

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อลำเลียง
ในต้นยางพารา

Biochemical Process in Latex Vessel Plugging
of *Hevea brasiliensis*

โดย

วิศิษฐาณ นิลิตสุพรรณกุล
จิรายุส นิลิตสุพรรณกุล
ปัทมวรรณ ภานิตกุล
นายแก้ว เจริญวิทย์พร
*อมรรณมาศ วิเศษวี

ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
*มหาวิทยาลัยมหิดล

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

๒๕๕๑

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยาง
ในต้นยางพารา

Biochemical Process in Latex Vessel Plugging
of *Hevea brasiliensis*

โดย

รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล

*ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล

ปิยะเกรณ์ ภาณุกุล

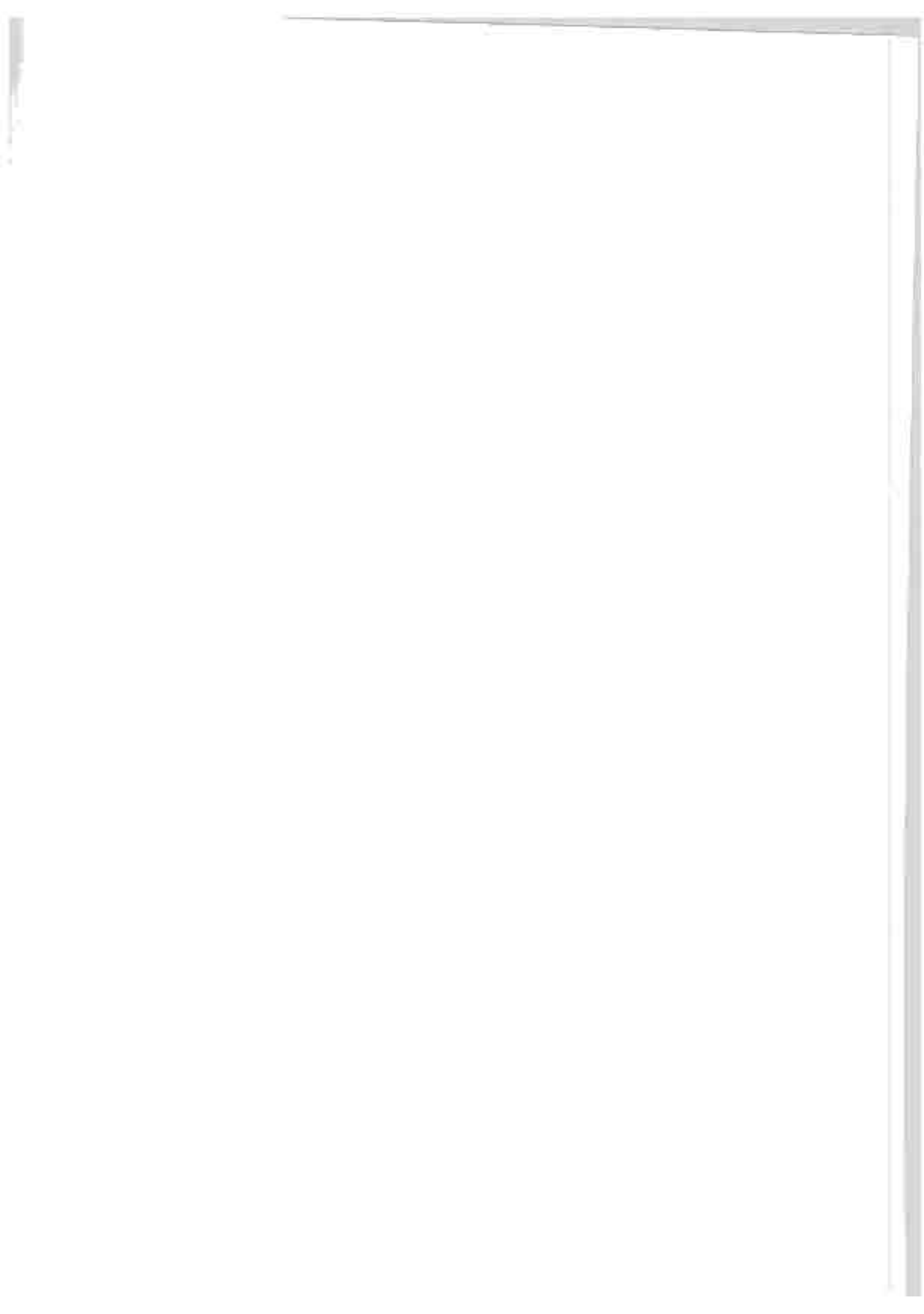
นพแก้ว เจริญพิพากร

*กมลชนก รักเสรี

ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

* มหาวิทยาลัยมหิดล



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ยววิวิจัย รุ่นที่ 1) และ จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นเวลา 3 ปีตั้งแต่ 1.ค. 2537 ถึง
30 พ.ค. 2540

ไปเป็นคิวโนน ทำให้เพิ่มโอกาสในการเกิด semi-คิวโนน และ active oxygen species ได้มากขึ้นอีก แต่หากในขณะนั้นมี สปีสสเตรฟตัวอื่นๆ เช่น ฟีนอลที่อยู่ในซี-ซีรีม มาแข่งขันกับสปีสสเตรฟคิวโนน ก็อาจทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มคิวโนน จาก semi-คิวโนน ลดลง การทำงานของเปอร์ออกซิเดสและ ไลโปพeroxidase จะลดลง ไม่ว่าจะให้สปีสสเตรฟตัวใดก็ตาม จะมีผลในการลดปริมาณ H_2O_2 และ O_2 ลง ตามลำดับ นอกจากนี้คณะวิจัยยังพบว่าทั้งปริมาณเปอร์ออกซิเดสจากเปลือกถั่วของไม้ยาง ที่ได้จาก การกรีด และปริมาณสารฟีนอลใน ซี-ซีรีมของน้ำยาง จะสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของที่ได้ต่อ ครั้งกรีด โดยมีค่าประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.76 และ 0.91 ตามลำดับ

เมื่อถูกออกซิเดชันจะทำให้เกิดลูโอดิน (luteodin) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์เป็นแอลคัลที่บริเวณผนัง เมมเบรนของลูโอดินที่ออกออกมา ทำความเสียหายทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง (การเกาะจับ) จีฬะของลูโอดินกับอนุภาคยางนี้ ไม่ได้เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ แต่เกิดจากการที่ receptor site ของลูโอดิน สามารถ recognize กลุ่ม ไกลโคโปรตีนบนโปรตีน (rubber particle-luteodin binding protein, RP-LBP) ที่มีวของอนุภาคยาง ทำให้เกิดการเกาะจับจีฬะและรวมกันเป็น กลุ่มก้อนซึ่งเป็นที่มาของการอุดตันในท่อน้ำยางได้ โดยเราสามารถเห็นลักษณะการเกาะกลุ่ม ของอนุภาคยางดังกล่าวได้ จากการทดสอบนำลูโอดินที่แยกและผ่านวิฤทธิได้จาก ผลิตภัณฑ์ของ ลูโอดินมาผสมกับอนุภาคยาง ในสภาพธรรมชาติเมื่อลูโอดินแตกตัว จากเมมเบรนของลูโอดินจะ แปรผลอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวภายในท่อน้ำยาง ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่าใน ส่วนที่เป็นของเหลวตัว ก่อตัว จะมีไกลโคโปรตีน (cytosol-luteodin binding protein, C-LBP) อีกชนิดหนึ่ง ที่สามารถเกาะ จับจีฬะกับลูโอดิน ได้เช่นกัน ดังนั้นจะเห็นว่าทั้ง RP-LBP และ C-LBP จะต้องแข่งขันกัน เกาะจับจีฬะกับลูโอดิน และการจับกันระหว่าง RP-LBP ของอนุภาคยางกับลูโอดิน เท่านั้น ที่จะ นำไปสู่การเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มก้อน เพื่ออุดขวางการไหลของน้ำยาง นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับ C-LBP ในซี-ซีรีมของน้ำยาง มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณของที่ได้ต่อครั้งกรีด โดยมีค่าประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.91

นอกจากนี้วิฤทธิและลักษณะคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของ ท่อน้ำยางทั้งที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ซึ่งได้แก่ NAD(P)H คิวโนน รีดักเตส, เปอร์ออกซิเดส กับ ไลโปพeroxidase และที่เอนไซม์อื่น ๆ แต่ก่อให้เกิดหรือยับยั้งการเพิ่มปริมาณในสายเกาะกลุ่มของ อนุภาคยางซึ่งได้แก่ ลูโอดิน, RP-LBP และ C-LBP ที่พอจะสรุปได้มีดังนี้:

NAD(P)H คิวโนน รีดักเตส (QR) สามารถเตรียมได้ B-serum ที่ได้จากกรรมวิธี bottom fraction ที่ได้จากสารเป็นเยื่อที่นำยางสดไปผ่านขั้นตอน freeze-thaw จากการทำ IEF พบว่ามี QR หลายชนิด โดยมีค่า pI เท่ากับ 4.6, 5.0, 6.2, 6.7 และ 7.4 โดยชนิดที่มีค่า pI เท่ากับ 6.2 จะมีปริมาณ QR แยกตัวที่สูงสุด โดยมีค่า M_r จากการทำ SDS-PAGE ประมาณ 57 kD QR มีความสามารถในการยับยั้ง การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันตามลำดับดังนี้ p-benzoquinone>menadione>plumbagin>juglone>duroquinone

ตามลำดับ โดยพบว่า dicumaryl มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ QR ส่วน pH ในการทำงานที่เหมาะสมที่สุดคือ 8 โดย QR สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH จากช่วง 6-10 และ ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C

เปอร์ออกซิเดส สามารถเตรียมได้จากเปลือกขนของไม้ยางที่ถูกฉีกจนออกจนขาวกริดขาว และพบว่าเปอร์ออกซิเดสนี้สามารถหักงาที่เปลี่ยน ฟีนอลจาก จี-ซีรีนในน้ำยาง ให้กลายเป็นโพลีฟีนอล เราสามารถทำให้เปอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ได้โดยการแยกผ่าน คอลัมน์ โดยอาศัยคุณสมบัติทางขนาด สภาพการมีประจุ และการเกาะจับจำเพาะของแอนไอน์ เมื่อทำการวิฤกษ์แล้วปรากฏว่าเปอร์ออกซิเดส มีค่า M_r จากการทำให้ SDS-PAGE และน้ำหนักโมเลกุลรวม จากการแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยขนาด เท่ากับ 50 kD มีค่า pI เท่ากับ 3.5 และ การทำงานที่เหมาะสมที่ pH 5.4, ค่า K_m ต่อ o -dianisidine และ H_2O_2 เท่ากับ 20 และ 18.6 μM ตามลำดับ ค่า K_i ของตัวยับยั้ง KCN และ NaN_3 เท่ากับ 34 และ 41 μM ตามลำดับ

โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO) สามารถเตรียมได้ B-serum ที่ได้จากการนำ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสดไปผ่านขั้นตอน freeze-thaw โดยนำสารละลายที่ได้จากการละลายพลาสมา B-serum ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ไปผ่านวิฤกษ์ด้วยคอลัมน์ CM-Sepharose จะได้ PPO I และ PPO II โดยมีค่า M_r ที่ได้จากการทำให้ SDS-PAGE เท่ากับ 32 และ 34 kD ตามลำดับ และมีค่า pI เท่ากับคือ 9.3 โกลบูลูลินทั้งสองทำงานได้ดีในช่วง pH 5-8 โดยมีอุณหภูมิในการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 35-40°C และทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60°C เมื่อใช้ dopamine และ L-dopa เป็นสับสเตรท PPO-I ให้ค่า K_m เท่ากับ 2.08 และ 9.33 mM ส่วน PPO-II ให้ค่า K_m เท่ากับ 2.12 และ 4.76 mM ตามลำดับ

ลูทอยดิน สามารถเตรียมได้จากอนุภาคลูทอยด์ ซึ่งแยกได้จากส่วนของ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยการนำไปตกตะกอนด้วยอะซีโตน แล้ว นำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl 0.2% Tris-HCl X-100 บำบัดสารตกค้างที่ได้ไปผ่านวิฤกษ์ด้วยโดยการแยกผ่านคอลัมน์ไอออน และ DEAE-Sepharose พบว่าลูทอยดินมีค่า M_r ที่ได้จากการทำให้ SDS-PAGE เท่ากับ 17 kD และ น้ำหนักโมเลกุลรวมจากการแยก โดยอาศัยขนาดประมาณ 276 kD ลูทอยดินสามารถทำให้อนุภาคยางเกาะกันเป็นกลุ่มได้ และตัวลูทอยดินเองยังสามารถทำให้มีดสีเกิดแดงจาก กระดาษ หรือ หมู และกลุ่มได้ด้วย จึงมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ ซึ่งเราสามารถในการทำ ให้มีดสีเกิดแดงจากกระดาษกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งโดยโกลโคโปรตีนหลายชนิด คือ fetuin, asialofetuin, ovomucoid, concan, asialomucin ส่วน Cl_2 -acid glycoprotein หรือ น้ำตาลดีบุกหรือหมู่สายตัวจะไม่ สามารถทำการยับยั้งดังกล่าวได้ ในทำนองเช่นกัน การเกาะจับของอนุภาคยางที่อุณหภูมิเย็นน้ำโค ลูทอยดิน จะสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย fetuin แต่ ไม่ถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำตาลดีบุก concan ลูทอยดิน สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 60°C และทนต่อความเป็นกรดด่างได้ดี ตั้งแต่ช่วง pH จาก 5-10

RP-LBP สามารถแยกได้จากชั้นบนสุดหรือชั้นของยางที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยแยกตามความหนาแน่น zone 2 ซึ่งเป็นชั้นยางด้านที่สัมผัสกับชั้นของ C-serum ซึ่งมีลักษณะคล้ายวุ้นสีขาวใส ไปทำปฏิกิริยาโดยการผ่านการล้างด้วย isotonic buffer หลังจากนั้นทำการสกัด ด้วย 0.2% Triton X-100 ป่าสารที่สกัดได้ไปลดทอนด้วยอะซิโตน แล้วย่นตะกอนที่ละลายได้ ไปอุ่นในน้ำเดือด 2 นาที แล้วย่นแยกเอาส่วนใสไปทำปฏิกิริยาคัดโดยการแยกผ่านคอลัมน์ โดยอาศัยข้อแตกต่างของขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นเป็นประจุที่แตกต่างกับของโปรตีน พบว่า RP-LBP ที่ทำปฏิกิริยาได้ มีค่า M_r ที่ได้จากการทำ native PAGE และ SDS-PAGE เท่ากับ 120 และ 34.5 kD ตามลำดับ มีค่า pI เท่ากับ 3.4 และค่า pH ที่เหมาะสมกับการทำงานในช่วง 5-8 โดยสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงถึง $60^{\circ}C$ ได้นานกว่า 30 นาที RP-LBP สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของกระต่าย ที่เหนียวมาให้เกิดขึ้นโดยอุทกอลัน โดยสามารถยับยั้งได้ประสิทธิภาพสูงสุดหรือใช้ความเข้มข้นโปรตีนได้ต่ำสุด เมื่อเทียบกับโกลโคโปรตีนจากแหล่งอื่นๆที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์โคเลสเตอรอลเอสเทอเรสยังการทำงานของ RP-LBP

C-LBP สามารถแยกได้จากชั้นของส่วนใสในชั้นกลาง (ซี-ซีรัม) ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge โดยสามารถนำไปทำปฏิกิริยาได้ ด้วยการลดทอนด้วยกลีเซอรอลในโบรมิเดิลเฟด แล้วย่นแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยข้อแตกต่างของขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นเป็นประจุที่แตกต่างกับของโปรตีน พบว่า C-LBP มีค่า M_r ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 40 kD และมีน้ำหนักโมเลกุลรวมจากการแยกผ่านคอลัมน์โดยอาศัยขนาดประมาณ 204 kD มีค่า pI เท่ากับ 4.7 โดยสามารถทนความร้อนเป็นกรดต่ำได้ถึงต่ำกว่า pH 6-10 และ ทนต่ออุณหภูมิสูงถึง $50^{\circ}C$ C-LBP สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางและเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่เหนียวมาให้เกิดขึ้นโดยอุทกอลัน โดยพบว่า โคเลสเตอรอลเอสเทอเรสยังการทำงานของ C-LBP ได้ ท่านขอติดวกับกับที่พบกับ RP-LBP นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ C-LBP ในน้ำยางจะมี ความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณน้ำยางที่ได้ต่อครั้งการคัด

โดยสรุปกระบวนการทางชีวเคมีที่มีผลเกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยางในต้นยางพาราในชั้นแรกเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างสารพิษออกซิเจนเพื่อไปทำลายเซลล์ผิวรากของแมลงเม่นของอนุภาคอุทกอลันทำให้ถูกย่อยสลาย นั่นเกิดไปเกิดจากที่อุทกอลันซึ่งไหลออกมาจากแมลงเม่นของอุทกอลันถึงการแตก ไปทำให้น้ำที่เหนียวอุดตันในการจับจำเพาะกับโกลโคโปรตีนบนผิวอนุภาคยาง (RP-LBP) ก่อให้เกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนขัดขวางการไหลของน้ำยางและเกิดการอุดตันของท่อน้ำยางในที่สุด กลุ่มสารที่เกี่ยวข้องทั้งหมดนี้รวมเป็น coagulating factors ในทางกลับกันจะมีกลุ่มสารที่ทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factors ซึ่งได้แก่ เปอร็อกซิซิคลและฟีนอลในซี-ซีรัม ที่ส่งผลต่อการลดการเกิดสารพิษออกซิเจน และโกลโคโปรตีน (C-LBP) ในซี-ซีรัม ที่ไปขัดขวางการเกาะกลุ่มระหว่างอุทกอลันกับอนุภาคยาง โดยพบว่าปริมาณ anti-coagulating factors เหล่านี้จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้งการคัด ซึ่งสมควรจะพัฒนาให้เป็นตัวบ่งชี้ศักยภาพในการไหลของน้ำยางในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ยางพาราต่อไป

Biochemical Process in Latex Vessel Plugging of *Hevea brasiliensis*

Rapepun Wittawatwankul, *Dhirayee Wittuwannakul, Piyaporn Pusitkul, Nopphakaeew

Chireonthipakorn and *Karnolichusok Ruksee

Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai.

*Dept. of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok

Abstract

Rubber latex is a viscous white liquid synthesized and stored in latex vessel. Besides a major liquid cytosol (C-serum) content in rubber latex, various suspended particles, in decreasing quantities, are rubber particles, luteoids and Frey-Wyssling complex, respectively. Rubber tapping was performed by making cuts across latex vessels. The rubber tree has a mechanism to minimize its metabolite lost due to tapping by forming plug at the tapping site in order to retard latex flow. An early electron microscopic study revealed the presence of rubber particles and luteoid debris at the plugging site to impede latex flow. Our present study on the biochemical process in latex vessel plugging of *Hevea brasiliensis* suggests the involvements of two cooperative processes. One is enzymatic dependent leading to luteoid binding and another is non-enzymatic dependent involving specific aggregation between rubber particles and luteoid membrane debris.

