



PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
DIHYDROFOLATE REDUCTASE FROM *P. FALCIPARUM*.

17 ค.ศ. 2532

SIRILUK ATAMAPRASANGSA
A

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1988

Copyright by Mahidol University

<p>อธินันท์นากการ จาก นักศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล</p>
--

12086

ชื่อวิทยานิพนธ์

การทำให้อริสทูทและคุณสมบัติของแอนไซม์

ไดไฮโดรโฟเรท ริดี้กเทส จากเชื้อ

P. falciparum K₁

ผู้วิจัย

น.ส. ศิริลักษณ์ อาตมประสังสา

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

นาย ยงยุทธ ยุทธวงศ์

นางสาว พิณฑิพ รื่นวงษา

ม.ร.ว. ชัชวาลย์ สวัสดิวัตน์

วันที่สำเร็จการศึกษา

16 มิถุนายน 2531

บทคัดย่อ

ไดไฮโดรโฟเรท ริดี้กเทสและโทมิโดเรท ซินทีเอส เป็นแอนไซม์หลักสำหรับการสังเคราะห์ DNA ในมาเลเรียพาราไซต์ ซึ่ง dTMP ถูกสังเคราะห์ขึ้นเอง. ความพยายามเพื่อทำให้อันไซม์ไดไฮโดรโฟเรท ริดี้กเทสจากเชื้อ P. falciparum K₁ ได้ถูกทำขึ้น. ครั้งแรกแอนไซม์ได้ถูกทำให้อริสทูทเพียงบางส่วนโดย folate-Sepharose CL-4B column chromatography. ประมาณ 30 fold purification และ 69% yield ถูกได้รับจาก column นี้. แต่อย่างไรก็ตามแอนไซม์จาก folate-Sepharose CL-4B ถูกแสดงว่ามีหลาย protein bands บน SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Methotrexate (MTX)-Sepharose CL-4B column ถูกนำมาใช้เพื่อให้ได้รับการทำให้อริสทูทที่ตักว่า. แอนไซม์ถูกทำให้อริสทูทประมาณ 150 fold ด้วย 63% yield โดย MTX-Sepharose column. น้ำหนักโมเลกุลของแอนไซม์ประมาณโดย gel filtration ด้วย Sephacryl S-300 column ที่ค่าประมาณ 160,000. น้ำหนักโมเลกุลของแอนไซม์ประมาณโดย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ประมาณ 67,000.

เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 6.0 และที่อุณหภูมิ 40 °C. เอนไซม์จากเชื้อ *P. falciparum* K_i ถูกกระตุ้นโดย 0.1–0.5 M KCl. แต่อย่างไรก็ตามการลดลงทีละน้อยของเอนไซม์ถูกสังเกตเห็นเมื่อความเข้มข้นของ KCl เพิ่มจาก 0.5 M ถึง 1.0 M. เอนไซม์มีค่า K_m ของ dihydrofolate เท่ากับ 7.6 μ M และ K_m ของ NADPH เท่ากับ 15.9 μ M. การยับยั้งของเอนไซม์ ไดไฮโดรโฟเวทรีคิกเทลดจากเชื้อ *P. falciparum* K_i โดย pyrimethamine เป็นการยับยั้งแบบผสม ซึ่งที่ค่า K_{is} เท่ากับ 0.7 nM และ K_{i1} เท่ากับ 2.35 nM.

for the enzyme were about 6.0 and 40 °C respectively. The enzyme from *P. falciparum* K₁ was slight activated by 0.1-0.5 M KCl . However , a slight decline in its activity was observed as KCl concentrations increased from 0.5 M to 1.0 M . The K_m values for dihydrofolate and NADPH of the enzyme was 7.6 μM and 15.9 μM respectively. Inhibition of dihydrofolate reductase from *P. falciparum* K₁ by pyrimethamine was found to be inhibition of mixed type with K_{is} of 0.7 nM and K_{ii} of 2.35 nM.