



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
(ส่วนฉบับเฉพาะ)

โครงการ

การศึกษาน้ำยาฆ่าเชื้อในระดับโมเลกุล
สำหรับไบโอเทคโนโลยีภาพสูง

โดย

รศ. ดร.รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล และ คณะฯ

14 กุมภาพันธ์ 2551

สัญญาเลขที่ RTA/4680001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ส่วนลับเฉพาะ)

โครงการ

การศึกษาน้ำยาฆ่าเชื้อในระดับโมเลกุล สำหรับไบโอเทคโนโลยีภาพสูง

คณะผู้วิจัย

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1. รศ. ดร. รพีพรรณ วัฒนสุวรรณ์กุล | คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ |
| 2. ดร. เกรียงไกร พลจันทร์ | กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ก.สาธารณสุข |
| 3. นางเจษฎาธิ์ มงคลประเสริฐ | กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ก.สาธารณสุข |
| 4. น.ส.อุไร เพ็ชรเนตร | กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ก.สาธารณสุข |
| 5. น.ส. เกศจี เม่งอำพัน | คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ |
| 6. อ. พ.ญ. ภาสกริ์ แสงสุภาวณิช | คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยส่วนนี้โดยเฉพาะเกี่ยวกับ การพัฒนาชุดทดสอบโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ในผลิตภัณฑ์ยาง นี้ได้ทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้ทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโสสกว.) ประจำปี 2546 และ จากบริษัทเอกชน (BarrierMed, Inc./Siam Polymer Engineering & Consultation Co., Ltd.) ซึ่งได้เซ็นสัญญา “Research and Development Agreement on Allergen Test Kits” กับ สกว. เมื่อวันที่ 13 สิงหาคม 2546 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและบริษัทเอกชนดังกล่าว ในการสนับสนุนทุนวิจัยนี้ จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีระดับหนึ่ง

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

รายงานรายละเอียดเนื้อหางานวิจัยของ โครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษาน้ำ ยางพาราในระดับโมเลกุลสำหรับไบโอเทคโนโลยีภาพสูง" ได้ถูกแยกออกเป็น 2 ส่วนตามลักษณะ ของงาน คือ ส่วนแรกที่เน้นวิชาการ ซึ่งได้แยกรายงานอยู่ในรายงานฉบับสมบูรณ์ โดย ประกอบด้วยโครงการย่อย 6 โครงการ คือ 1) การโคลนนิ่งแสดงออกและคุณสมบัติของโปรตีนที่ ทำให้เกิดการแพ้ตัวใหม่จากยางพารา 2) การศึกษาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยาง 3) การศึกษาโปรตีนต้านเชื้อแคนดิดาจากน้ำยางพารา 4) การศึกษาสารออกฤทธิ์ของโปรตีนยับยั้ง โปรตีเอส ต่อเชื้อก่อโรคและการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ 5) การเตรียม สารยับยั้งแคนดิดาและ สารยับยั้งโปรตีเอสในปริมาณสูงจากน้ำยางพาราและการทดสอบระดับพรีคลินิก และ 6) การ พัฒนาชุดทดสอบ ELISA เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การไหลของยาง และ ส่วนที่สองซึ่งเป็นวิชาการเชิง พาณิชยกรรมเพราะมีภาคเอกชนร่วมลงทุน 1 โครงการ คือ การพัฒนาชุดทดสอบโปรตีนที่ทำให้เกิดการ แพ้ในผลิตภัณฑ์ยาง ซึ่งได้แยกรายงานอยู่ในรายงานฉบับฉบับเฉพาะนี้

A. การพัฒนาชุดทดสอบโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ในผลิตภัณฑ์ยาง

การพัฒนาชุดทดสอบโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ในผลิตภัณฑ์ยาง เป็นโครงการที่ได้รับทุนสนับสนุนร่วมจากบริษัทเอกชน (BarrierMed, Inc./Siam Polymer Engineering & Consultation Co., Ltd.) ซึ่งได้เซ็นสัญญา “Research and Development Agreement on Allergen Test Kits” กับ สกว. เมื่อวันที่ 13 สิงหาคม 2546 เพื่อให้ทุนสนับสนุนการพัฒนาชุดทดสอบโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้จากผลิตภัณฑ์ยาง แต่เนื่องจากทางบริษัทมิได้ดำเนินการให้เงินทุนสนับสนุนครบตามสัญญา จึงทำให้สามารถดำเนินการได้ในระดับเกือบสมบูรณ์เท่านั้น โดยได้ส่ง progress reports ไปให้ BarrierMed พร้อมทั้งสำเนาให้ สกว. 2 ครั้ง ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

A.1 การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติโปรตีน 17 kD และ 30 kD ที่ทำให้เกิดการแพ้

จากรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ “การศึกษาน้ำยางพาราในระดับโมเลกุลเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม” (สัญญาเลขที่ RTA/08/2543) ได้มีการค้นพบโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ชนิดไม่ละลายน้ำตัวใหม่ 2 ตัว ซึ่งจะใช้สำหรับการพัฒนาชุดทดสอบโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ในผลิตภัณฑ์ยาง คือโปรตีน 17 kD และ 30 kD โดยการสร้าง monoclonal antibody ต่อโปรตีนดังกล่าวเพื่อนำไปใช้แอนติบอดีดังกล่าวในชุดทดสอบเพื่อตรวจจับโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ดังกล่าวที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์ยาง ดังนั้นจึงต้องมีการทำโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปใช้เป็นแอนติเจน ดังนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมแมมเบรนโปรตีนจากอนุภาคกันหลุด

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆ (โดยการใช้ภาชนะแช่น้ำแข็งช่วยในการเก็บน้ำยางเพื่อป้องกันการแตกของอนุภาคลูทอยด์) ไปแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge (45,000g , 45 min) เพื่อแยกน้ำยางออกเป็นชั้นบนที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง ชั้นกลางหรือส่วนของ cytosol (C-serum) และ ชั้นกันหลุด (bottom fraction, BF) นำชั้นกันหลุดที่ประกอบไปด้วยอนุภาค (luotid และ Frey Wyssling) ที่มีแมมเบรนห่อหุ้ม ไปขจัดโปรตีนปนเปื้อนโดยการล้างด้วย isotonic buffer (0.9% NaCl ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) ทำการสลายอนุภาคของ BF ด้วยการ Freeze-thaw ซ้ำหลายครั้งที่อุณหภูมิ -20°C สลับกับอุณหภูมิห้อง ปั่นแยกส่วนของ BF membrane (BM) ออกจากส่วนของของเหลว (B-serum) แล้วนำส่วนของ BF membrane (BM) ไปขจัดโปรตีนปนเปื้อนออกจาก BM โดยการล้างด้วย isotonic buffer

b) การเตรียมโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ขนาด 17 และ 30 kD จาก BM

ทำการสกัด proteolipids (PL) จาก BM ด้วยการละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ chloroform:methanol (2:1,v/v) โดยใช้ปริมาตร 5 เท่า กรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง

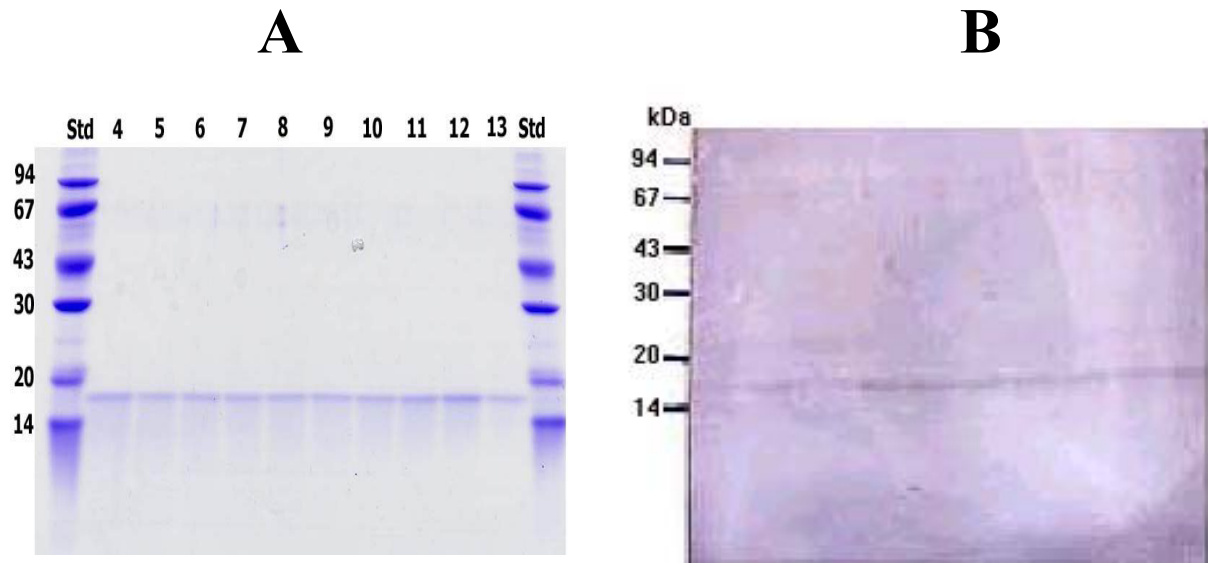
แล้ววางทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำการแยกส่วนของชั้นบนซึ่งจะได้ proteolipid ที่ละลายได้ใน methanol หรือ BMPL/M ซึ่งจะประกอบไปด้วยโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ขนาด 30 kD และส่วนชั้นล่างสามารถเตรียมเป็นไขของ proteolipid fluff หรือ BMPL/f ซึ่งจะประกอบไปด้วยโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ขนาด 17 kD และจะลอยอยู่ระหว่างชั้น chloroform และ น้ำ หลังการเติมน้ำเกลือ (0.6% NaCl) ลงไป ทำการตกตะกอนโปรตีนใน BMPL/m และ BMPL/f ด้วย 60% acetone แล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อด้วยวิธี preparative SDS-PAGE

c) การทำ IgE immunoblot

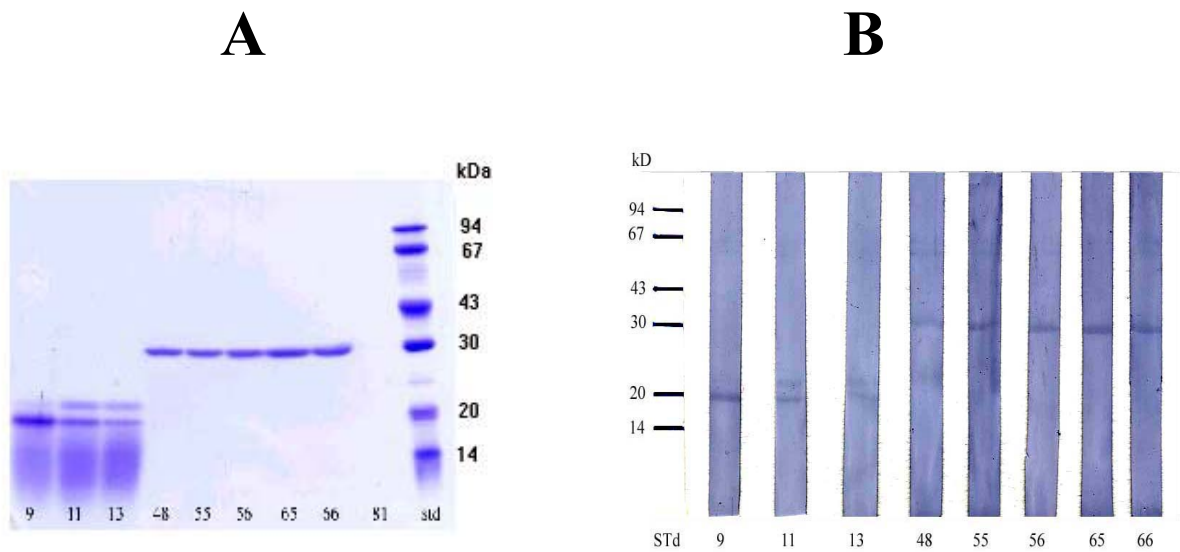
นำโปรตีนซึ่งละลายน้ำได้ที่เตรียมได้จาก BF ในรูป BMPL/m และ BMPL/f ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำไม่ได้ไปทำการแยกด้วย SDS-PAGE ด้วยการถ่ายโปรตีนดังกล่าว ลงในแผ่น nitrocellulose แล้วทำ immunoblot จะใช้ serum ที่ได้จากผู้แพ้โปรตีนจากยาง พร้อมด้วยการทำย้อมให้เห็นแถบ IgE binding protein ด้วยการใช anti human IgE ที่เชื่อมกับ alkaline phosphatase