Upon tapping, the opening end of latex vessel is exposed to atmospheric O_2 which in turn promotes activities of several oxidases leading to production of active oxygen species including superoxide (O_2^-), hydroxyl radical ($OH^\cdot$) and H_2O_2 . These active oxygen species will cause luteoid membrane damage. The process may begin with reduction of quinone into semi-quinone by the NAD(P)H oxidase or NAD(P)H quinone reductase on luteoid membrane. In the presence of O_2 , the semi-quinone can auto-oxidize into quinone by producing O_2^- . The reaction between O_2^- with surrounding H_2O_2 results in formation of $OH^\cdot$ (Fenton & Haber-Weiss reaction). The $OH^\cdot$ will cause damage to the unsaturated double bond of fatty acid in luteoid membrane and lead to membrane breakage. Consequently, peroxidase and polyphenol oxidase in latex cytosol will utilize H_2O_2 and O_2 , respectively to oxidize hydroquinone substrate into its corresponding quinone product, hence increasing further chance on semi-quinone and active oxygen species production. However, opposite outcome may also

occur if there are other substrates such as C-serum phenols competing with hydroquinone for these enzymes. Whichever substrate is utilized, the reactions catalyzed by peroxidase and polyphenol oxidase will result in decreasing H_2O_2 and O_2 contents, respectively. Accordingly, we found direct correlations between level of bark peroxidase and C-serum phenols with rubber yield per tapping, $r=0.76$ and 0.91 , respectively.

The bursting of luteoid will lead to an exposure of lutoidin, possessing lectin activity, on its membrane. The lutoidin will agglutinate particle particles. The aggregation of rubber particles is a non-enzymatic process involving recognition of glycoprotein (rubber particle-lutoidin binding protein, RP-LBP) on rubber particle by its receptor site on the lutoidin. These specific bindings led to rubber plug formation in latex vessel to retard flow. The agglutination of rubber particles can be demonstrated *in vitro* by mixing lutoidin, purified from luteoid membrane with rubber particles. In the *in vivo* situation, after luteoid breakage its membrane debris remained suspending in latex cytosol where another glycoprotein that can bind to lutoidin (cytosol lutoidin binding protein, C-LBP) was also found. Therefore, it is seen that both RP-LBP and C-LBP will have to compete for lutoidin binding and only with the former that rubber particle aggregation can be formed to impede latex flow. Accordingly, the level of C-LBP is directly proportional to rubber latex yield per tapping, with $r=0.97$.

The results obtained from purification and characterizations of proteins involved in latex vessel plugging on the enzymatic process including NAD(P)H quinone reductase, peroxidase and polyphenol oxidase and the non-enzymatic process leading to rubber particle aggregation including lutoidin, RP-LBP and C-LBP can be summarized as follows:

NAD(P)H quinone reductase (QR) was prepared from B-serum, obtained from bottom fraction of ultracentrifuged fresh latex, by repetitive freeze-thawing. Upon REP, several QRs were found with pIs of 4.6, 5.0, 6.2, 6.7 and 7.4. The most dominant form of QR possessed pI value of 6.2 and M_r of 57 kD upon SDS-PAGE. Different substrate specificities on QR were detected as follows: *p*-benzoquinone>menadiolone>plumbagin>juglone>duroquinone, respectively. Dicumarol was found to inhibit QR activity. Optimum pH was observed at 8 while pH stability ranging from 6-10. QR is heat stable up to 70 °C.

Peroxidase was prepared from excised *Hevea* bark strips obtained after tapping. The bark peroxidase was capable to convert phenols isolated from C-serum fraction of centrifuged latex into polyphenolic forms. The peroxidase was purified to homogeneity by size exclusion, ion exchange and affinity chromatography. SDS-PAGE and gel filtration chromatography

indicates that purified peroxidase is composed of a single polypeptide of M_r 50 kD. The enzyme has a pI of 3.5. The K_m values for *o*-dianisidine and H_2O_2 were 20 and 18.6 μM , respectively, and the K_i values for KCN and NaN_3 for these substrates were 10 μM and 2.7 mM, respectively.

Polyphenol oxidase (PPO) was prepared from B-serum by repetitive freeze-thawing of bottom fraction obtained from ultracentrifuged fresh latex. The B-serum was subjected to acetone precipitation and the solubilized precipitate was further purified through CM-Sephurase column. Two PPO were obtained, PPO-I and PPO-II with M_r under SDS-PAGE of 32 and 34 kD, respectively. Both PPOs possess pI of 9.3 and have optimum pH and temperature ranging from 5-8 and 33-40°C, respectively. They are heat up to 60°C. The K_m values of PPO-I for dopamine and L-dopa are 2.08 and 8.33 mM, respectively while those for PPO-II are 2.12 and 4.76 mM, respectively.

Latiodin was isolated from liquid (bottom) fraction of centrifuged rubber latex under acetone precipitation. Latiodin was extracted from the acetone precipitate in buffer containing 0.2% Triton X-100 and purified to homogeneity after chain and DEAE-Sephurase column. The M_r upon SDS-PAGE is 17 kD with native M_r obtained by gel filtration of 276 kD. It is able to agglutinate rubber particles and erythrocytes from either rabbit or mouse. The hemagglutination or lectin activity of latiodin can be inhibited by several glycoproteins such as fetuin, asialofetuin, ovomucoid, mucin, asialomucin but not α_1 -acid glycoprotein, mono- or di-saccharides. Similarly, the ability of latiodin in inducing rubber particle aggregation was also inhibited by fetuin but not monosaccharide like GlcNAC. Latiodin is heat stable up to 60°C and its pH stability ranging from 5-10.

RP-LBP was isolated from rubber layer obtained after ultracentrifugation of fresh latex. The zone 2 of rubber layer facing aqueous C-serum phase with white jelly-like appearance was isolated and washed with isotonic buffer. RP-LBP was then extracted in the presence of 0.2% Triton X-100. Acetone precipitation was performed on the extract and resultant pellet was solubilized and dipped in boiling water for 2 min. RP-LBP was further purified from supernatant obtained after heat-treatment by passing through gel filtration and ion exchange column chromatography. Purified RP-LBP possessed M_r of 120 and 24.5 kD upon native PAGE and SDS-PAGE, respectively. The pI value was determined to be 5.4 while pH optimum ranging from 5-8. It could stand heat at 60°C for more than 30 min. The RP-LBP

was able to inhibit hemagglutination induced by lectidin with highest binding efficiency since its concentration required for inhibition was lowest in comparison with other glycoprotein inhibitors used under the same study. In addition, the lectidin binding capacity of RP-LBP was abolished upon chitinase treatment.

C-LBP was purified from C-serum fraction in middle aqueous phase obtained after ultracentrifugation of fresh latex. The purification procedure involved ammonium sulfate fractionation, gel filtration and ion exchange column chromatography. Purified C-LBP possessed M_r of 40 kD upon SDS-PAGE. The native molecular weight obtained after gel filtration was 204 kD. The pI value was around 4.7 while a broad range of pH stability was observed from 6-10. It is heat stable up to 50°C. Purified C-LBP could inhibit both rubber particle aggregation and hemagglutination induced by the lectidin. These inhibitions are, however, abolished with pre-treatment of C-LBP with chitinase, similar to that observed with RP-LBP. Moreover, a direct correlation between latex C-LBP level and rubber latex yield per tapping was also found.

In conclusion, the biochemical process in latex vessel plugging of *Hevea brasiliensis* begins with the production of active oxygen species by a group of oxidase enzymes. These destructive active oxygen species then causes luteal membrane destabilization leading to an exposure of haemolys. The haemolys, also possessed lectin activity, will agglutinate rubber particles by binding specifically with glycoprotein (RP-LBP) on rubber particle surface. The aggregate thus formed will impede or eventually cease latex outflow. Overall compounds involved in this process are functioning as coagulating factors. On contrary, there is also a group of anti-coagulating factors such as peroxidase and C-serum phenol playing role in reducing the amount of active oxygen species and C-serum glycoprotein (C-LBP) which competes with RP-LBP in binding with lectidin in forming rubber particle aggregate. It was found that the levels of these anti-coagulating factors are directly and highly correlated to the amount of latex yield per tapping. Hence, the anti-coagulating factors should be applied as potential markers in characterization and selection of better-yield rubber clones.

กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมของท่อน้ำยางในต้นยางพารา
รพีพรรณ วิถีจิตสุวรรณกุล, *จิรัช วิถีจิตสุวรรณกุล, ปิยาภรณ์ ภาณุสกุล, นพแก้ว เจริญพิทักษ์

และ *กมลชนก รักเสรี

ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

*ภาควิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

น้ำยางเป็นของเหลวสีขาวที่ดูดซึมและบรรจุอยู่ภายในท่อน้ำยาง นอกจากส่วนของของเหลวใส (C-sap) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักแล้ว น้ำยางจะประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็กต่าง ๆ จำนวนมากไปหว่านัย คือ อนุภาคยาง, อนุภาคลูทอยด์ (lutein) และ แฟร็กชันคอลลอยด์ การกักเก็บโดยเนื้อเยื่อท่อน้ำยางจะทำให้มีน้ำยางไหลออกมามาก ดังนั้นจะมีวิธีการยับยั้งการดูดซึมของน้ำยางดังกล่าว โดยการทำให้เกิดภาวะดูดซึมบริเวณปลายท่อน้ำยางที่ดูดซึม การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า บริเวณดูดซึมปลายท่อน้ำยางดังกล่าวจะมีลักษณะดูดซึมที่ประกอบด้วยอนุภาคยางและจากอนุภาคลูทอยด์ที่แตกแล้วกระจายกันเป็นกลุ่มก้อน เพื่อกำหนดการไหลของน้ำยาง ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ากระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมของท่อน้ำยางในต้นยางพารา น่าจะเกิดขึ้นได้จาก การประสานงานระหว่างการทำงานของกระบวนการผลิต 2 กระบวนการ คือ กระบวนการที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อท่อน้ำยางของต้นยางพารา ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการของอนุภาคลูทอยด์ และ กระบวนการที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการของต้นยางพารา ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่นำไปสู่การเกิดภาวะดูดซึม ระหว่างของลูทอยด์ที่แตกแล้วกับอนุภาคยาง

การวิจัยเพื่อเปิดท่อน้ำยางเพื่อให้น้ำยางไหลออกมามาก จะทำให้บริเวณปลายท่อน้ำยางที่ดูดซึมมีลักษณะการดูดซึมของ O_2 ที่ได้รับจากอากาศจะส่งผลกระตุ้นการทำงานของระบบของต้นยางพาราที่ออกซิเดชันของสารที่มีผลให้เกิดการสร้าง active oxygen species ซึ่งได้แก่ superoxide (O_2^-), hydroxyl radical (OH) และ H_2O_2 โดย active oxygen species เหล่านี้ จะร่วมกับน้ำยางและของเหลวของต้นยางพาราของลูทอยด์ โดยเริ่มจาก เอนไซม์ NAD(P)H ออกซิเดส หรือ NAD(P)H คิวโนน รีดักเตส ที่เมแทบอลิซึมของลูทอยด์ จะรีดิวซ์สปีชีส์ควิโนน ไม่เป็น ไฮโดรควิโนน และ เซมิ-ควิโนน ซึ่ง เซมิ-ควิโนน นี้สามารถให้ O_2 ออกซิไดส์ตัวเองกลายเป็น ควิโนน โดยจะให้ O_2^- และหากในขณะนั้นมี H_2O_2 อยู่ด้วย O_2^- ก็จะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 เกิด OH $\cdot$ ขึ้น (ปฏิกิริยา Fenton & Haber-Weiss) ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายโครงสร้างไขมันไม่อิ่มตัว ที่เมแทบอลิซึมของลูทอยด์ ส่งผลให้ลูทอยด์แตก ในขณะที่เกิดขบวนการเปอร์ออกซิเดส และปฏิกิริยาออกซิเดส ที่อยู่ในส่วนของของเหลว ซี-ซีรัม ในน้ำยางก็จะอาศัยการใช้ H_2O_2 และ O_2 ตามลำดับ ในการออกซิไดส์ สปีชีส์ควิโนน ให้เกิดขึ้น

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ	หน้า
บทกึ่งย่อ	
1. บทนำ	1
2. วิธีทำการทดลอง	4
2A) <i>Enzymatic process</i>	4
วิธีการทดลองร่วม	
2A.a) การเตรียมและแยกส่วนน้ำยาง	4
2A.b) การพ่นน้ำยางด้วยเครื่องพ่น	4
2A.c) การหาค่า isoelectric point	5
2A.d) การหาผลของ pH และ อุณหภูมิ	5
2A.e) การทำ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	5
2A.f) การหาปริมาณโปรตีน	5
วิธีการทดลองแยก	
2A.1) <i>NAD(P)H quinone reductase (QR)</i>	6
2A.1.1) QR assay QR	6
2A.1.2) การทำบริสุทธิ์ QR	6
2A.1.2.1) การสกัดและทำบริสุทธิ์ QR	6
2A.1.2.1.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B	6
2A.1.2.1.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B	6
2A.1.2.1.3) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200	6
2A.2) <i>Peroxidase (POD)</i>	7
2A.2.1) การ assay POD ทำได้ 2 วิธี คือ	7
2A.2.1.1) Colorimetric assay	7
2A.2.1.2) Spectrophotometric assay	7
2A.2.2) การสกัดและทำบริสุทธิ์ POD จากเปลือกไม้ยาง	7
2A.2.2.1) การเตรียมสารสกัดจากเปลือกไม้ยาง	7
2A.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ peroxidase จากสารสกัดจากเปลือกไม้ยาง	7
2A.2.2.2.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100	7
2A.2.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Cellulose	7

	หน้า
2B) Non-enzymatic process	12
2B.1) Lutoidin	12
2B.1.1) ทดสอบ assay lutoidin	
2B.1.1.1) Hemagglutination assay	12
2B.1.1.2) Rubber particle agglutinin assay	12
2B.1.2) ทดสอบ assay ตัวยับยั้งการทำงานของลูทอยด์น	13
2B.1.2.1) Hemagglutination inhibition (H.I.) assay	13
2B.1.2.2) Rubber particle agglutination inhibition (RP.I.) assay	13
2B.1.3) การสกัดและฟอกบริสุทธิ์ลูทอยด์นจากอนุภาคลูทอยด์	13
2B.1.3.1) การสกัดลูทอยด์นจากน้ำยาง	13
2B.1.3.2) การฟอกบริสุทธิ์ลูทอยด์น	13
2B.1.3.2.1) การฟอกบริสุทธิ์โดย chitin-beads-binding	13
2B.1.3.2.2) การฟอกบริสุทธิ์โดย ion exchange chromatography	14
2B.1.4) การหา native molecular weight ของลูทอยด์น	14
2B.2) RP-LBP (rubber particle-lutoidin binding protein)	14
2B.2.1) ทดสอบ assay RP-LBP	14
2B.2.2) การสกัดและฟอกบริสุทธิ์ RP-LBP จากอนุภาคยาง	14
2B.2.2.1) การสกัด RP-LBP จากอนุภาคยาง	14
2B.2.2.2) การฟอกบริสุทธิ์ RP-LBP	15
2B.2.2.2.1) การฟอกบริสุทธิ์โดยกรดอะซิติกและกลั่นด้วย acetone	15
2B.2.2.2.2) การฟอกบริสุทธิ์โดย heat-treatment	15
2B.2.2.2.3) การฟอกบริสุทธิ์โดยหั่นคอลัมน์ DEAE-Sephacel	15
2B.3) C-LBP (C-serum-lutoidin binding protein)	15
2B.3.1) ทดสอบ assay C-LBP	15
2B.3.2) การแยกและฟอกบริสุทธิ์ C-LBP จาก C-serum	15
2B.3.2.1) การฟอกบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300	15
2B.3.2.2) การฟอกบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ CM-Sephacryl 6B	16

	หน้า
3. ผสมสารทดสอบ	17
3A) Enzymatic process	17
3A.1) NAD(P)H quinone reductase (QR)	17
3A.2) Peroxidase (POD)	23
3A.3) Polyphenol oxidase (PPO)	33
3A.4) การสกัดสาร phenols ใน C-serum	41
3A.5) การสกัดสาร quinone จาก bottom fraction	45
3B) Non-enzymatic process	49
3B.1) Lutoidin	49
3B.2) RP-LBP	58
3B.3) C-LBP	67
4. จัดวิเคราะห์	77
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	79
6. บรรณานุกรม	80
7. ภาคผนวก	81

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ QR ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B	19
2. Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ QR ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B	19
3. Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ QR ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200	20
4. การตั้งชื่อการทำงานของ QR โดย dicumarol	20
5. ผลของ pH ต่อการเกิดสีของ QR	21
6. ความเสถียรของ pH ของ QR	21
7. ความเสถียรของอุณหภูมิของ QR	22
8. การทำ isoelectric focusing gel electrophoresis ของ QR	22
9. ค่าสัมประสิทธิ์การสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ POD จากเปลือกยาง กับปริมาณน้ำยางหรือยางผงที่ได้ต่อครั้งผลิต	25
10. การแยกแอสลิวติของ เพรก หลังการทำ semi-SDS PAGE	25
11. Chromatographic profile ของสารสกัด POD ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100	26
12. Chromatographic profile ของการทำบริสุทธิ์ POD ผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose	26
13. Chromatographic profile ของการทำบริสุทธิ์ POD ผ่านคอลัมน์ Coe. A-Sepharose	27
14. SDS-PAGE ของ POD ที่ได้จากหลังการทำบริสุทธิ์	27
15. ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log$ molecular weight กับ partition coefficient (R_m) ของโปรตีนมาตรฐานกับ POD	28
16. การทำ isoelectric focusing gel electrophoresis ของ POD	28
17. การเปรียบเทียบผลของ pH ต่อการเกิดสีของ POD จากเปลือกไม้ยาง และ horseradish	29
18. การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการเกิดสีของ POD จากเปลือกไม้ยางและ horseradish	28
19. กราฟ K_m ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP กับซับสเตรต <i>o</i> -diaminidine	30
20. กราฟ K_m ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP กับซับสเตรต H_2O_2	30

รูปที่	หน้า
21. กราฟ K _m ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อตัวยับยั้ง KCN	31
22. กราฟ K _m ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อตัวยับยั้ง NaN ₃	31
23. สเปกตรัมที่ scan จากช่วง UV-Visible ของ C-serum ที่ได้จาก treatment ต่างๆ	32
24. Chromatographic profile ของ PPO บนคอลัมน์ CM-Sepharose	35
25. SDS-PAGE ของ PPO ที่ได้จากห้องปฏิบัติการ	35
26. ผลการทำ Isoelectric focusing gel electrophoresis ของ PPO	36
27. ความเสถียรต่อ pH ของ PPO-I, -II	37
28. ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ PPO-I, -II	37
29. ค่าของ pH ที่มีค่านอกวิถีของ PPO-I, -II	38
30. ค่าของอุณหภูมิที่มีค่านอกวิถีของ PPO-I, II	38
31. กราฟ K _m ของ PPO-I ต่อสปีตเตรท dopamine	39
32. กราฟ K _m ของ PPO-I ต่อสปีตเตรท L-dopa	39
33. กราฟ K _m ของ PPO-II ต่อสปีตเตรท dopamine	40
34. กราฟ K _m ของ PPO-II ต่อสปีตเตรท L-dopa	40
35. GC chromatogram ของ C-serum phenol	42
36. HPLC chromatogram ของ สารละลายมาตรฐาน phenols กับ C-serum phenol	43
37. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ C-serum phenol ของน้ำยาง กับปริมาณน้ำยางหรือเฮกซ์ที่ใส่ต่อครั้งกรีด	44
38. UV-Visible spectroscopic scans C-serum phenol เป็น <i>in vivo</i> substrate ของ PPO	44
39. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ quinone และ QR ใน bottom fraction ที่ได้จาก centrifuged latex กับปริมาณยางที่ใส่ต่อครั้งกรีด	46
40. UV/Vis. spectrum scan ของ active quinone fraction	47
41. กราฟคุณสมบัติของ quinone คือการแตกของอนุภาคลูทอยด์ และ การเกาะกลุ่มของอนุภาคยาง	48
42. Chromatographic profile ของลูทอยด์บนคอลัมน์ DEAE-Sepharose	53
43. SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำบริสุทธิ์ลูทอยด์	53
44. ความสัมพันธ์ระหว่าง Stokes's radius กับ inverse error function ของ [1- partition coefficient] ของโปรตีนมาตรฐานกับลูทอยด์	54

