Thesis Title Applications of Peroxidase from Fingerroot (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) in a Glucose Test Strip and Lectin Detecting Method

Author Miss Jiraporn Ketvaraporn

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Lalida Shank Chairperson

Asst. Prof. Dr. Mookda Pattarawarapan Member

ABSTRACT

Glucose test strip was constructed by immobilization of coupling enzymes, glucose oxidase and peroxidase, and chromogen on a polymeric support. The intensity of color shade after the reaction on the strip was dependent to the concentration of glucose in the test samples. The optimal conditions for immobilization included the concentration of glucose oxidase (GOD) at 80 U and horseradish peroxidase (HRP) at 315 U or 3.75 U (when activity was reported using *o*-diainisidine and *o*-tolidine as substrate, respectively). FRP fraction from 20-40% saturation of ammonium sulfate precipitation demonstrated high potential for application in strip test when it was used in place of HRP. Moreover, the suitable buffer was 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0 and the appropriciate chromogens were *o*-dianisidine and *o*-tolidine at concentration of 5 mg/ml. The response time of the development of color of the strip was 5 min. Affinity purified fingerroot peroxidase was subsequently applied in a model of lectin detecting using HRP as reference. The sugar-lectin binding assay was used in the avidin-biotin system for detection of lectin.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

First, lectins were immobilized onto 96 well microplates and the biotin-galactose conjugates were then added to the wells. Avidin-peroxidase conjugates were then added to bind with biotin. The substrate of peroxidase was finally added to generate the reaction giving the color product. This assay was used to screen lectin specific binding to galactose. Four lectins from jack bean, jackfruit seeds, peanut and wheat germ were selected to validate the method. The optimal conditions for this assay were 0.032% (v/v) hydrogen peroxide, 0.8 mg/ml 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 0.32 mM biotin-galactose conjugates. Avidin-HRP conjugates at 3.50 and 1.25 μU/well and avidin-FRP conjugates at 3.50 μU/well were applied in this assay when activity unit was calculated using ABTS as substrate. The results showed that FRP conjugates successfully detected lectins although higher amounts were required than those of HRP.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การประยุกต์เปอร์ออกซิเดสจากกระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) ในแผ่นตรวจกลูโคสและวิธีตรวจหาเลคติน

ผู้เขียน นางสาวจิราพร เกตุวราภรณ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ลลิดา แชงค์ ประธานกรรมการ

ผศ. ดร. มุกดา ภัทราวราพันธ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

แผ่นตรวจกลูโคสสร้างได้โดยการตรึงเอนไซม์ที่ทำงานควบคู่กันคือ กลูโคสออกซิเดส เปอร์ออกซิเดส และโครโมเจนลงบนแผ่นรองรับโพลิเมอร์ ความเข้มของสีหลังปฏิกิริยาบนแผ่นตรวจกลูโคสขึ้นอยู่กับปริมาณกลูโคสที่ตรวจจับได้ในตัวอย่าง สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึง ได้แก่ ความเข้มข้นของกลูโคสออกซิเดส (GOD) ที่ 80 ยูนิต ความเข้มข้นของฮอสเรดิชเปอร์ออกซิเดส (HRP) ที่ 315 ยูนิต หรือ 0.60 ยูนิต เมื่อใช้ออโธไดอนิซิดินและออโธโทลีดีนเป็นซับสเตรทตามลำดับ และเปอร์ออกซิเดสจากกระชายที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 20-40% ที่ 53 U แสดงศักยภาพสูงที่จะใช้ทดแทน HRP เมื่อใช้ในแผ่นตรวจ สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมคือ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 และโครโมเจนที่เหมาะสมคือ ออโธไดอะนิซิดีน และออโธโทลิดีน ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับความไวในการเกิดสีบนแผ่นตรวจกลูโคสคือ 5 นาที เปอร์ออกซิเดสที่ผ่านแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟฟีได้ถูกนำมาใช้ไปในวิธีการวิเคราะห์หาเลคติน โดยใช้ฮอสเรดิชเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์อ้างอิง ในการทดสอบการจับกันของน้ำตาลและเลคติน ได้ใช้ระบบการตรวจหาเลคตินผ่านระบบความชอบจับกันของอวิดินและไบโอติน ในขั้นแรกเลคตินจะถูกตรึงบนแผ่น 96 หลุม และหลังจากนั้นจะเติมไบโอตินที่จับอยู่กับน้ำตาลกาแลคโตสลงไป ต่อมาอวิดินที่จับอยู่กับเปอร์ออกซิเดสจะถูกเติมลงไป เพื่อให้อวิดินจับกับไบโอตินซับสเตรทของเปอร์ออกซิเดสจะถูกเติมลงไปในขั้นตอนสุดท้าย เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสี การทดสอบนี้เป็นการตรวจหาเลคตินที่มีความชอบจับกับน้ำตาลกาแลคโตส เล คติน 4 ชนิด ได้แก่ เลคตินจากถั่วแจ็คบีน เลคตินจากเม็ดขนุน เลคตินจากถั่วลิสง และเลคตินจากข้าวสาลีได้ถูกนำมาทดสอบวิธีการทดลอง สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิเคราะห์ได้แก่ ความเข้มข้นของไฮโดนเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 0.032% ความเข้มข้นของอดิโนบิส-เอธิลเบนโซไธโซลีนซัลโฟนิคเอซิดที่ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของไบโอตินที่เชื่อมกับน้ำตาลกาแลคโตส ที่ 0.32 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อวิดินที่เชื่อมกับฮอสเรดิชเปอร์ออกซิเด สที่ 3.50 และ 1.25 ไมโครยูนิตต่อหลุม คำนวณหน่วยแอคติวิตีเมื่อใช้อดิโนบิสเอธิลเบนโซไธโซลีน-ซัลโฟนิคเอซิด เป็นซับสเตรท และอวิดินที่เชื่อมกับเปอร์ออกซิเดสจากกระชาย 3.46 ไมโครยูนิตต่อหลุม ผลที่ได้แสดงว่า อวิดินที่เชื่อมกับเปอร์ออกซิเดสจากกระชายประสบความสำเร็จในการใช้ตรวจหาเลคติน แม้ว่าจะใช้ในปริมาณที่มากกว่าอวิดินที่เชื่อมกับเปอร์ออกซิเดสจากฮอสเรดิช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved