บทคัดย่อ

LDH-X เป็นไอโซไซม์หนึ่งของเอ็นไซม์แล็คเตท ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งพบเฉพาะในตัวอสุจิและอัณฑะที่เจริญเต็มที่ของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมและนกบางชนิด และมีคุณสมบัติต่างจากไอโซไซม์อื่นๆ ดังนั้นการทดลองนี้จึงเกี่ยวกับการทำ LDH-X จากอัณฑะของคนให้บริสุทธิ์ไม่ให้มีไอโซไซม์และโปรตีนอื่นๆเจือปนอยู่ โดยวิธีการต่างๆและเปรียบเทียบผลการทดลองจากวิธีการเหล่านี้

เซลลูโลส คอลัมน์ โครมาโตกราฟฟี่ หรือ ไอโซอีเล็คตริค โฟคัสซิ่ง สามารถใช้แยก LDH-X ออกจากไอโซไซม์อื่นๆได้ แต่ไม่สามารถแยกจากไอโซไซม์หนึ่งที่มีการเคลื่อนที่ในอีเล็คโตรโฟรีซิสเท่ากับ LDH-HM_3 ออกซาเมท เซฟาโรส คอลัมน์ สามารถทำให้ LDH-X บริสุทธิ์จากโปรตีนอื่นๆ และพบว่าสับสเตรทต่างๆสามารถลดการจับของเอ็นไซม์กับคอลัมน์นี้ นอกจากนี้แล็คเตท (1 มิลลิโมลาร์) สามารถเพิ่มการแตกตัวของเอ็นไซม์ออกจากคอลัมน์ คอลัมน์ที่มีแอนติบอดีของ LDH-M_4 และ LDH-H_4 จับกับเซฟาโรสก็ใช้ในการทำให้ LDH-X บริสุทธิ์ แต่การทำให้ LDH-X บริสุทธิ์โดยวิธีนี้จากสารจำนวนมาก พบว่ามีไอโซไซม์คล้าย LDH-HM_3 ปะปนกับLDH-X ด้วย ซึ่งไอโซไซม์นี้ก็เคยพบปะปนกับ LDH-X ในการทดลองโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี่ด้วยเซลลูโลส หรือโดย ไอโซอีเล็คตริค โฟคัสซิ่ง เป็นที่น่าสังเกตว่าไอโซไซม์ที่เจือปนมาด้วยนี้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านคอลัมน์ ด้วยเหตุผลนี้และจากผลการศึกษาความสามารถของเอ็นไซม์ในการใช้สารอัลฟา คีโตบิวทิเรท (1 มิลลิโมลาร์) และ ไพรูเวท (0.3 มิลลิโมลาร์) เป็นสับสเตรท ทำให้คิดว่า ไอโซไซม์นี้อาจจะไม่ใช่ LDH-HM_3 จริงๆ แต่อาจจะเป็น LDH-X ที่ถูกดัดแปลงไป

ABSTRACT

LDH-X is one of the six LDH isozymes and appears to be tissue-specific since it is found only in spermatozoa and the mature testes of most mammals and some birds but not in other tissues. This isozyme shows several properties distinct from other LDH isozymes. Studies were therefore initiated on the purification of human LDH-X from human testes free from other isozymes and free from other proteins. Several different procedures were tried and their effectiveness compared.

LDH-X could be purified from other LDH isozyme but not from an LDH with the same electrophoretic mobility as LDH-HM_3, by means of ion-exchange chromatography on a DEAE--cellulose column or by preparative isoelectric focusing. LDH isozymes bind to oxamate-Sepharose in the presence of NADH at concentrations of 5 μM or greater and are successfully purified from other proteins by affinity chromatography on this support. Various substrates, α-hydroxybutyrate, α-hydroxyglutarate and α-ketobutyrate decrease the NADH-dependent binding of LDH to oxamate-Sepharose. Similarly inclusion of 1 mM DL-lactate in the elution buffer increases rate of dissociation of LDH from this column so that the enzyme is obtained in a smaller volume. LDH-X could be successfully purified free from other LDH isozymes by chromatography on an immunoadsorbent comprising of anti--human AcLDH-M_4 and anti-human LDH-M_4 antibodies bound to

Sepharose. However, in a large scale purification of LDH-X by antibody-Sepharose column, an LDH-HM_3 like isozyme was found to contaminate the LDH-X. This LDH-HM_3 like isozyme also contaminated LDH-X during the DEAE-cellulose chromatography and preparative isoelectric focusing and in the large scale antibody-Sepharose column. This anomalous LDH-HM_3 was obtained in greater than 100% in all cases, suggesting that it may be an artifact arising from other isozymes during purification. From a study of the relative LDH activities with 1 mM α-ketobutyrate as substrate and with 0.3 mM pyruvate as substrate, there was some suggestion that this isozyme may not be authentic LDH-HM_3 but might somehow have been derived from a modification of LDH-X.

BIOGRAPHY

Name Prapaporn Toowicharanont

Date of Birth January 4, 1953

Place of Birth Nakornsridhamarat, Thailand

Institutions Attended:

Kulayaneesridhamarat School, Nakornsridhamarat

March, 1968.....Certificate of Mathayom Suksa III

Benjamarachutit School, Nakornsridhamarat

March, 1970.....Certificate of Mathayom Suksa V

Chulalongkorn University, Faculty of Science, Bangkok

March, 1974.....Bachelor of Science in Biochemistry with Second Class Honours.