รูปที่	หน้า
45 การทดสอบการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางโดยดูทอยคิน	55
46 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางโดยดูทอยคิน	56
47 การทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางโดยโปรตีนอื่นๆที่ไม่ใช่ดูทอยคิน	56
48 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของดูทอยคิน	57
49 ความเสถียรต่อ pH ของดูทอยคิน	57
50 Chromatographic profile ของ RP-LBP บนคอลัมน์ Sepharose 6B	60
51 Chromatographic profile ของ RP-LBP บนคอลัมน์ DEAE-Sepharcel	60
52 ผลการหาค่า native M_r ของ RP-LBP จากการหาค่า PAGE	61
53 SDS-PAGE ของ RP-LBP ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์	62
54 SDS-PAGE ของ RP-LBP ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ โดยย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue R, Fuchsin 100, Alcian blue	63
55 ผลการหาค่า isoelectric focusing gel electrophoresis ของ RP-LBP	64
56 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ RP-LBP	65
57 ความเสถียรต่อ pH ของ RP-LBP	65
58 ผลของความเข้มข้นของ chitinase ในการยับยั้งความสามารถของ RP-LBP	66
59 Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ C-LBP คอลัมน์ Bio-Gel P-300	69
60 Chromatographic profile จากการทำบริสุทธิ์ C-LBP คอลัมน์ DEAE-Sepharcel	69
61 SDS-PAGE ของ C-LBP ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์	70
62 ความสัมพันธ์ระหว่าง log molecular weight กับ partition coefficient (K_{av}) ของโปรตีนมาตรฐานกับ C-LBP	71
63 ความเสถียรต่อ pH ของ C-LBP	72
64 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ C-LBP	72
65 ความสามารถของ C-LBP ต่อการยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดสีพืชแดงโดยดูทอยคิน	73
66 ความสามารถของ C-LBP ต่อการยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคนวมโดยดูทอยคิน	74

รูปที่	หน้า
67 ผลของความเข้มข้นของ chitinase ในการยับยั้งความสามารถของ C-LBP	75
68 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ C-LBP จาก C-serum ในน้ำขางกับปริมาณคราบน้ำขางที่ได้คั่วครั้งกรด	76

	หน้า
2B) <i>Non-enzymatic process</i>	12
2B.1) <i>Iutoidin</i>	12
2B.1.1) RT assay iutoidin	12
2B.1.1.1) Hemagglutination assay	12
2B.1.1.2) Rubber particle agglutination assay	12
2B.1.2) การ assay ด้วยวิธียับยั้งการทำงานของลูทอยด์	13
2B.1.2.1) Hemagglutination inhibition (H.I.) assay	13
2B.1.2.2) Rubber particle agglutination inhibition (RP.I.) assay	13
2B.1.3) การสกัดและทำปฏิกิริยาลูทอยด์จากอนุภาคลูทอยด์	13
2B.1.3.1) การสกัดลูทอยด์จากเนื้อเยื่อ	13
2B.1.3.2) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์	13
2B.1.3.2.1) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์แบบ batch-binding	13
2B.1.3.2.2) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์แบบ ion exchange chromatography	14
2B.1.4) การหา native molecular weight ของลูทอยด์	14
2B.2) <i>RP-LBP (rubber particle-lutoidin binding protein)</i>	14
2B.2.1) การ assay RP-LBP	14
2B.2.2) การสกัดและทำปฏิกิริยาลูทอยด์ RP-LBP จากอนุภาคลูทอยด์	14
2B.2.2.1) การสกัด RP-LBP จากอนุภาคลูทอยด์	14
2B.2.2.2) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์ RP-LBP	15
2B.2.2.2.1) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์โดยการละลายก่อนด้วย acetone	15
2B.2.2.2.2) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์แบบ heat-treatment	15
2B.2.2.2.3) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์ผ่านคอลัมน์ DEAE- Sepharcel	15
2B.3) <i>C-LBP (C-serum-lutoidin binding protein)</i>	15
2B.3.1) การ assay C-LBP	15
2B.3.2) การสกัดและทำปฏิกิริยาลูทอยด์ C-LBP จาก C-serum	15
2B.3.2.1) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์ผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300	15
2B.3.2.2) การทำปฏิกิริยาลูทอยด์ผ่านคอลัมน์ CM-Sepharose 6B	16

1. บทนำ

การทำสวนยางพาราเป็นอาชีพหลักของเกษตรกรภาคใต้ และบางจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการศึกษาในปี พ.ศ. 2534 ประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกยางทั้งหมด 11.2 ล้านไร่ ในจำนวนนี้ พื้นที่ 9.7 ล้านไร่อยู่ใน 14 จังหวัดภาคใต้ โดยสงขลามีพื้นที่ปลูกยางมากที่สุด (1.7 ล้านไร่) ในปี พ.ศ. 2534 ประเทศไทยสามารถผลิตยางได้เป็นอันดับที่หนึ่งของโลก โดยสามารถนำเงินตราเข้าประเทศได้เกือบสามหมื่นล้านบาท การปลูกยางเป็นการสร้างสวนป่าชนิดหนึ่งที่ช่วยรักษาสภาพสิ่งแวดล้อม และให้ผลตอบแทนในระยะเจริญเติบโตในรูปของน้ำยางเมื่อเริ่มตัดอายุให้ผลตอบแทนแล้ว ชาวสวนก็ยังสามารถตัดไม้ขายเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรมทำเฟอร์นิเจอร์ได้ยิ่ง ปัจจุบันมีเกษตรกรที่มีอาชีพทำสวนยางอยู่ประมาณแปดแสนครัวเรือน และกรรมกรที่ทำงานอยู่ในโรงงานอุตสาหกรรมที่เชื่อมโยงกับยางและไม้ยางพาราอีกเป็นจำนวนมาก จึงสมควรส่งเสริม การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ยางให้สามารถให้ผลผลิตสูงขึ้น เพื่อให้เกษตรกรทำสวนยางเป็นอาชีพที่ยั่งยืน เพื่อเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรซึ่งจะนำไปสู่การรักษาสภาพแวดล้อมที่ชาว และเพิ่มรายได้ให้แก่ประเทศชาติ ทั้งในรูปของผลผลิตยางดิบ และผลิตภัณฑ์จากยางและ ไม้ยางพารา

การศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี (biochemical marker) ในการคัดเลือกรูปแบบยางพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงตั้งแต่ระดับต้นกล้าน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีและเพื่อป้องกันการสูญเสียรายได้ของเกษตรกรอันเนื่องมาจากการปลูกต้นยางที่ให้ผลผลิตต่ำได้วิธีหนึ่ง ทั้งนี้ เพราะยางเป็นพืชที่ให้ผลผลิตในระยะกรีนฮาว (20-25 ปี) การเริ่มต้นด้วยต้นกล้ายางที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงตั้งแต่เริ่มลงมือปลูก จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด

โดยธรรมชาติใบแก่ของยางจะถูกสร้างขึ้นและเก็บไว้ในรูปของสารแขวนลอยภายในท่อลำเลียงบริเวณเปลือกด้านในถัดจากเนื้อเยื่อบริเวณเปลือกหุ้ม (cambium) ของต้นยาง ท่อน้ำยางบริเวณเปลือกของด้านในทั้งหมดจะเชื่อมโยงต่อกันเป็นระบบท่อลำเลียงเปลือกด้านในของต้นยาง ในการกรีดยางแต่ละครั้งของยางมีท่อริดยางจะเชื่อมผ่านท่อน้ำยางที่อยู่บริเวณเปลือกกรีด ทำให้ท่อน้ำยางภายในท่อน้ำยางถูกดันด้วยแรงดันของสารละลายที่อยู่ในท่อไซโทเลมมาโดยเร็วในระยะเวลาๆ แล้วค่อยๆ ขับลงจนหลุดไหลไปที่ตุล

หลังจากการกรีดยางโดยใช้มีดกรีดยางเชื่อมเปลือกยางหลุดเพื่อคัดผ่านท่อน้ำยางทำให้ส่วนของปลายท่อน้ำยางที่มีการอุดตันจะถูกกรีดทิ้งไปพร้อมกับเปลือกที่หลุดออกมา เมื่อท่อน้ำยางถูกมีดของจะทำให้น้ำยางที่อยู่ภายในท่อได้ขับบริเวณกรีดไหลออกมา โดยเฉลี่ยจะกินพื้นที่บริเวณท่อน้ำยาง (drainage area) ที่อยู่ใต้บริเวณกรีดประมาณ 2 ฟุต หลังจากที่ดินยางได้รับการทำให้เกิดบาดแผลหนึ่งจากการกรีด ต้นยางจะมีวิธีตอบสนองเพื่อยับยั้งการสูญเสียท่อน้ำยางในท่อ โดยก่อให้เกิดกระบวนการสมานแผลโดยการสร้างสารอุดต้นขึ้นที่บริเวณปลายท่อที่ถูกกรีด ประสิทธิภาพในการทำให้เกิดอุดต้นของต้นยางแต่ละต้นจะไม่เท่ากัน ดังนั้นปริมาณน้ำยางที่ได้ต่อครั้งกรีดจะได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาการไหลของน้ำยางหลังกรีด ต้นที่เกิดการอุดต้นบริเวณ

ปลายท่อที่ถูกกรีดให้เปิดออกเร็ว ก็จะหยุดการไหลเร็ว และทำให้ได้น้ำยางน้อย ในทางตรงข้าม ด้านที่เกิดการอุดตันบริเวณปลายท่อที่ถูกกรีดให้เปิดออกช้า ก็จะหยุดการไหลช้า และทำให้ได้น้ำยางมาก

น้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ ๆ จะประกอบไปด้วยส่วนต่างคล้าย ๆ กับไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่เจริญงอก โดยจะมีส่วนที่เป็นอนุภาคแขวนลอยอยู่ในน้ำยาง ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 2 ชนิด คือ ส่วนที่เป็นอนุภาคยาง (rubber particles) ซึ่งคิดเป็น 30-40% ของปริมาณรวม กับส่วนที่เป็นอนุภาคจุลชีพ ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยผนังเมมเบรน

จากรายงานการทดลองกรีดยางด้านเดียวกัน โดยเว้นระยะเวลากรีดออกเป็นช่วง ๆ ในวันเดียว จะพบว่าลักษณะกราฟที่สาคได้ระหว่างอัตราการไหลของน้ำยางกับช่วงระยะกรีดแต่ละครั้งจะขึ้นลงสลับกันไปแบบขั้นบันได (stepped flow curve) โดยอัตราการไหลของน้ำยางจะถูกขลอให้ช้าลงโดยการสร้างสารอุดตันบริเวณปลายท่อน้ำยาง [1] จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า บริเวณจุดคั่นที่ปลายท่อน้ำยางจะมียางที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนอุดกั้นและจะพบยางที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนหนาแน่นต่างกันไป บริเวณปลายท่อน้ำยางที่อุดตันด้วย โดยจะพบชิ้นส่วนของอนุภาคจุลชีพที่สลายแล้วปนอยู่ในยางที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนด้วย [2]

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับตัวบ่งชี้ถึงความไม่เสถียร (rusting index) ของ latex โดยพบว่าหากอนุภาคจุลชีพในน้ำยางมีความเสถียรน้อย จะทำให้ท่อน้ำยางเกิดการอุดตันเร็ว และได้ปริมาณผลผลิตยางน้อยด้วย [3,4] ภายใน latex เองจะมีเอนไซม์ที่สามารถใช้ O_2 ในการออกซิไดส์ NADH คือเอนไซม์ NADH- O_2 -reductase ปฏิริยาที่ถูกรังโดยเอนไซม์ NADH- O_2 -reductase จะให้ O_2^- , H_2O_2 และ OH^- ซึ่งเป็นพิษต่อผนังเซลล์โดยนำปฏิกิริยาไปก่อเกิดการสลายของไขมันในเมมเบรนของจุลชีพ ส่งผลให้จุลชีพแตก [5] นอกจากนั้น ผลการศึกษโดย Waitait et al. [6] Vilojoen et al. [7] และ Lim et al. [8] ชี้แนะว่า quinone น่าจะเป็นตัวกลางร่วมในปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ NADH- O_2 -reductase เพราะในส่วนของกลิ่นกลอด หรือจุลชีพ ที่ได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสด จะมีทั้ง ubiquinone และ plastoquinone เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย จึงอาจเรียกเอนไซม์ NADH- O_2 -reductase ว่า NADH quinone reductase

ยางพันธุ์ที่นิยมปลูกในปัจจุบันได้มาจากการดัดแปร ซึ่งจะเห็นว่ายางค้อต่าพันธุ์ดีแต่ละต้นประกอบไปด้วยต้นยาง 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนของดอกยาง ถ้าพันธุ์ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนของลำต้น พันธุ์ส่วนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนของผลรวมได้มาจากการเพาะเมล็ดยางพารา ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสายพันธุ์ใด เพราะในสภาพธรรมชาติยางพาราเป็นพืชผสมข้ามต้น ส่วนพันธุ์ที่ทำหน้าที่เป็นส่วนของลำต้นเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งมีได้แก่พันธุ์ KREM 600 และ GT1

การที่ต้นยางค้อต่าพันธุ์ดีแต่ละต้นประกอบด้วย 2 สายพันธุ์นี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตยางค้อต่าพันธุ์กรีดมีระดับความแปรปรวนที่ค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเป็นมาจากสาเหตุความ

สามารถในการเข้ากัน ได้ของลักษณะพันธุ์ที่ประกอบกันขึ้นเป็นต้นกล้าตรงต่อค่านั้น ๆ ในสวนยางพันธุ์ที่ให้ผลผลิตแล้วพบว่าต้นที่ให้ผลผลิตสูงให้ผลผลิตคิดเป็นน้ำหนักยางแห้งสูงกว่าต้นที่ให้ผลผลิตต่ำถึง 5-6 เท่าตัวต่อครั้งกรีต และจำนวนต้นที่ให้ผลผลิตสูงมีอยู่ไม่ถึง 20% ของต้นยางทั้งหมด หากมีวิธีคัดเลือกเฉพาะต้นกล้าต่อค้ำที่ให้ผลผลิตสูงไปปลูกก็จะทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างมาก [9]

ต้นยางที่ให้ผลผลิตสูงคือต้นยางที่มีความสามารถในการไหลได้นานเมื่อถูกกรีตพร้อมทั้งมีความสามารถในการสร้างน้ำยางทดแทนน้ำยางที่ถูกกรีตออกไปในครั้งก่อน ได้ดีเพราะฉะนั้นการศึกษาวิจิตถึงตัวบ่งชี้ศักยภาพการให้ผลผลิตยางพารา จึงต้องประกอบด้วยตัวบ่งชี้ด้านความสามารถในการสร้างน้ำยางควบคู่ไปกับการไหลได้ดี

ข้อมูลที่ศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวบ่งชี้ด้านความสามารถในการสร้างน้ำยางพาราจะมีหลายรูปแบบได้แก่ น่าจะเป็นเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่อยู่ในวิถีชีวสังเคราะห์ยาง (9-14) แต่สำหรับตัวบ่งชี้ด้านความสามารถในการไหลนั้นยังไม่มีข้อมูลเพียงพอที่จะสรุปได้ งานวิจัยเรื่องนี้จึงประสงค์ที่จะศึกษาเกี่ยวกับ กระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซับของฟ่อน้ำยาง เพื่อค้นหาตัวบ่งชี้ด้านความสามารถในการไหลของน้ำยาง

2. วิธีการทดลอง

ได้แยกการศึกษาวิธการทำการทดลอง ถึงกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดต้นของ
ท่อน้ำยาง ออกเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ [enzymatic process
(2A)] และที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ [non-enzymatic (2B) process] โดย

2A.) Enzymatic process ครอบคลุมการศึกษาถึง

- 2A.1) NAD(P)H quinone reductase ใน bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex.
- 2A.2) Peroxidase ขบวนการเลือกไม้ยางที่ได้จากการกรีต
- 2A.3) Polyphenol oxidase ใน bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex
- 2A.4) การศึกษาสาร phenols ใน C-serum
- 2A.5) การศึกษา quinone จาก bottom fraction

2B.) Non-enzymatic process ครอบคลุมการศึกษาถึง

- 2B.1) ลูทอยดีน (luteidin) จากอนุภาคลูทอยด์ของ bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex.
- 2B.2) โปรตีนที่เกาะจับจำเพาะกับลูทอยดีนจากอนุภาคน้ำยาง (rubber particle-luteidin binding protein, RP-LBP) ใน rubber fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex.
- 2B.3) โปรตีนที่เกาะจับจำเพาะกับลูทอยดีนจาก C-serum (C-serum - luteidin binding protein, C-LBP) ที่แยกได้จาก centrifuged latex

โดยมีรายละเอียดของวิธีการทดลองดังนี้-

2A.1 Enzymatic process

วิธีการทดลองร่วม

2A.a) การเตรียมและแยกส่วนน้ำยาง

การเตรียมน้ำยางสดทำได้โดยการกรีดชาน้ำยางสดๆจากต้น โดยทำการรองรับน้ำยางลงใน
ถุงพลาสติกที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง โดยเริ่มเก็บน้ำยางหลังจากปล่อยทิ้งไว้ให้ไหลออกประมาณ 15
นาทีเพื่อล้างกรีด น้ำยางไปแยกส่วนโดยปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 59,000
g เป็นเวลา 45 นาที น้ำยางจะแยกออกเป็น 3 ส่วนคือ ชั้นบนสุดเป็นชั้นของสีขาวประกอบด้วย
อนุภาคน้ำยาง ชั้นกลางเป็นชั้นของเหลวใส (C-serum) และชั้นล่างสุดหรือชั้นก้นหลอดคือชั้น
ประกอบด้วยอนุภาคลูทอยด์

2A.b) การหาตำแหน่งของตัวอักษรที่

นำน้ำยางที่กรีดได้จากแต่ละต้นไปวัดปริมาตรแล้วนำไปป้อนในเตาอบที่อุณหภูมิ 65 °C จนแห้งสนิท (ทดสอบโดยนำไปชั่งจนได้น้ำหนักคงที่) แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนัก

2A.c) pI isoelectric point

ถ้า isoelectric point สามารถหาได้จากการนำโปรตีนไปทำ isoelectric focusing ใน 5% polyacrylamide gel ที่มี 2% Bio-Lyte pH range 3-10 ampholyte โดยใช้เครื่องมือ Mini HSC Cell (Biorad) โดยเพิ่มระดับต่างศักย์ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และใช้โปรตีนที่มีค่า pI มาประมาณมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ

