

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG4880001

ชื่อโครงการ : การเตรียม immobilized เอนไซม์ pfDHFR เพื่อตรวจหาสารยับยั้งเอนไซม์
จากห้องสมุดเชิงรวม

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ดร.ชวะณี ทองพันธุ์
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

E-mail address : chawanee@biotec.or.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

งานวิจัยนี้เป็นพัฒนาวิธีการ Immobilized เอนไซม์ pfDHFR บน solid support เพื่อใช้ในการคัดเลือกลำดับที่คุณสมบัติที่ดีในการจับเอนไซม์ pfDHFR จาก Combinatorial library โดยได้ทำการเตรียมเอนไซม์ pfDHFR ที่มีกรดอะมิโน cysteine ที่ปลาย C-terminal เพื่อนำไปตรึงบนเจล thiopropyl-Sepharose โดยเชื่อมด้วยพันธะ S-S ปริมาณของเอนไซม์ที่ติดบนเจลวัดได้ประมาณ 4-5 มิลลิกรัมต่อเจลแห้ง 1 กรัม โดย activity ของเอนไซม์ที่ติดบนเจล (immobilized enzyme) มีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระหลังจากที่ตัดออกจากเจลแล้ว นำ immobilized เอนไซม์ที่เตรียมได้นี้ไปใช้ในการคัดเลือกลำดับที่ยับยั้งที่ดีออกจากห้องสมุดเชิงรวม โดยอาศัยความสามารถที่ต่างกันในการจับตัวของเอนไซม์กับตัวยับยั้งแต่ละตัว เมื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของตัวยับยั้งที่ไม่ถูกเอนไซม์จับด้วยเครื่อง HPLC-MS ก็พบว่าตัวยับยั้งตัวใดที่มีความสามารถจับกับเอนไซม์ได้ดี โดยสามารถยืนยันได้จากผลการวิเคราะห์ตัวยับยั้งที่ถูกเอนไซม์จับไว้ ซึ่งจะถูกทำให้หลุดออกจากเอนไซม์โดยกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ (guanidine hydrochloride)

คำหลัก : Immobilized เอนไซม์, พลาสมิเดียม ฟัลซิพาร์ม ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส, ห้องสมุดเชิงรวม, ตัวยับยั้งเอนไซม์ไดไฮโดรโฟเลตรีดักเตส

Abstract

Project Code : TRG4880001

Project Title : Immobilization of pfDHFR for the Selection of Tight-Binding Inhibitors from Combinatorial Library

Investigator : Chawanee Thongpanchang, Ph.D.
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

E-mail Address : chawanee@biotec.or.th

Project Period : 2 Years

In this study, the method for immobilization of pfDHFRs onto the solid support has been developed for the selection of tight-binding inhibitors from combinatorial library. pfDHFRs with cysteine residue at the C-terminal have been prepared in order to immobilize to a thiopropyl-Sepharose gel via S-S linkage. The amount of immobilized DHFRs was estimated to be 4-5 mg/g of dried gel, and the activities of the bound DHFRs were comparable to that of the free enzymes. The prepared immobilized enzyme has been used for the selection of tight-binding inhibitors from the combinatorial library, based on the affinities of each inhibitor with the enzyme. Free inhibitors were then identified and analyzed quantitatively by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and the components with high binding affinity of the library could thus be realized. Results could be confirmed by quantitative analysis of the bound inhibitors released from the enzyme by guanidine hydrochloride treatment.

Keywords : Immobilized enzyme, *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase, Combinatorial library, DHFR inhibitors