSTL B, ASTL and GSTL respectively by SDS-PAGE. Zymograms of the four lysozymes on native-PAGE mobility showed differences in charge between the reptile lysozymes. SSTL A, SSTL B and ASTL had sharp pH optima of around pH 6.0, which contrast with that of GSTL, which showed dual pH optima at around pH 6.0 and pH 8.0. These lysozymes were stable at 90°C for 2 h, but completely lost activity after 3 h incubation. The amino acid sequences of three reptile lysozymes (SSTL A, SSTL B and ASTL) were analyzed by peptide mapping method. The lysozymes were reduced and carboxymethylated to fragment them with trypsin. Then amino acid composition and amino acid sequence of each peptide was performed. SSTLs and ASTL was proved to consist of 131 amino acid residues whereas GSTL (JC7918) had 130 amino acid residues. SSTLs and ASTL have an extra Gly residue at N-terminus which was found in pheasant lysozyme. Further, all four reptile lysozymes have an insertion of a Gly residue between 47 and 48 residues when compared with HEWL, as found in human lysozyme. The three reptile lysozymes were shown to be very similar to one another on the basis of amino acid sequence. The established amino acid sequence of SSTL A had the highest similarity to SSTL B with three amino acid substitutions at positions 97 (Lys to Arg), 122(Gly to Gln) and 126 (Asp to Gly). From the peptide mapping analysis, ASTL had four amino acid substitutions at position 8, 41, 71 and 83 from SSTL B. The amino acid sequence of reptile lysozymes that might contribute to substrate binding were found at subsites E and F (Phe34His, Arg45Tyr, Thr47Arg and Arg114 Tyr) when comparing to HEWL. The amino acid substitution at position 8 and 83 in ASTL were newly detected in C-type lysozyme.

This is the first report for the discovery two type lysozymes in egg white of reptile group. Further, the primary structures of reptile lysozymes are different from the

other c-type lysozymes. In addition, amino acid substitutions in between reptile lysozyme group which were found mainly on the surface molecule of protein might contribute to the binding affinity of an enzyme and bacterial cell substrate. Furthermore, the study of catalysis mechanism with different kind of substrated is in progress to elucidate the structural basis of the diversity in their biological activity.

Keywords—Asiatic soft shelled turtle lysozyme; C-type lysozyme; Purification; Reptile lysozyme; Soft shelled turtle lysozyme