2A.9) กำหนดหาความเข้มข้นของสารละลายที่มีค่า pH 10.5

ผลของ pH และ อุณหภูมิที่มีต่อโปรตีน สามารถทำได้โดยนำโปรตีนที่ต้องการศึกษาไป incubate ที่ระดับ pH ต่างๆเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น ปรับสภาพให้เหมือนเดิม แล้วจึงนำไปแยกแอมพลิฟิเคชันของโปรตีนนั้นต่อไป

2A.c) 0.1% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

ในการทำ SDS-PAGE ใช้ตามวิธีของ Laemmli [15] โดยใช้ Coomassie brilliant blue R ในการย้อมโปรตีน ด้วย Fuchsin หรือ Alcian blue ในการย้อม โกลโคโปรตีน

การทำให้ sample 100% SDS-PAGE เพื่อแยกแยะชนิดของโปรตีนนั้น ที่ใช้วิธีเดียวกันกับ
การวิเคราะห์ sample ที่ใช้ load จะไม่มี SDS และไม่ต้องผ่านความร้อน และเมื่อ run electrophoresis
เสร็จแล้วจะทำการชะ SDS ออกจากแผ่นเจล โดยนำไปจุ่มแช่ใน 2M ของสารละลาย isopropanol
ก่อนนำไปทำการอ่านหาผลวิเคราะห์ของโปรตีนนั้นๆ

การทำให้ non-denaturing PAGE เพื่อแยกโปรตีนในหลอดรวม ตามวิธีใน Sigma Tech. Bulletin No. MKR-137 (1986) ทำโดย run PAGE ในสภาพที่ไม่มี SDS โดยใช้โปรตีนมาตรฐาน ที่รู้ค่าน้ำหนักโมเลกุลในสารละลายเพื่อเทียบหาน้ำหนักที่ได้จากการ run PAGE โดยใช้ค่าเฉลี่ย ที่มี ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ คำนวณค่า R_s ของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นของเจล แล้วนำค่า R_s ของโปรตีนแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นของเจลต่างๆ ไปหาค่าเส้นวิ่งจากสูตร $100[\log (R_s \times 100)]$ นำค่าอันวิ่งที่ได้ไปเขียนกราฟโดยให้แกน Y เป็นค่าความเข้มข้นที่ได้จากสูตร และแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของเจล ก็จะได้ค่า slope จากนั้นจึงเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง slope กับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานแต่ละชนิด และนำค่า slope ของโปรตีนที่ต้องการทราบไปหาค่าน้ำหนักโมเลกุลจากกราฟมาตรฐานต่อไป

2.8.5) การหาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนสามารถหาได้โดยใช้วิธีของ Lowry et al. [16]

วิธีการทดลองแยก

2A.1) NAD(P)H quinone reductase (QR)

2A.1.1) การ assay QR

การทำ spectrophotometric assay ของ QR ใช้ปริมาตรรวมทั้งสิ้น 1 mL โดยมี 5 mM menadione, 20 mM NADH และ เอนไซม์ อย่างละ 10 μ l รวมอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 โดยดูค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงของ NADH ที่ A_{340}/min

2A.1.2) การทำบริสุทธิ์ QR

2A.1.2.1) การสกัดและทำบริสุทธิ์ QR

ได้เริ่มการสกัด QR โดยนำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่รอบเหวี่ยง 59,000g เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นของ bottom (lutoid) fraction เพื่อนำไปทำบริสุทธิ์ QR โดยนำไปตกตะกอนด้วย acetone 1:9 (w/v) แล้วนำส่วนของตะกอนไปละลายในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 แล้วนำไปตกตะกอนด้วย เกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ระหว่างช่วงความเข้มข้น 20-60% ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ปริมาตร 3 mL หลังจากนั้นก็นำไปทำบริสุทธิ์ต่อไปโดยการแยกผ่านคอลัมน์ต่างๆตามลำดับดังนี้:

2A.1.2.1.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B

นำสารละลายตะกอนที่ได้หลังจากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ปริมาตร 3 mL ไป load ลงบน คอลัมน์ Sepharose 6B ขนาด 1.5×113 cm. แล้วจะโดยการผ่าน บัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ลงไปโดยใช้อัตราการไหล 18 mL/min พร้อมทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 1 mL

2A.1.2.1.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B

รวบรวมสารละลายที่เป็น peak fraction ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.2.1. ไป load เพื่อ bind กับ DEAE-Sepharose CL-6B ในคอลัมน์ขนาด 2.7×7 cm แช่ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการล้างส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ เดิมจนค่า A_{280} เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind ออก โดยการใช้น้ำบัฟเฟอร์เค็มเติมเกลือ NaCl ด้วยความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.4 N NaCl และตามด้วยเกลือ NaCl ด้วยความเข้มข้น 0.4 N NaCl ผสมอยู่ โดยใช้อัตราการไหล 18 mL/min พร้อมทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 1.8 mL

2A.1.2.1.3) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200

รวบรวมสารละลายที่เป็น peak fraction ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.2.2. ไป load ลงบน คอลัมน์ Sephadex G-200 ขนาด 1.5×82 cm. แล้วจะโดยการผ่าน บัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ลงไปโดยใช้อัตราการไหล 11 mL/hr. พร้อมทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 1.1 mL

2A.2) Peroxidase (POD)

2A.2.1) การ assay POD ทำได้ 2 วิธี คือ

2A.2.1.1) ทำโดยใช้วิธี colorimetric assay ของ Shannon et al. [17] โดย assay mixture จะประกอบด้วย 0.5% o-dianisidine, 0.1 ml ของ 0.1 M H_2O_2 ในบัฟเฟอร์ 0.05 M NaOAc, pH 5.4 โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 3 ml ทำการวัดผลผลิตของ POD โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 460 nm. เอนไซม์แอคทีวิตี 1 หน่วยคือจำนวนเอนไซม์ที่ต้องใช้สำหรับการเกิดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ 460 nm จำนวน 0.1 O.D./min

2A.2.1.2) ทำโดยใช้วิธี spectrophotometric assay โดย assay mixture จะประกอบด้วย 10 μ l (4 μ g) ของ POD บริสุทธิ์ 0.5 ml ของ C-serum phenol, 50 μ l ของ 0.1 M H_2O_2 ใน 0.05 M ของบัฟเฟอร์ NaOAc (pH 5.4) โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 0.56 ml. วัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงโดยการ scan ช่วงคลื่นตั้งแต่ 200-650 nm.

2A.2.2) การสกัดและทำบริสุทธิ์ POD จากเปลือกไม้ขาว

2A.2.2.1) การเตรียมสารสกัดจากเปลือกไม้ขาว

นำเปลือกไม้ขาวที่ได้จากการกรีดเยื่อไม้ต่างๆ ไปล้างด้วยน้ำที่ต้มจนเดือดจนหมด แล้วนำเปลือกที่ไม่มีเยื่อติดอยู่ออกแล้วไปล้างให้สะอาด นำเปลือกไม้ขาวที่ผ่านการล้างแล้วจำนวน 1.8 kg ไปปั่นละเอียดด้วยเครื่อง Waring blender โดยใช้บัฟเฟอร์ 10 mM potassium phosphate, pH 7.0 (buffer A). นำ homogenate ที่ได้ไปกรองผ่าน cheese cloth เพื่อขจัดเปลือกที่เหลืออกทิ้ง และนำน้ำสกัดสีน้ำตาลที่ได้ไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 20,000g เป็นเวลา 60 min. นำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี ultrafiltration (Amicon, 10,000 MW cut-off).

2A.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ POD จากสารสกัดจากเปลือกไม้ขาว

2A.2.2.2.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100

นำสารสกัดเข้มข้นที่ได้จากข้อ 2A.2.2.1 ปริมาตร 1 ml. ไป load ลงบนคอลัมน์ Sephadex G-100 (1.8 x 6 cm.) ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย buffer A แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์คั้นที่อัตราการไหล 20 ml/hr. เก็บ fraction ขนาด (1 ml.) ลงในหลอดเพื่อนำไป assay หา POD แล้วรวบรวมหลอดบริเวณ peak fractions ไปทำบริสุทธิ์ต่อ

2A.2.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Cellulose

นำ peak fraction ที่รวบรวมได้จากคอลัมน์ Sephadex G-100 ไป dialyze แล้ว load ลงในคอลัมน์ DEAE-cellulose (2 x 14 cm.) ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย buffer A แล้วทำการล้างด้วยและชะด้วยบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ที่ความเข้มข้น 0.1 M ผสมอยู่ด้วย ที่อัตราการไหล 15 ml/hr. เก็บ fraction ขนาด (1 ml.) ลงในหลอด เพื่อไป assay หา POD แล้วรวบรวมหลอดบริเวณ peak fractions ไปทำบริสุทธิ์ต่อ

2A.2.2.3) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Concanavalin A-Sepharose 4B

นำ peak fraction ที่รวบรวมได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose ไป dialyze แล้ว load ลงในคอลัมน์ Con A-Sepharose 4 B (1 x 5 cm.) ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย buffer A แล้วทำการล้างด้วยและชะด้วยบัฟเฟอร์ที่มี mannose ที่ความเข้มข้น 0.2 M ผสมอยู่ด้วย เก็บ fraction ขนาด (1 ml.) ลงในหลอดทดลองเพื่อนำไป assay หาผลของที่มีต่อกิจกรรมของ peroxidase

2A.2.3) การหา น้ำหนักโมเลกุลรวมของ POD

นำ POD ที่ทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Con A-Sepharose 4 B ไป load ลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 (1 x 90 cm.) ซึ่งผ่านการ equilibrate ด้วย buffer A แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ เดิมที่อัตราความเร็ว 12 ml/hr. เก็บ fraction ขนาด (1.5 ml.) ลงในหลอดทดลอง เพื่อนำไป วัดการดูดกลืนแสงที่ 280 nm พร้อมกับ assay หา POD โดยใช้ lysozyme, pepsin, ovalbumin และ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลรวม

2A.2.4) การหาค่า K_m

ทำการหาค่าคงที่ Michaelis ของ POD ที่มีต่อซับสเตรต *o*-diaminidine และ H_2O_2 โดย incubate POD บริสุทธิ์ปริมาณ 10 μ g กับ *o*-diaminidine ที่ความเข้มข้นต่างๆตามที่ได้ บ่งไว้กับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นคงที่และเกินพอ หรือ ทำแบบ vice versa ถ้า K_m หาได้จาก double reciprocal plots ระหว่างผลควัตถุของอินไฮกับที่ความเข้มข้นของซับสเตรต

2A.2.5) การหาค่า K_i

ทำจากสารละลาย assay mixture ที่ประกอบด้วย 10 μ g ของเปอร์ออกซิเดสที่ บริสุทธิ์ กับ *o*-diaminidine, ตัวยับยั้ง KCN หรือ $NaNO_2$ ที่ความเข้มข้นต่างๆตามที่ได้บ่งไว้กับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นคงที่และเกินพอ โดยทำการหาค่า K_i ของตัวยับยั้ง จาก Dixon plot

2A.3) Polyphenol oxidase (PPO)

2A.3.1) assay PPO

แอกติวิตีของ PPO วัดแปลงตามวิธีของ Gonzalez et al. (18) โดยใช้ dopamine เป็นซับสเตรต Incubation mixture ประกอบด้วย 1 ml ของสารละลาย 5 mM dopamine ใน บัฟเฟอร์ 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 และ 10 μ l ของ PPO sample. โดยวัดการเปลี่ยน dopamine เป็น dopaminexluome ที่ A_{460} หน่วยหนึ่งของแอกติวิตีของ PPO มีค่าเท่ากับปริมาณ PPO ที่ทำให้ A_{460} มีค่าเพิ่มขึ้นที่ .001 OD/min

2A.3.1) การทำปฏิกิริยา polyphenol oxidase (PPO)

2A.3.2.1) การสกัด PPO

นำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 59,000g เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นของ bottom fraction (90 กรัม) ไปสกัด B-serum โดยทำผ่านกระบวนการ freeze-thaw ที่อุณหภูมิ -60 °C และ 25 °C ทำ 3 ครั้ง แล้วนำไปปั่นแยกเอาส่วนของ supernatant (B-serum) ที่ 10,000 rpm, 20 นาที จากนั้นนำ B-serum ไปแยกส่วนโดยการตกตะกอนด้วย acetone โดยรวบรวมเอาโปรตีนที่ตกตะกอนได้ในช่วงความเข้มข้น acetone 30-50% ไปละลายในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 แล้วนำไปทำปฏิกิริยาล้าง

2A.3.2.2) การทำปฏิกิริยาโดย ion exchange chromatography

นำสารละลายโปรตีนที่เตรียมได้จากข้อ 2A.3.2.1 ไป load เพื่อ bind กับ CM-Sepharose ในคอลัมน์ขนาด 2.5x24 cm แล้วทำการล้างส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl pH 7 จนค่า A_{280} เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะล้างเกลือ NaCl 0.1 M ที่ผสมอยู่กับบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7 จนค่า A_{280} เข้าใกล้ศูนย์และชะต่อด้วยเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0.3 M ที่ผสมอยู่กับบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7 โดยใช้อัตราไหล 26 ml/hr แยกเก็บ fraction ละ 2 ml. รวมรวม peak fractions ที่ได้การสีออกมาขึ้นต่อไป

2A.4) การศึกษาสาร phenols ใน C-serum

2A.4.1) การเตรียมสาร phenols

นำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 59,000g เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นของ C-serum ปริมาตร 60 ml ไปปรับ pH เป็น 12 ด้วย 1 N NaOH แล้วนำไปปั่นแยกที่ 5,000 rpm, 20 min โดยแยกเอาส่วนของ supernatant แล้วสกัด non-policolic phenols ออกด้วย chloroform โดยใช้ chloroform ในปริมาณที่เท่ากัน (1:1, v/v) แยกเอาส่วนชั้นบน (aqueous phase) ไปปรับ pH เป็น 2 ด้วย 6 M HCl แล้วนำไปปั่นแยกที่ 5,000 rpm, 20 นาที โดยแยกเอาส่วนของ supernatant แล้วสกัด phenols ด้วย chloroform โดยใช้ chloroform ในปริมาณที่เท่ากัน (1:1, v/v) แยกเอาส่วนชั้นล่าง (organic phase) ไประเหยเอา chloroform ออกแล้วละลายสาร phenols ที่เหลือด้วย methanol เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อว่าประกอบด้วย phenols ชนิดใดบ้าง หรือ บัฟเฟอร์ 50 mM NaOAc, pH 5.4 สำหรับนำไปใช้เป็นสปีดตัวในการ assay PPO ในน้ำยาง และ POD ในเปลือกชา

2A.4.2) การวิเคราะห์ชนิดของ phenols ด้วย HPLC

นำสารละลาย C-serum phenol ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.1 และสารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย phenols 4 ชนิดคือ p-cummaric acid, hydroxy benzoic acid, gallic acid and

caffeic acid ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.5 mg/ml, ปริมาตร 5 μ l ไป inject เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ ODS reversed-phase ขนาด 25 cm $\times$ 2.0 mm ใช้สารละลาย methanol/acetonitrile (30/70, v/v) เป็นตัวชะด้วยอัตราความเร็ว 0.2 ml/min

2A.4.3) การวิเคราะห์ชนิดของ phenols ด้วย GC

นำสารละลาย C-serum phenol ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.1 และสารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย phenols 19 ชนิดใน methanol ปริมาตร 100 μ l ไปทำ trimethylsilyl derivization โดยนำไม่หยดกับ 10 μ l N,N-bis(trimethylsilyl)acetamide แล้วนำไปอบที่ 60 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไป inject เข้าเครื่อง GC โดยใช้คอลัมน์ BP-1, 25 m, ID 0.25 mm, ที่อุณหภูมิคงที่ 280 $^{\circ}$ C [โดยเริ่มแรกตั้งอุณหภูมิที่ 150 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นค่อยๆเพิ่ม (5 $^{\circ}$ C/ นาที) เป็น 280 $^{\circ}$ C] ใช้ He (head pressure 45kPa) เป็นแก๊สตัวพา (carrier gas) ใช้ flame ionization detector เป็นตัวตรวจวัดที่ 280 $^{\circ}$ C

2A.4.4) การทดสอบ C-serum phenol กับความเป็น *in vivo* substrate ขอบ

2A.4.4.1) PPO จากน้ำยาง

เตรียม incubation mixture ที่ประกอบด้วย 500 μ l ของ C-serum phenol ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ 50 mM NaOAc, pH 5.4 + 250 μ l ของ 50 mM NaOAc, pH 5.4, 150 μ l ของ 1 M $MgCl_2$ และ 100 μ l ของ PPO ที่ได้จาก peak tube ของการทำให้บริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ CM-Sephacose หลังจากผสมสารต่างๆใน cuvette สำหรับทำ assay เรียบร้อยแล้ว นำไป scan ดูค่า absorbance ในช่วงคลื่น 200-600 nm ทั้งที่ และในช่วง 10, 20 และ 40 นาทีถัดไป

2A.4.4.2) POD จากเปลือกยาง

เตรียม incubation mixture ประกอบด้วย 500 μ l ของ C-serum phenol ที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ 50 mM NaOAc, pH 5.4 + 100 μ l ของ 0.1 M H_2O_2 และ 10 μ l (4 μ g) ของ POD ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากเปลือกยางหลังจากผสมสารต่างๆใน cuvette สำหรับทำ assay เรียบร้อยแล้ว นำไป scan ดูค่า absorbance ในช่วงคลื่น 200-600 nm ทั้งที่

2A.5) การศึกษา quinone จาก bottom fraction

2A.5.1) การแยกและทำบริสุทธิ์ quinone

นำ bottom (lutoid) fraction ที่ได้จากการปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge สกัดด้วย hexane (1:1; v/v) 3 ครั้ง รวบรวมขึ้น hexane ที่สกัดได้ไปล้างด้วย 50% MeOH 2 ครั้ง เติมน sodium sulfate ลงไป แล้วนำ solvent ที่สกัดได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ละลายสารด้วย MeOH แล้วนำทำบริสุทธิ์ต่อโดยอาศัยการแยกบนแผ่น silica gel (TLC) โดยใช้สารละลาย $CHCl_3$:hexane (80:20; v/v) เป็นตัวชะ (Barr and Crane [19]) ที่ทำการ spot ที่แยก

และเห็นได้ได้แสง uv ทั้ง 7 spot ด้วย MeOH เพื่อนำไปทำ active quinone fraction เพื่อใช้เป็น
สปีดเรทของ QR

2A.5.2.) อิทธิพลของ quinone ต่อการแตกของลูทอยด์กับการจับกลุ่มของอนุภาคยาง

2A.5.2.1) การเตรียมอนุภาคลูทอยด์ (intact luteoid)

นำ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสดไปล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ isotonic buffered saline (IBS) ซึ่งประกอบด้วย 0.9% NaCl ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 โดยนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 10,000xg, 4 °C, เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอน intact luteoid ไปเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ IBS ในอัตราส่วน 1:5 (w/v) ก่อนใช้ในการทดลอง

2A.5.2.2) การเตรียมอนุภาคยาง (intact rubber particle, RP)

นำชิ้นอนุภาคยางที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสด ตามบริเวณด้านล่างถัดจากชั้น C-serum ไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ IBS จำนวน 3 ครั้ง โดยการปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 xg, 4°C, เป็นเวลา 10 นาที นำชิ้นบนของอนุภาคยางไปเจือจางให้ได้ค่า $A_{600} = 0.8$ ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

2A.5.2.3) การทดสอบอิทธิพลของ quinone ต่อการแตกของลูทอยด์กับจับกลุ่มของอนุภาคยาง

ทำโดยการเตรียม reaction mixture A, B และ C ในบัฟเฟอร์ IBS ปริมาตรรวม 45 μ l ซึ่งประกอบด้วยสารละลายอนุภาคลูทอยด์ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.2.1) 20 μ l, 0.14 mM NADH 10 μ l และ บัฟเฟอร์ IBS (A) หรือมีการใส่สารละลาย quinone ที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.1) ปริมาตร 5 และ 10 μ l ลงไปใบ (B) และ (C) ตามลำดับ โดยผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาตาม 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายอนุภาคยางที่เตรียมได้จากข้อ 2A.4.2.2 ลงไป 5 μ l ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาอีก 10 นาที ผสมสารละลายสีด้วย Fuchsin ลงไปให้เข้ากัน แล้วดูดใส่ใน hematocrit tube จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง hematocrit microfuge เพื่อทำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางบริเวณด้านบนของหลอดพร้อมกับการทาสีไปของอนุภาคลูทอยด์บริเวณก้นหลอด โดยดูจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 300 เท่า

2A.5.2.4) การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ quinone และ QR กับปริมาณน้ำยาง หรือน้ำหนักยางแห้งที่ได้ต่อครั้งกรีด

2A.5.2.4.1) ทำการกรีดและเก็บน้ำยางจากยางพันธุ์ RRIM600 แยกต้นจำนวน 9 ต้น จนหมดไหล ทำการวัดปริมาณครั้นยาง และน้ำหนักยางแห้งที่ได้ของแต่ละต้น โดยคิดเป็นค่าครั้งกรีด

2A.5.2.4.2) การวัดปริมาณ quinone นั้น ทำการสกัด quinone จากน้ำยางที่ได้มา จากต้นยางแต่ละต้น เช่นเดียวกับข้อ 2A.4.1 แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 302 nm

2A.5.2.4.3) การวัดปริมาณ QR ทำโดยนำ bottom fraction จากยางแต่ละต้น ไปผ่านขั้นตอน freeze-thawed 2-3 ครั้ง แล้วปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนใสไปวัดแยกตัววัดของเอนไซม์ โดยใช้ dichlorophenol-indophenol (DCPIP) เป็นสับสเตรท โดยมี incubation mixture (1.6 ml) ประกอบด้วย 10 μ l NADH (20 mM), 1ml ของ 60 μ M DCPIP ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris, pH 8.0 และ 10-50 μ l ของ QR sample โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ λ_{620}

2B.) Non-enzymatic process

2B.1) Lutein

2B.1.1) GFT assay (lutein)

2B.1.1.1) Hemagglutination assay (H.A.)

การวัดระดับแอกทีวิตีของลูเทอซิน สามารถวัดได้จากการดูการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงซึ่งเตรียมได้โดยการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงของเลือดกระต่าย แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่มีปริมาณ NaCl ผสมอยู่ 9.5% จำนวน 3 ครั้ง ทำการ assay การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) โดยใช้ U-microtiter plate ที่อุณหภูมิห้อง โดยไปลดสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 50 μ l ลงในหลุมบนแผ่นไมโครไทดเดอร์ นำสารสกัดลูเทอซินไปทำ serial dilution 1:2 ที่หลุมดังกล่าวตามลำดับ แล้วใส่สารละลายเม็ดเลือดเข้มข้น 2% ลงไปหลุมละ 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. แล้วจึงอ่านค่าไทดเดอร์ (titer) ซึ่งถือค่าส่วนที่ได้ออกจากการหาค่าเฉลี่ยของหลุมคู่ที่สามรองทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดง

2B.1.1.2) Rubber particle agglutinin assay (RPA.)

แอกทีวิตีของลูเทอซินสามารถวัดได้จาก การทดสอบความสามารถของลูเทอซินในการทำให้อนุภาคยางเกาะกลุ่ม สามารถทำได้โดยการนำอนุภาคยาง (rubber particles) ใน rubber fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางด้วยเครื่อง ultracentrifuge ไปทำ ถ้างด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่มีปริมาณ NaCl ผสมอยู่ 9.5% จำนวน 3 ครั้ง ทำการ assay การเกาะกลุ่มของอนุภาคยางในหลอด hematocrit ที่อุณหภูมิห้อง โดยไปลดสารละลายอนุภาคยางปริมาตร 50 μ l ลงบนแผ่น parafilm นำสารสกัดลูเทอซินปริมาตร 50 μ l หยดลงไปพร้อมผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง หยดสารละลาย Fuchsin (1 gm. ในสารละลาย 10% ethanol) ปริมาตร 5 μ l ลงไปพร้อมผสมให้เข้ากัน แล้วดูไว้ในหลอด hematocrit แล้วจึงนำไป centrifuge เพื่อแยกชั้นยางด้วยเครื่อง hematocrit centrifuge เป็นเวลา 3 นาที แล้วดูการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางได้ก็ด้วยจุลทรรศน์กำลังขยาย 300 เท่า พร้อมเปรียบเทียบกับ control

2B.1.2) *PAI assay* ตัวบ่งชี้การทำงานของลูทอลิน:

2B.1.2.1) *Hemagglutination inhibition (H.I.) assay*

แอนติบอดี H.I. สามารถวัดได้จากการดูการยับยั้งเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงซึ่งเตรียมได้โดยการปั่นแยกเม็ดเลือดแดงของเลือดกระต่าย แล้วล้างด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่มีปริมาณ NaCl 0.5% จำนวน 3 ครั้ง ทำการ assay H.I. ทำโดยใช้ U-microtiter plate ที่อุณหภูมิห้อง โดยป้อนสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 50 μ l ลงในหลุมบนแผ่นไมโครไคลเตอร์ นำลูทอลินไปทำเจือจางด้วย buffer A ให้ได้ค่าไคลเตอร์เป็น 2 ตามวิธี hemagglutination assay ในข้อ 2B.1.1 โดยใช้ลูทอลินที่ความเข้มข้นดังกล่าวปริมาณ 25 μ l ผสมกับสารละลายตัวบ่งชี้ต่างๆ เช่น fetuin, asialofetuin, mucin, asialomucin, ovomucoid, glucose, galactose, mannose, fucose, arabinose, raffinose, GlcNAc, ManNAc, GalNAc, Chitosan dimer, chitosan trimer, Gal 1 $\rightarrow$ 6 GlcNAc, Gal 1 $\rightarrow$ 3 GlcNAc, 3'NeuNAc-Lac, 5'NeuNAc-Lac, α_1 -acid glycoprotein, chitinase, C-LLBP หรือ RP-LLBP ที่เจือจางปริมาณ 25 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1/2 ชม. แล้วใส่สารละลายเม็ดเลือดเข้มข้น 2% ลงไปหลุมละ 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อีก 1 ชม. หลุมที่ไม่สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงได้ ถือว่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวบ่งชี้ที่สามารถทำให้เกิด การยับยั้ง 100% ของการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

2B.1.2.2) *Rubber particle agglutination inhibition (RP.I.) assay*

ทำเหมือนข้อ 2B.1.2 ยกเว้นทำการ incubate ลูทอลินกับตัวบ่งชี้ก่อนการนำไปทดสอบขั้นตอน RPA assay

2B.1.3) การสกัดและทำบริสุทธิ์ลูทอลินจากขนนกทูแคน

2B.1.3.1) การสกัดลูทอลินจากขนนก

นำขนนกสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 59,000g เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นของ bottom fraction (10 กรัม) ไปผสมกับ acetone โดยใช้อัตราส่วน 1:3 (W/V) ส่วนเพื่อให้เกิดการตกตะกอน แยกตะกอนโดยการปั่นแยก (10,000 rpm, 10 min) แล้ว นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่มี 0.2% Triton X-100 แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเจือจาง Triton X-100 ออกโดย incubate กับ SM2 (Biorad) ในอัตราส่วน 10:1 (v/w) เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นแยกเอาส่วนใสหรือสารสกัดลูทอลิน

2B.1.3.2) การทำบริสุทธิ์ลูทอลิน

2B.1.3.2.1) การทำบริสุทธิ์โดยการทำ chitin-beads-binding

นำสารสกัดลูทอลินไป bind กับ chitin ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ล้าง โปรตีนส่วนที่ไม่ bind กับไคตินออกด้วยบัฟเฟอร์เดิม (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) จากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind กับไคตินออกโดยการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มีกลีเซอรอล

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 M) ผสมอยู่ หลังจากนั้นทำการชะถูทอยคิน ออกโดยการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 0.2% Triton X-100 ผสมอยู่

2B.1.3.2.2) การทำบริสุทธิ์โดย ion exchange chromatography

นำสารละลายทอยคิน ที่เตรียมได้จากข้อ 2B.1.3.2.1 ไป incubate กับ SM2 เพื่อขจัด Triton X-100 แล้วนำไป load เพื่อ bind กับ DEAE-Sepharose ในคอลัมน์ ขนาด 1.4x2.5 cm. แล้วทำการล้างส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ เดิมจนค่า A_{280} เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind ออกโดยใช้บัฟเฟอร์เดิมแต่มีเกลือ NaCl (0.5 M) ผสมอยู่ หลังจากนั้นทำการชะถูทอยคิน ออกโดยการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 0.2% Triton X-100 ผสมอยู่ โดยใช้อัตราการไหล 1.5 ml/hr แยกเป็น fraction ละ 1 ml.

2B.1.4) การหาค่า native molecular weight ของทอยคิน

ทำโดยวิธีหาน้ำหนักโมเลกุลรวมของเมมเบรนโปรตีน ตามวิธีของ Nalecz et. al. [20] โดยนำทอยคินหรือทั้งโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักรวมในบัฟเฟอร์ที่มี 0.1% Triton X-100 อยู่ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 แยกผ่านลงในคอลัมน์ Sepharose 6B ขนาด 1.2 x65 cm มี bed volume 80 ml ด้วยอัตราการไหล 2 ml/hr โดยแยกเป็น fraction ละ 2 ml ทำการหามาตรฐานความถ่วงสัมพัทธ์ระหว่าง Stokes's radius กับ inverse error function ของ [1-partition coefficient] ของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อหาพื้นที่น้ำหนักทอยคิน

2B.2) RP-LBP (rubber particle-lutoidin binding protein)

2B.2.1) assay RP-LBP

ทำเหมือนข้อ 2B.1.2) assay ด้วยยัง lutoidin โดยให้ RP-LBP เป็นตัวจับ

2B.2.2) การสกัดและทำบริสุทธิ์ RP-LBP จากอนุภาคไขมัน

2B.2.2.1) การสกัด RP-LBP จากอนุภาคไขมัน

นำไขมันสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่แรงเหวี่ยง 50,000g เป็นเวลา 45 นาที นำชั้นบนสุดหรือชั้นของยางไปแยกเอาเฉพาะบริเวณ zone 2 ซึ่งเป็นชั้นยางด้านที่สัมผัสกับชั้นของ C-scrum ซึ่งมีลักษณะคล้ายวุ้นสีขาวใส ไปทำการล้าง 2-3 ครั้งด้วย isotonic buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.9% NaCl ในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ทำการแยกชั้นยางที่ล้างทุกครั้งโดยวิธี ultracentrifugation หลังจากนั้นนำมาสกัดด้วยปริมาณ 5 เท่าของ 0.2% Triton X-100 โดยทำการสกัดวนซ้ำกันแล้วปั่นแยกเพื่อเอาส่วนใสที่สกัดได้

2B.2.2.2) การทำบริสุทธิ์ RP-LBP

2B.2.2.2.1) การทำบริสุทธิ์โดยการสกัดก่อนด้วย acetone

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2B.2.2.1 ไปตกตะกอนด้วย acetone โดยใช้น้ำปริมาณเป็น 2 เท่า ที่ 4°C แล้วปั่นแยกเอาตะกอนไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.4

2B.2.2.2.2) การทำบริสุทธิ์โดย heat-treatment

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2B.2.2.1 ไปเข็นน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนใส

2B.2.2.2.3) การทำบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE- Sephacel

นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2B.2.2.2 ไป load คอลัมน์ bind กับ DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด $1.8 \times 8 \text{ cm}$ แล้วทำการล้างส่วนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ เดิมจนค่า A_{280} เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind ออกโดยการใช้น้ำบัฟเฟอร์เดิม หลังจากนั้นทำการชะ RP-LBP ออกโดยการชะด้วยบัฟเฟอร์เดิมแต่มีเกลือ NaCl (0.3 M) ผสมอยู่ โดยใช้อัตราการไหล 12 ml/hr แยกเป็น fraction ละ 2 ml.

2B.3) C-LBP (C-serum-lutoidin binding protein)

2B.3.1) การ assay C-LBP

กำหนดเบื้องต้น 2B.1.2) การ assay ด้วยวิธี lutoidin โดยใช้ C-LBP เป็นตัว กับตัว

2B.3.2) การแยกและทำบริสุทธิ์ C-LBP จาก C-serum

นำน้ำยางสดไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว $59,000 \times$ เป็นเวลา 45 นาที แยกเอาชั้นส่วนใสชั้นกลาง cytosol หรือ C-serum ปริมาตร 100 ml. ไปตกตะกอนด้วยเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70-85%) ละลายตะกอนด้วย 50 mM sodium acetate, pH 5.4 แล้วตกตะกอนด้วย acetone ที่ 4°C (1/2 v/v) แยกตะกอนการปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แล้วนำไปละลายด้วย 50 mM sodium acetate, pH 5.4 จากนั้นนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไปด้วยการแยกผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300 และ CM-Sephacrose 6B ตามลำดับ

2B.3.2.1) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P-300

นำสารละลายตะกอนที่ได้หลังจากปั่นคอนการตกตะกอนด้วย acetone ปริมาตร 3 ml. ไป load ลงบน คอลัมน์ Bio-Gel P-300 ขนาด $1.5 \times 105 \text{ cm}$ แล้วชะโดยการผ่านบัฟเฟอร์ 50 mM sodium acetate, pH 5.4 ลงไปโดยใช้อัตราการไหล 12.5 ml/hr พร้อมทั้งทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 3 ml.

2B.3.2.2) การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel

รวบรวมสารละลายที่เป็น peak fraction ที่เตรียมได้จากข้อ 2B.3.2.1 ไป load เพื่อ bind กับ DEAE-Sephacel ในคอลัมน์ขนาด 2.4x12 cm. แล้วทำการล้างส่วนของโปรตีนที่ไม่ bind ด้วยบัฟเฟอร์ เคนจนค่า A_{280} เข้าใกล้ศูนย์ หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนส่วนที่ bind ออกโดยการไล่บัฟเฟอร์เค้นด้วยเกลือ NaCl ผสมอยู่ในระดับความเข้มข้น 0.1 M NaCl แล้วตามด้วย 0.2 M NaCl โดยให้อัตราการไหล 15 ml/hr พร้อมทำการเก็บสารละลายที่ได้ fraction ละ 2 ml.

3. ผลการทดลอง

ได้ทำการแยก ผลการทดลองการศึกษาถึงกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมของ: พืชน้ำยาง ออกเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ [enzymatic process (3A)] และที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ [non-enzymatic (3B) process] โดย

3A) Enzymatic process การแยกองค์การศึกษาถึง

3A.1) NAD(P)H quinone reductase ใน bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex

3A.2) Peroxidase จากเปลือกไม้ยางที่ได้จากการกรีด

3A.3) Polyphenol oxidase ใน bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex

3A.4) การศึกษาสาร phenols ใน C-serum

3A.5) การศึกษาสาร quinone ใน bottom fraction

3B) Non-enzymatic process การแยกองค์การศึกษาถึง

3B.1) ลูทอยดิน (luteodin) จากอนุภาคลูทอยด์จาก bottom fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex.

3B.2) โปรตีนที่เกาะจับจำเพาะกับลูทอยดินจากอนุภาค 14 (rubber particle-luteodin binding protein, RP-LBP) ใน rubber fraction ที่แยกได้จาก centrifuged latex.

3B.3) โปรตีนที่เกาะจับจำเพาะกับลูทอยดินจาก C-serum (C-serum - luteodin binding protein, C-LBP) ที่แยกได้จาก centrifuged latex

โดยมีรายละเอียดของผลการทดลองดังนี้:

3A.) Enzymatic process

3A.1) NAD(P)H quinone reductase (QR)

สามารถหามวลที่ QR ได้ 87 กิโล (ตารางที่ 1) โดยอาศัยขั้นตอนมาตรฐานทางชีวเคมีคือ การสกัดละอองด้วย acetone, ammonium sulfate, การทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B (รูปที่ 1), DEAE-Sepharose CL-6B (รูปที่ 2) แล้วตามด้วยด้วย Sephadex G-200 gel filtration (รูปที่ 3) โดยจากการทำ SDS-PAGE ค่า M_r ของ QR ที่ได้ประมาณ 57 kD โดย QR มีความจำเพาะต่อ สปีสเซอร์หลายชนิด ตามลำดับดังนี้ p-benzoquinone>menadiione>plumbagin>juglone>duroquinone ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยพบว่า dicumarol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ QR (รูปที่ 4) ส่วน pH ในการทำงานที่เหมาะสมที่สุดคือ 8 (รูปที่ 5) โดย QR สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH จาก ช่วง 6-10 (รูปที่ 6) และ ทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C (รูปที่ 7) จากการทำ IEF ของสารละลาย QR จากละอองที่ได้หลังการสกัดด้วย acetone พบว่ามี QR หลายชนิด โดยมีค่า pI เท่ากับ 4.6, 5.0, 6.2, 6.7 และ 7.4 (รูปที่ 8)

ตารางที่ 1

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ QR จากอนุภาคสโตรมา

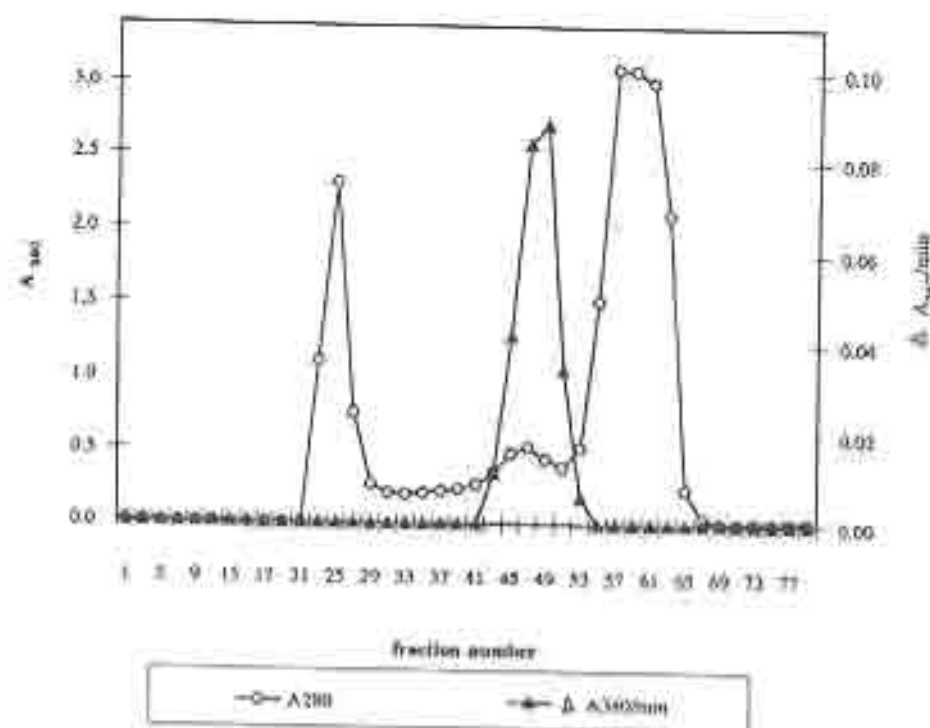
Step	Total protein (mg)	Total activity (unit*)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Acetone ppt.	825.0	6280	7.6	100	1
AmSO ₄ ppt.	318.0	5537	17.4	88	2
Sephärose 6B	33.1	4743	143.2	76	19
DEAE-Sephärose- CL-6B	5.9	2911	489.3	46	64
Sephadex G-200	4.1	2701	658.9	43	87

* One unit of NADH quinone reductase activity was defined as the amount of enzyme required to decrease a change in absorbance of 0.1 at 340 nm per min.

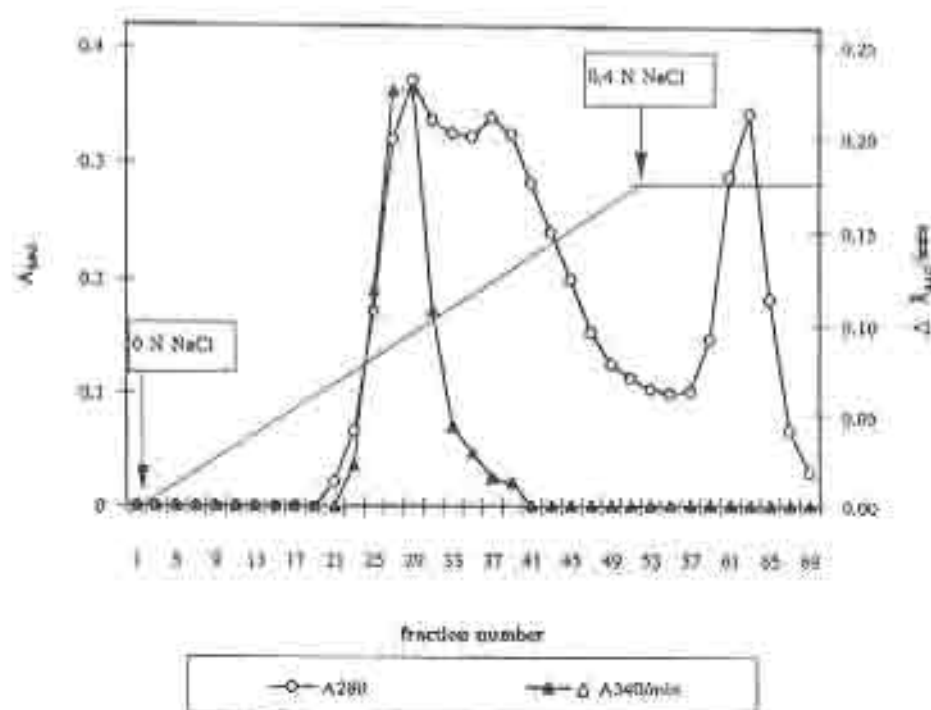
ตารางที่ 2

ความจำเพาะของ QR ที่มีต่อลิโปพาท

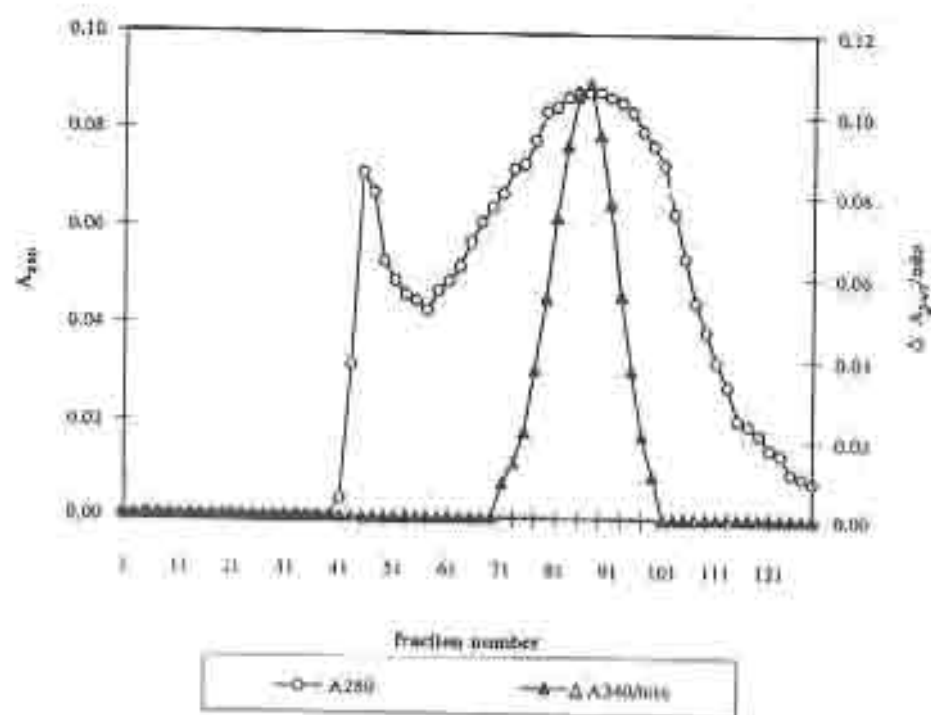
Substrate	Relative activity (%)
Menadiione	100
p-Benzoquinone	122
Duroquinone	78
Juglone	98
Lawsonone	0
Plumbagin	99



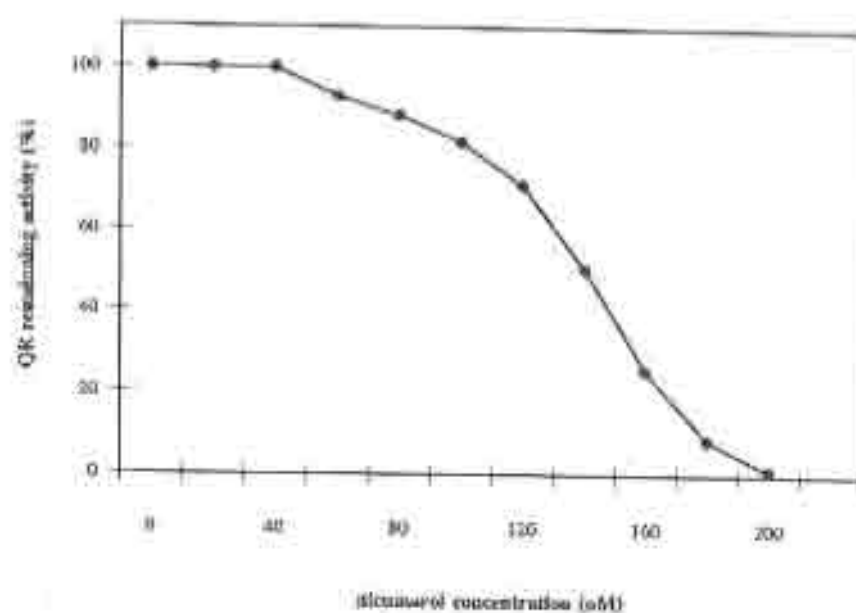
รูปที่ 1 Chromatographic profile จากการทำปฏิกิริยา QR ผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B



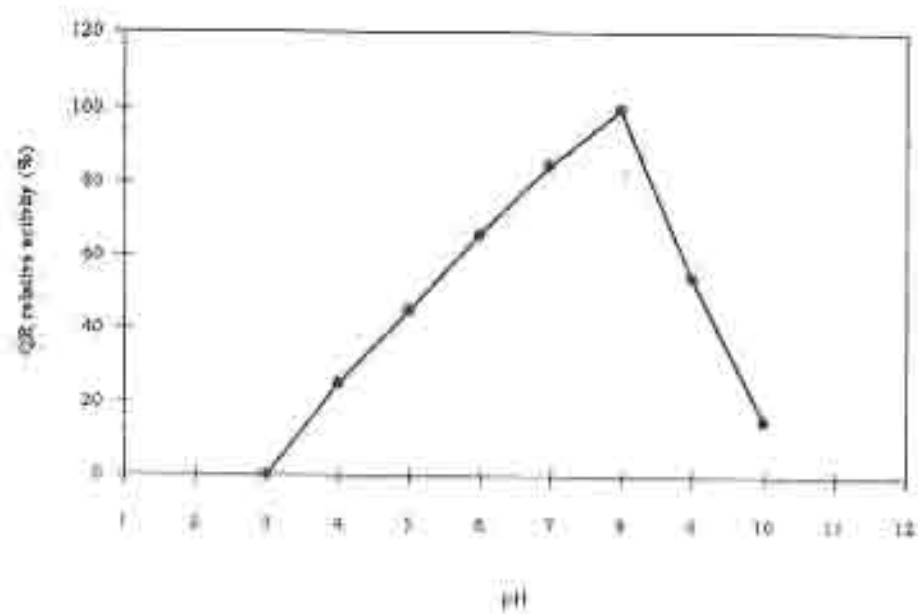
รูปที่ 2 Chromatographic profile จากการทำปฏิกิริยา QR ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL-6B



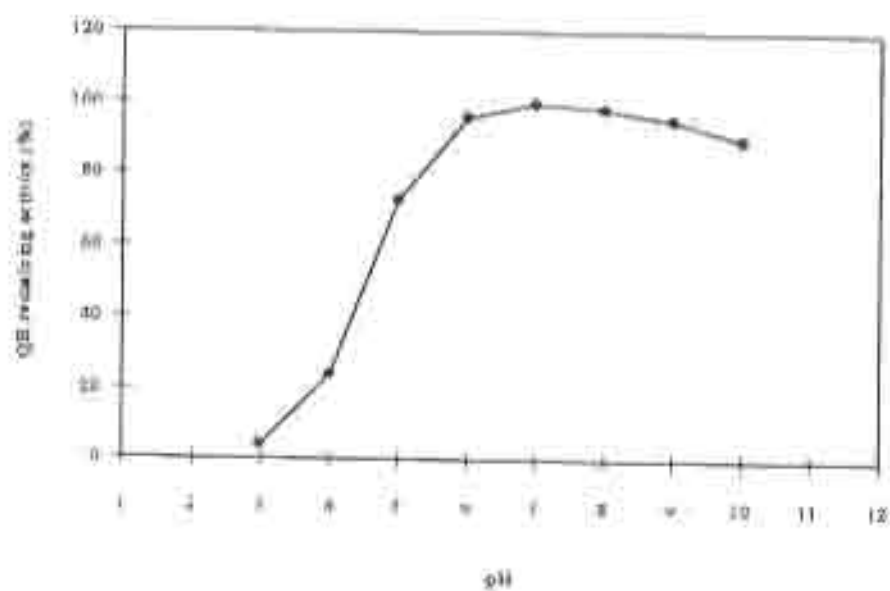
รูปที่ 3 Chromatographic profile ของการทำบริสุทธิ์ QR ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200



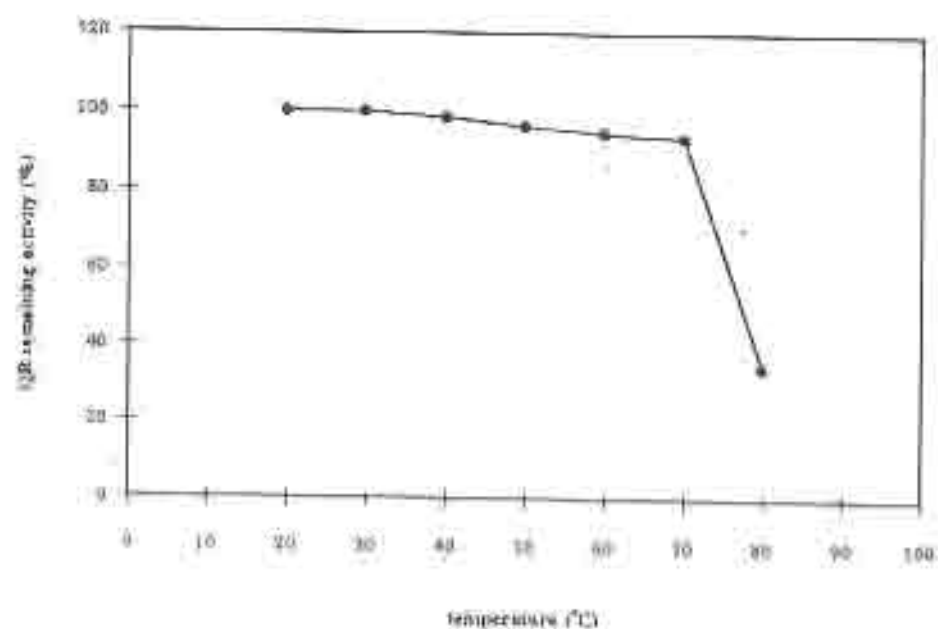
รูปที่ 4 การยับยั้งการทำงานของ QR โดย dicumareol



รูปที่ 5 กราฟของ pH ที่ออกฤทธิ์ได้ของ QR



รูปที่ 6 ความเสถียรต่อ pH ของ QR



รูปที่ 7 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ QR



รูปที่ 8 การทำ isoelectric focusing gel electrophoresis ของ QR ที่ได้จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วย acetone

3A.2) Peroxidase (POD)

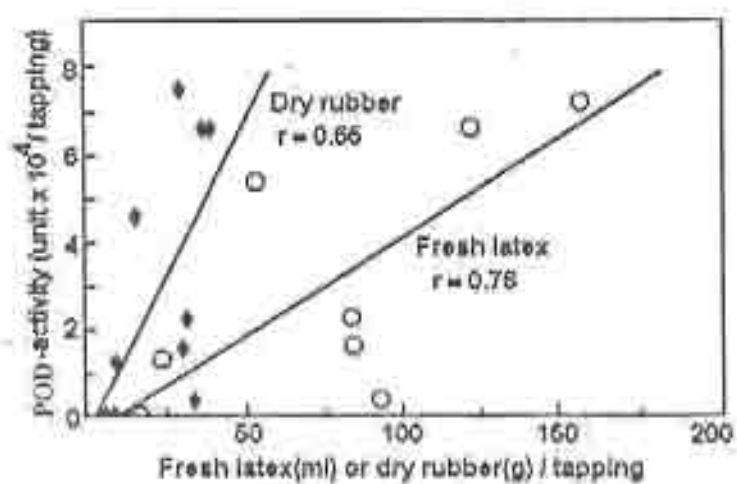
พบว่าปริมาณ POD ที่สกัดได้จากเปลือกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณยางที่ได้ต่อครั้ง
 กว้าง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.76 และ 0.65 ตามลำดับ (รูปที่ 9) และยังพบว่า
 ปริมาณ POD ที่มีในเปลือกต่อหน่วยน้ำหนักจะสูงกว่าที่มีอยู่ในส่วนของ C-serum และ B-serum ที่ได้
 จากน้ำยางมาก (รูปที่ 10) การทำอิทธิฤทธิ์ POD ตามตารางที่ 3 โดยอาศัยการแยกผ่านคอลัมน์
 Sephadex G-100 (รูปที่ 11), DEAE-cellulose (รูปที่ 12), ConA-sepharose 4B (รูปที่ 13) ค่าที่ได้ M_r
 จากการทำ SDS-PAGE (รูปที่ 14) และน้ำหนักโมเลกุลรวม จากการแยกผ่านคอลัมน์ Sephadex G-
 100 (รูปที่ 15) เท่ากับ 50 kD จากการทำ IEF (รูปที่ 16) พบว่าได้ค่า pI เท่ากับ 3.5 และ การทำงาน
 ที่อุณหภูมิ คือ pH 5.4 (รูปที่ 17) และทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 40°C (รูปที่ 18) ค่า K_m ต่อ
 สับสเตรต *o*-dianisidine และ H_2O_2 เท่ากับ 20 and 18.6 μM (รูปที่ 19,20) ตามลำดับ ค่า K_i ของตัว
 ยับยั้ง KCN และ NaN_3 เท่ากับ 34 and 41 μM (รูปที่ 21,22) ตามลำดับ เมื่อนำ C-serum phenols ไป
 ใช้เป็นสับสเตรตของ POD ร่วมกับ H_2O_2 , product ของปฏิกิริยาที่ได้จะมีค่า O.D.เพิ่มขึ้นสูงขึ้นจาก
 เดิมในช่วงความยาวคลื่น 280 และที่ 420-440 nm (รูปที่ 23)

ตารางที่ 3

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ POD

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit* $\times 10^4$)	Specific activity (unit $\times 10^4$ /mg)	Yield (%)
Bark extract	1,980	30	1.15	100
Sephadex G-100	175	25	14.3	83
DEAE-Cellulose	3.3	7	200	23
Con. A-Sepharose 4B	0.9	3.6	397	12

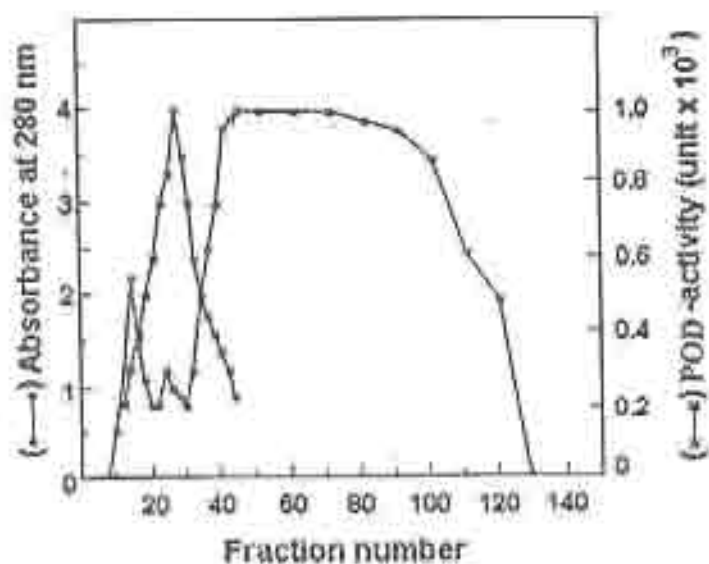
*One unit activity was defined as the amount of enzyme required to produce a change in absorbance of 0.1 at 460 nm per min.



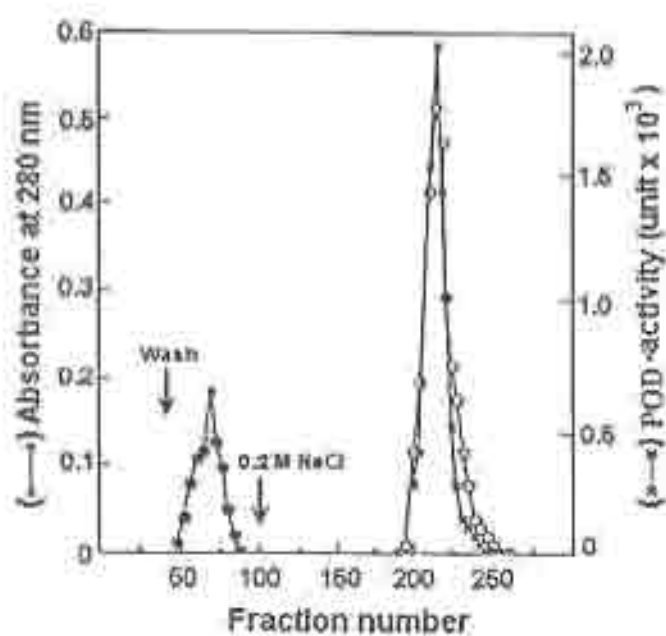
รูปที่ 9. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ POD จากผลัดขนาน
กับปริมาณคาน้ำยางหรือยางแห้งที่ได้ต่อครั้งกรีด



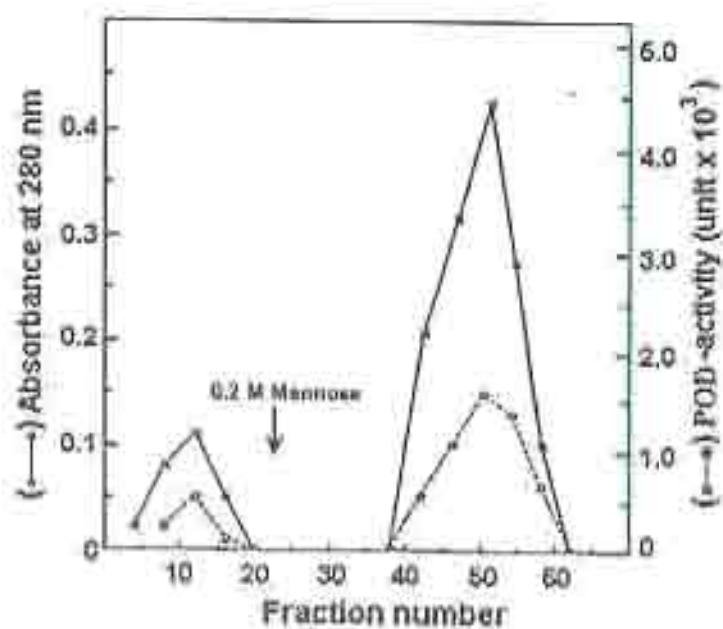
รูปที่ 10. การย้อมแอ็คทีวิตีของ POD หลังการทำให้ semi-SDS PAGE จากสารสกัด
โดยใช้คาน้ำยางหรือยางแห้งที่ต่างกัน A&B, จากเปลือกไม้ยาง, C&D,
จาก B-serum และ E&F, จาก C-serum



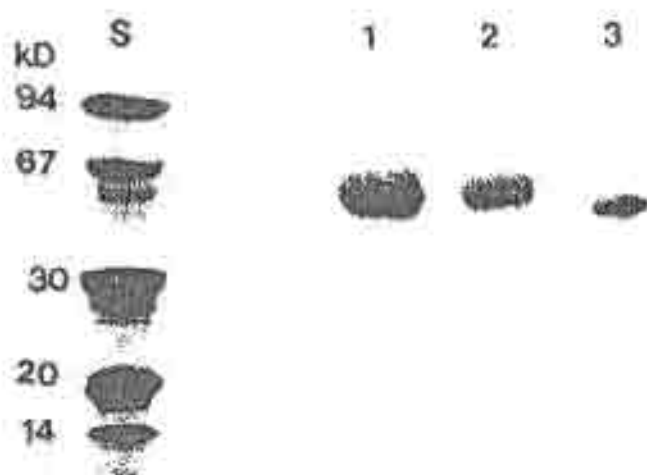
รูปที่ 11. Chromatographic profile ของสารสกัด POD ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100



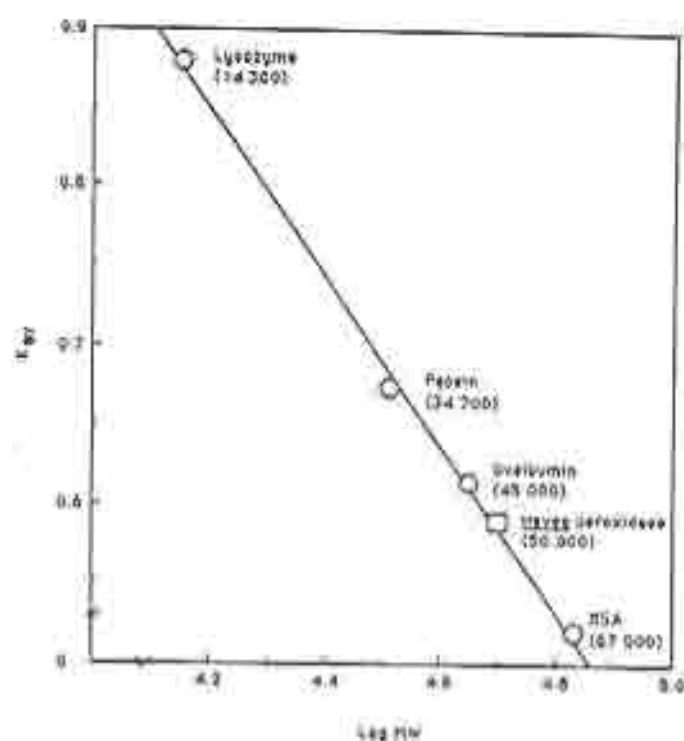
รูปที่ 12. Chromatographic profile ของสารสกัด POD ผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose



รูปที่ 13. Chromatographic profile ของการแยกบริสุทธิ์ POD ผ่านคอลัมน์ Con. A-Sepharose



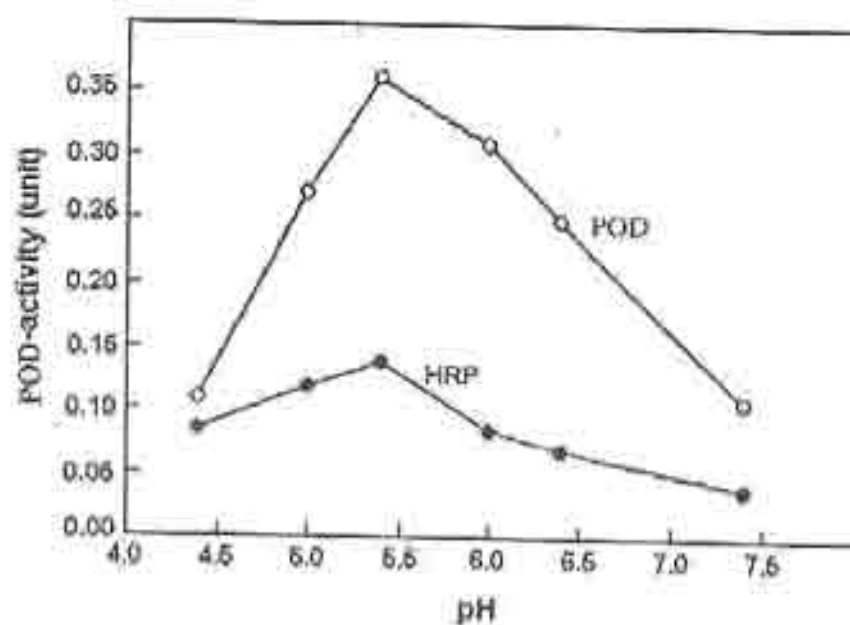
รูปที่ 14. SDS-PAGE ของ POD ที่ได้จากหลังการบำบัดวิธี



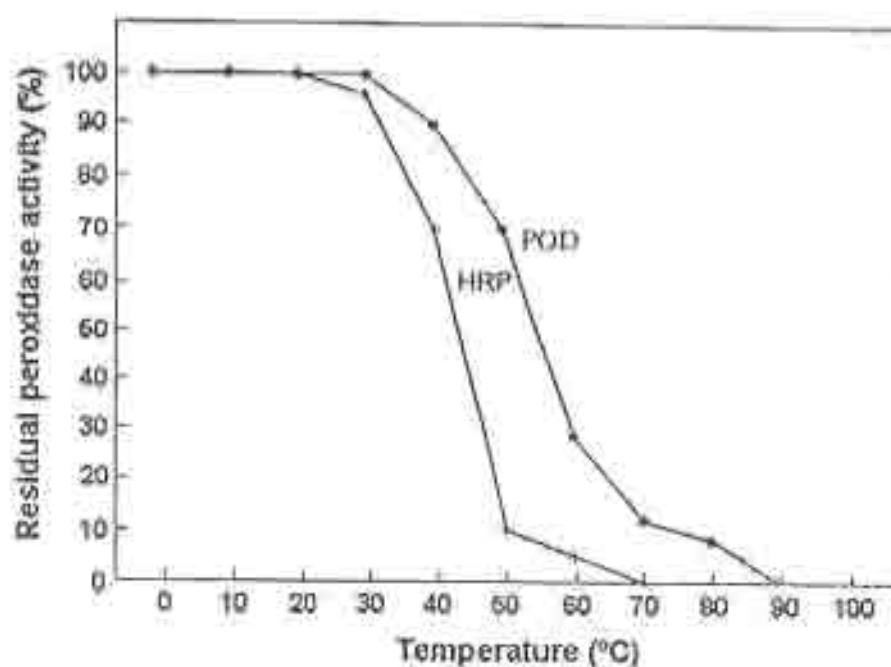
รูปที่ 15. ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log$ molecular weight กับ partition coefficient (K_{av}) ของโปรตีนมาตรฐานกับ POD จากเปลือกไม้ยาง ที่ถ่วงน้ำหนักแล้ว โดยกรรมวิธีผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100



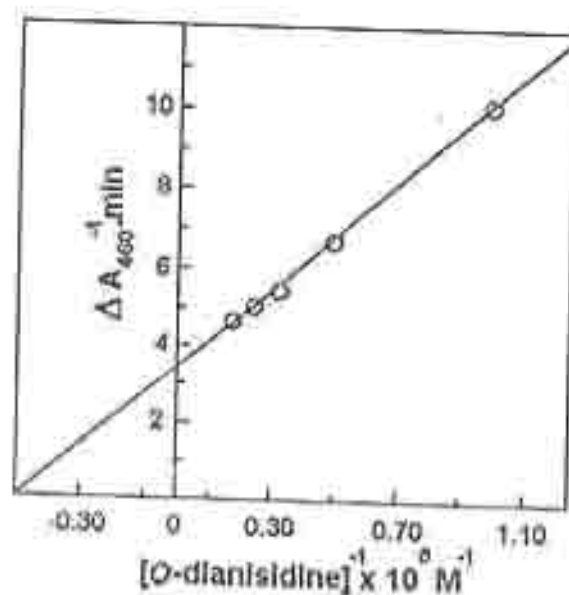
รูปที่ 16. การทำ isoelectric focusing gel electrophoresis ของ POD โดย lane S และ H คือ โปรตีน pI มาตรฐาน และ POD จากเปลือกไม้ยาง ตามลำดับ



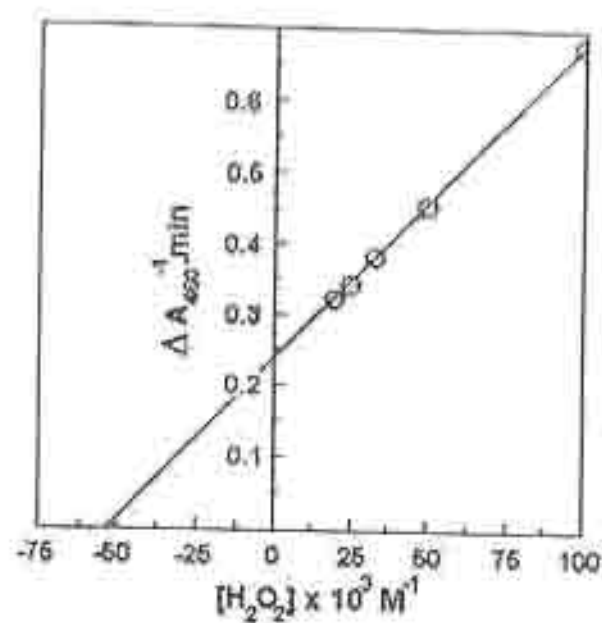
รูปที่ 17. การเปรียบเทียบผลของ pH ต่อแอกติวิตีของ POD จากเปลือกไม้ไผ่ และ horseradish (HRP)



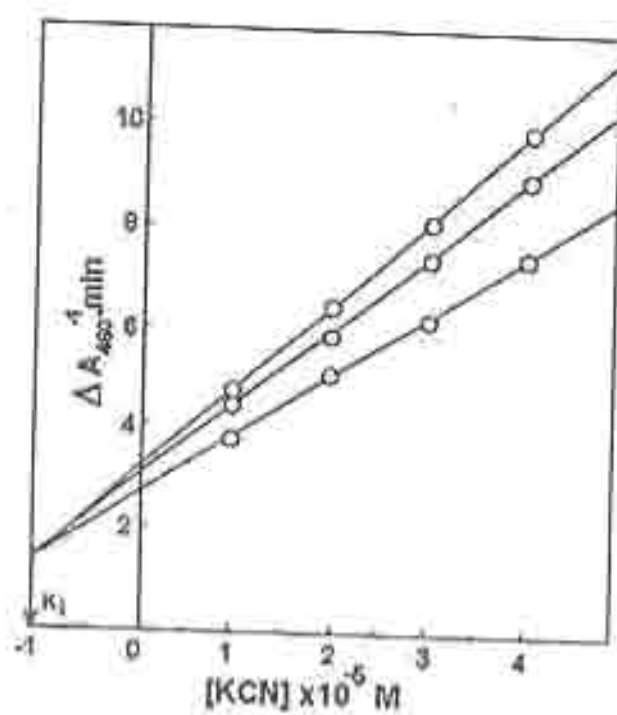
รูปที่ 18. การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของ POD จากเปลือกไม้ไผ่ และ horseradish (HRP)



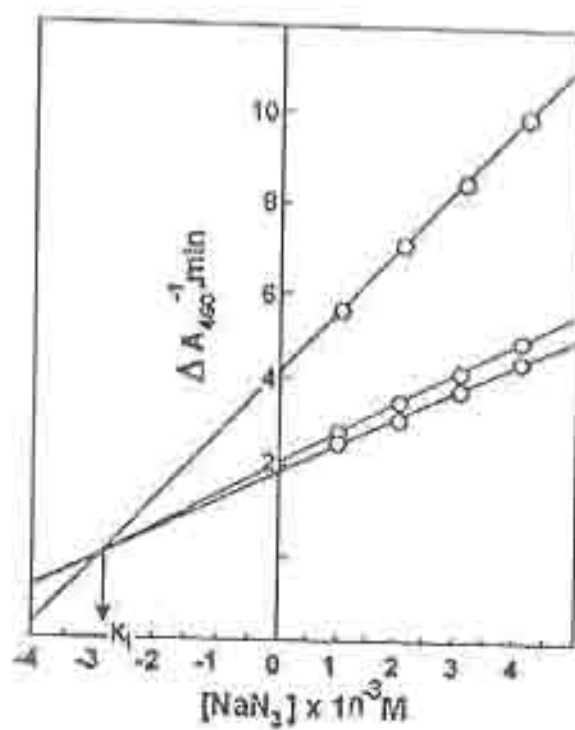
รูปที่ 19. การหา K_m ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อซับสเตรต *o*-danisidine



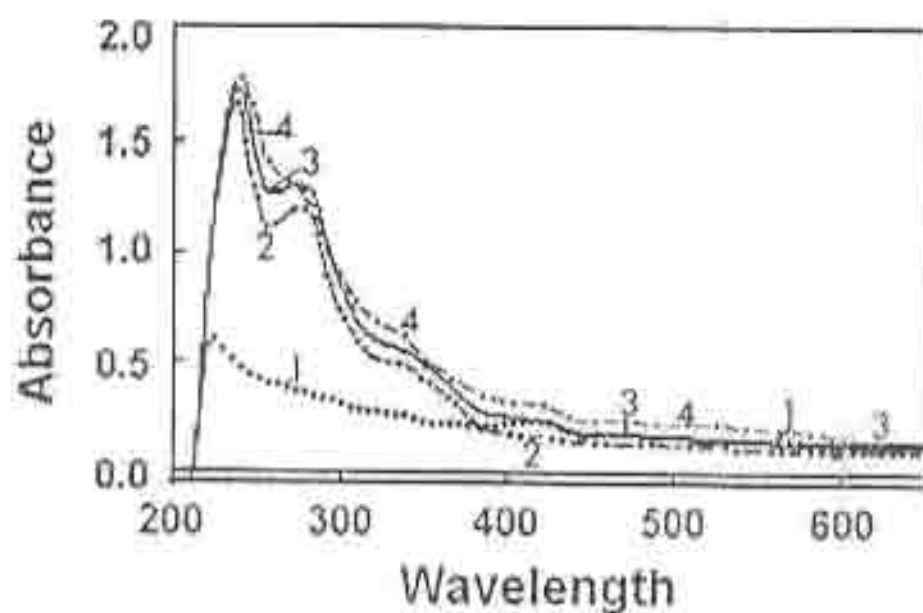
รูปที่ 20. การหา K_m ของ POD จากเปลือกไม้ยาง HBP ต่อซับสเตรต H_2O_2



รูปที่ 21. การหา K_i ของ POD จากปลิงไม้ยาง HBP ต่อตัวยับยั้ง KCN



รูปที่ 22. การหา K_i ของ POD จากปลิงไม้ยาง HBP ต่อตัวยับยั้ง NaN_3



รูปที่ 23 สเปกตรัมที่ scan จากช่วง UV-Visible 100-600 nm ของ C-serum ที่ได้รับ treatment ต่างๆ

1. POD จากเปลือกไม้ขาว
2. C-serum phenol
3. POD จากเปลือกไม้ขาว + C-serum phenol
4. POD จากเปลือกไม้ขาว + C-serum phenol + H_2O_2

3A.3) Polyphenol oxidase (PPO)

PPO ที่เตรียมได้จาก B-serum ที่ได้จากการนำ bottom fraction ที่ได้จากการปั่นแยกน้ำยางสดไปผ่านชั้นลน freeze-thaw โดยนำสารละลายที่ได้จากการละลายตะกอน B-serum ที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ไปทำบนวิธีที่ผ่านคอลัมน์ CM-Sepharose (ตารางที่ 4, รูปที่ 24) จะได้ PPO-I (70%) และ PPO-II (30%) โดยมีค่า M_r ที่ได้จากการทำ SDS-PAGE เท่ากับ 32 และ 34 kD (รูปที่ 25) ตามลำดับ ทั้ง PPO-I และ PPO-II มีค่า pI เท่ากันคือ 9.3 (รูปที่ 26) มีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 5-8 (รูปที่ 27) และต่ออุณหภูมิสูงถึง 60°C (รูปที่ 28) พบลำดับ โกลมีค่า pH และ อุณหภูมิในการทำงานที่เหมาะสมอยู่ที่ pH 7 (รูปที่ 28) และอุณหภูมิในช่วง 35-40°C (รูปที่ 30) ตามลำดับ PPO-II มีความจำเพาะต่อสปีสตรอนหลายชนิด พบลำดับดังนี้ $\text{dopamine} > \text{L-dopa} > \text{catechol} > \text{catechin}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อใช้ dopamine และ L-dopa เป็นสปีสตรอน PPO-I ให้ค่า K_m เท่ากับ 2.08 และ 8.33 mM (รูปที่ 31,32) ส่วน PPO-II ให้ค่า K_m เท่ากับ 2.12 และ 4.76 mM (รูปที่ 33, 34) ตามลำดับ

ตารางที่ 4

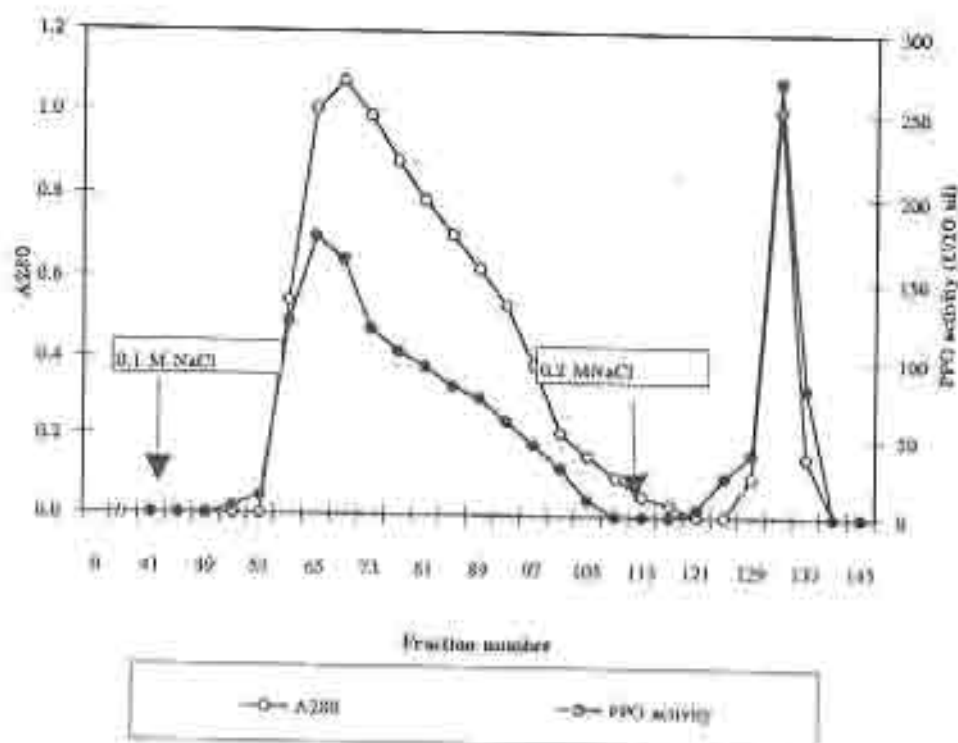
ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ PPO

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	12,717	603,250	222	100	1
Acetone ppt.	634	3,627,000	5,721	601	26
CM-Sepharose					
PPO-I	100	1,977,360	19,774	328	89
PPO-II	18	860,430	47,802	143	215

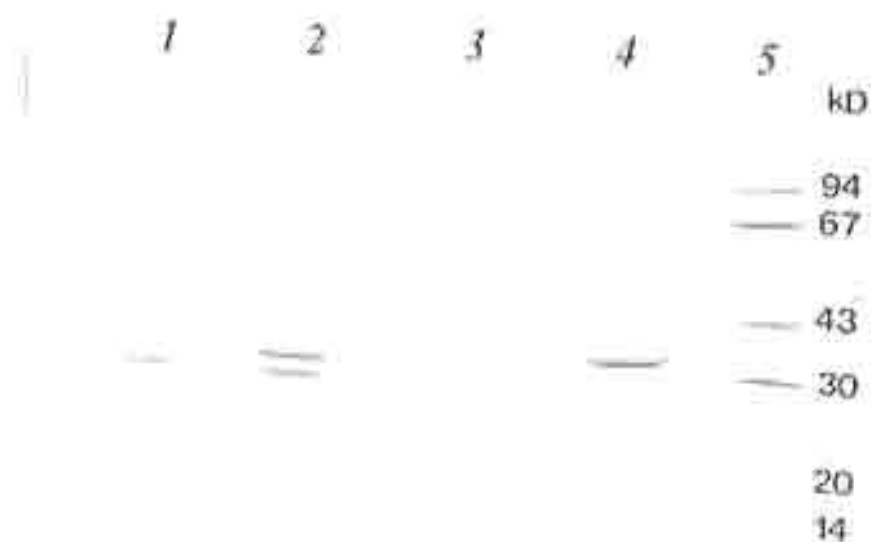
ตารางที่ 5

ความจำเพาะของ PPO-II ที่มีต่อสารปฏิกิริยา

Substrate	[S] (mM)	Activity (unit)	Relative activity (%)	Assay wavelength (nm)
Dopamine	5	214	100	460
L-dopa	5	121	57	475
Catechol	5	102	48	410
Catechin	5	37	17	380



รูปที่ 24 Chromatographic profile ของ PPO บนคอลัมน์ CM-Sepharose



รูปที่ 25 SDS-PAGE ของ PPO ที่ได้จากการทำไวรัส

Lane 1 = B-serum Lane 2 = 30-50% acetone pellet fraction
 Lane 3 = PPO-I Lane 4 = PPO-II
 Lane 5 = standard protein markers

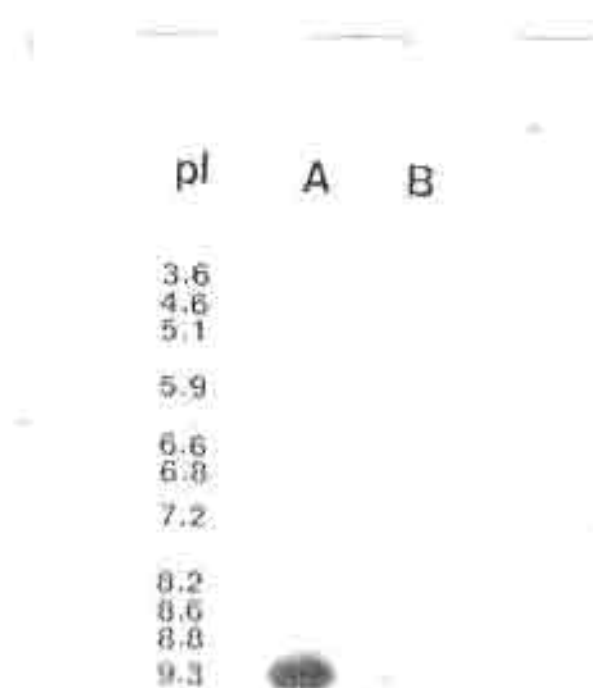
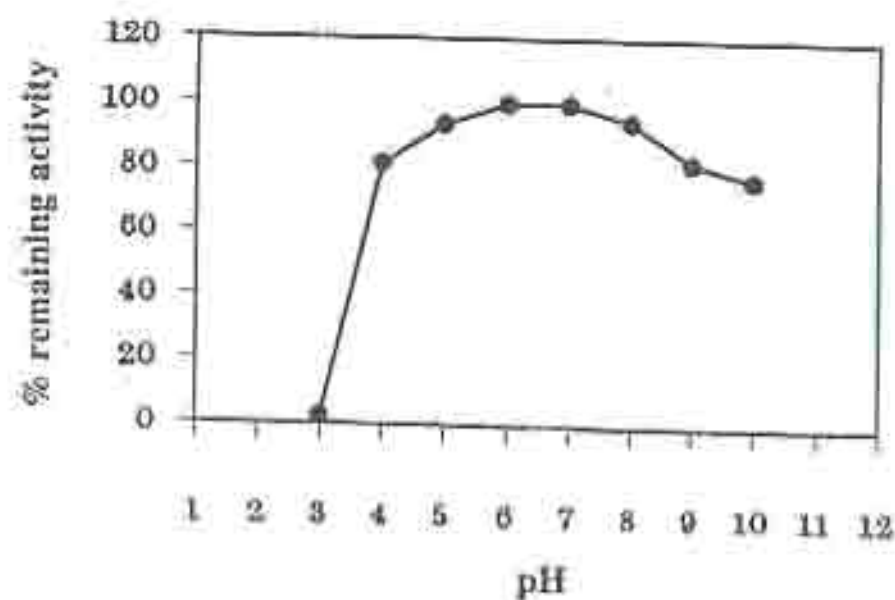
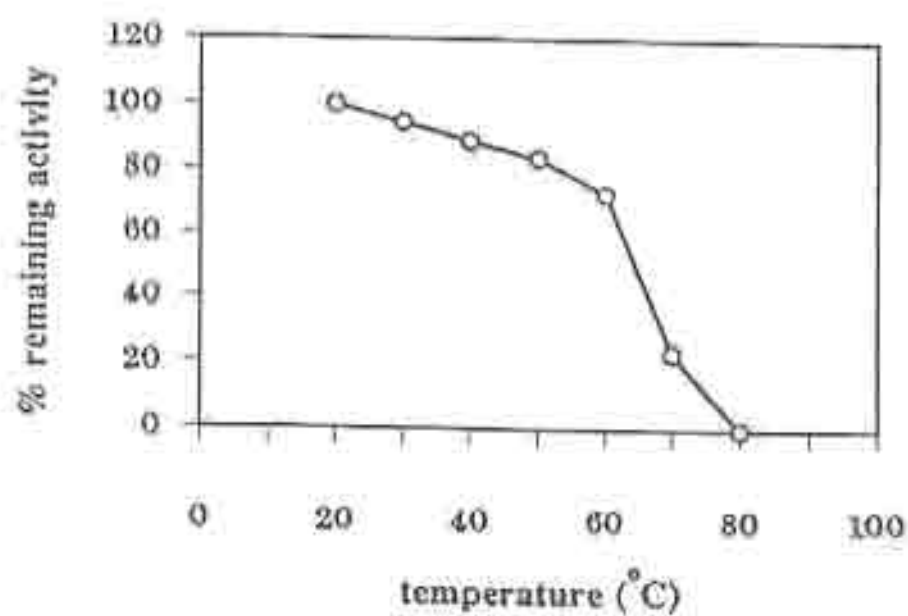


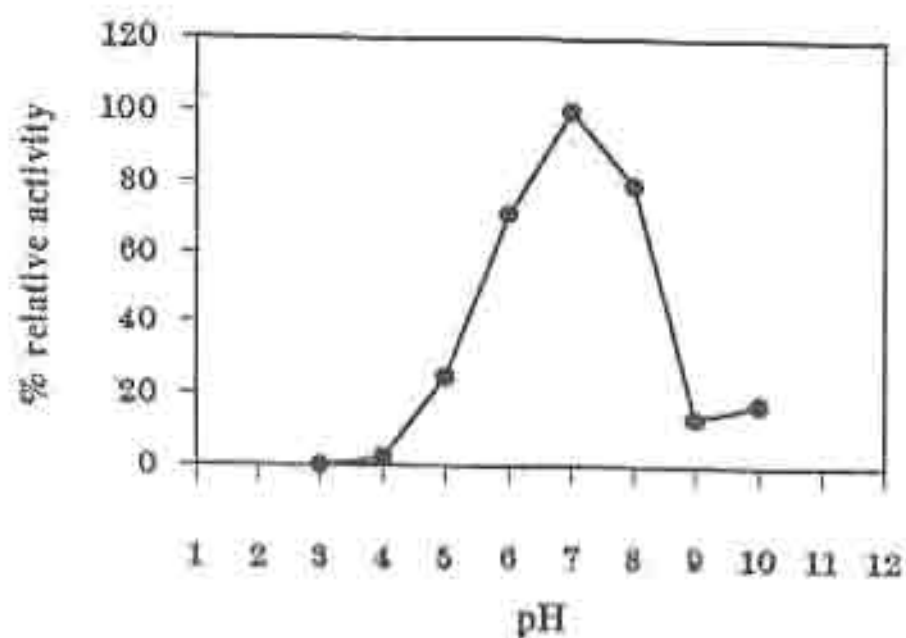
Рис. 26. Изоэлектрическое фокусирование геля электрофореза М04 PPO-I (A) и М04 PPO-II (B).



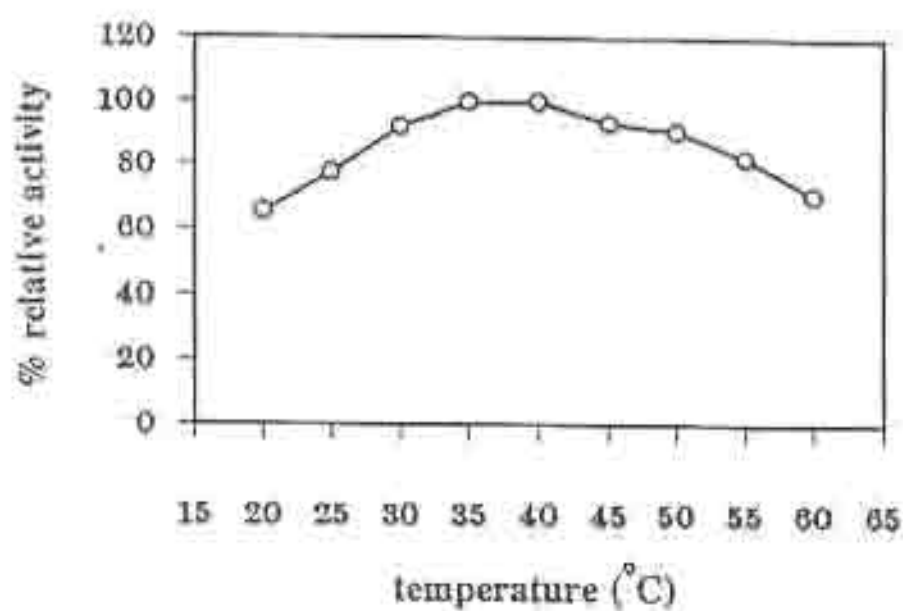
รูปที่ 27 ความเสถียรต่อ pH ของ PPO-1, -II



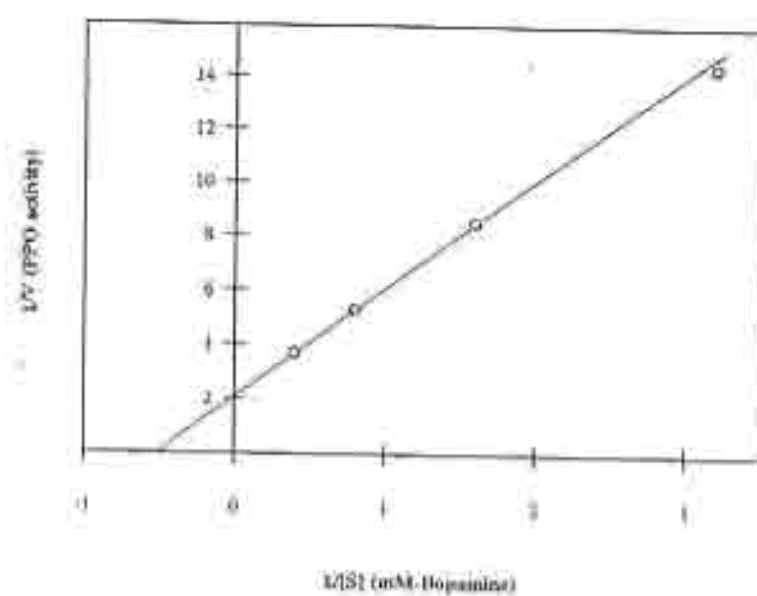
รูปที่ 28 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของ PPO-1, -II



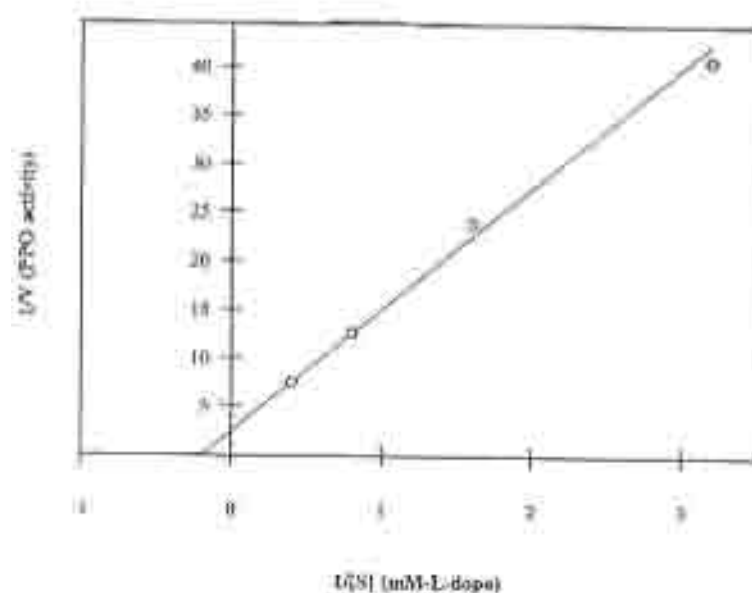
รูปที่ 39 ผลของ pH ที่มีต่อผลผลิตของ PFO-L II



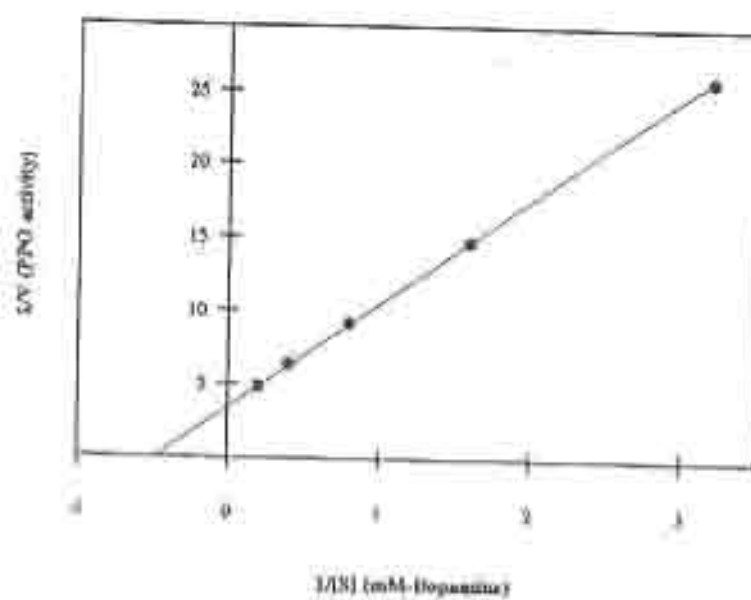
รูปที่ 39 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อผลผลิตของ PFO-L II



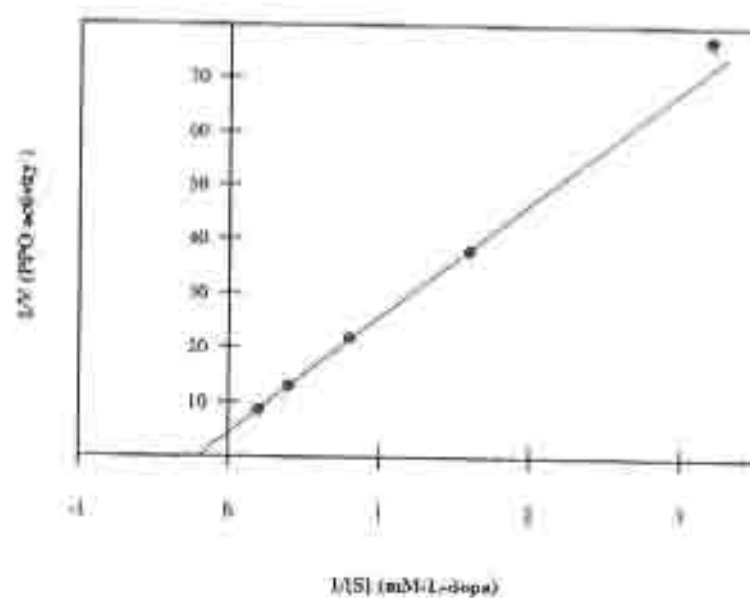
รูปที่ 31 การหา K_m ของ PPO-1 ต่อสารตั้งต้น dopamine



รูปที่ 32 การหา K_m ของ PPO-1 ต่อสารตั้งต้น L-dopa



รูปที่ 33: การหา K_m ของ PPO-II ต่อสับสเตรท dopamine



รูปที่ 34: การหา K_m ของ PPO-II ต่อสับสเตรท L-dopa