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

โปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ 2 ตัวที่จะใช้ในการพัฒนาชุดทดสอบคือโปรตีน 17 kD และ 30 kD ซึ่งสามารถทำได้บริสุทธิ์ โดยการนำ proteolipid (PL) ของ bottom membrane (BM) ที่เตรียมอยู่ในรูปของ BMPL/f และ BMPL/m ไปตกตะกอนด้วย acetone ที่ความเข้มข้น 60% ไปทำปฏิกิริยาผ่าน preparative SDS-PAGE แล้วรวบรวม fraction ที่ให้โปรตีนบริสุทธิ์ 17 kD (รูปที่ A.1, A) และ 30 kD (รูปที่ A. 2, A) โดยสามารถยืนยันถึงการเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้จาก (IgE reactive) ของโปรตีนที่บริสุทธิ์จากการทำ IgE- immunoblot โดยใช้ซีรัมของชาวอเมริกันที่แพ้โปรตีนจากยาง ดังผลจากรูป B ของรูปที่ A.1 และ A.2 ตามลำดับ และจากการนำโปรตีน 17 kD และ 30 kD ที่บริสุทธิ์ไปหาลำดับกรดอะมิโนบริเวณ N-terminal ดังผลในตารางที่ A.1 และ ตารางที่ A.2 ผลที่ได้สามารถ ยืนยันถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่เตรียมได้จากการมี N-terminal เดียว และจากผลการเทียบลำดับกรดอะมิโนด้าน N-terminal กับข้อมูลใน database สามารถยืนยันได้ว่าเป็นโปรตีนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ ชนิดใหม่



รูปที่ A.1. SDS-PAGE (A) และ IgE-immunoblot (B) ของ โปรตีนใน fraction ต่างๆที่ได้ จากทำบริสุทธิ์โปรตีน 17 kD (#4-13) โดยวิธี preparative SDS-PAGE



รูปที่ A.2. SDS-PAGE (A) และ IgE-immunoblot (B) ของโปรตีนในfraction ต่างๆที่ได้จากทำบริสุทธิ์โปรตีน 30 kD (#48-66)โดยวิธี preparative SDS-PAGE

ตารางที่ A.1 ผลการทำ N-terminal sequence ของโปรตีน 17 kD: DLDVFVTGSF

Cycle Number N → C	Major assigned a.a.'s	Amount in pmoles	Minor assigned a.a.'s	Cycle Comments:
1	D	15		Positive assignment above background
2	L	16		Positive assignment above background
3	D	15		Positive assignment above background
4	V	15		Positive assignment above background
5	F	12		Positive assignment above background
6	V	15		Positive assignment above background
7	T	14		Positive assignment above background
8	G	9		Positive assignment above background
9	S	5		Positive assignment above background
10	F	8		Positive assignment above background
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				

General comments: The sequence was clearly above background.

ตารางที่ A.2 ผลการทำ N-terminal sequence ของโปรตีน 30 kD: GGIAIYWGQN

Cycle Number N ⇨ C	Major assigned a.a.'s	Amount in pmoles	Minor assigned a.a.'s	Cycle Comments:
1	G	4		Positive assignment above background
2	G	4		Positive assignment above background
3	I	5		Positive assignment above background
4	A	4		Positive assignment above background
5	I	5		Positive assignment above background
6	Y	4		Positive assignment above background
7	W	2		Positive assignment above background
8	G	3		Positive assignment above background
9	Q	3		Positive assignment above background
10	N	1		Positive assignment above background
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				

General comments: The sequence was clearly above background.

A.2 การผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน 30 kD

การผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgG ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน 30 kD มีรายละเอียดดังต่อไปนี้:

Materials and Methods:

a) Immunization Pattern (Table A.3)

First immunization, 10-15 μ g of antigen (purified 30 kD) was mixed with Complete Freund's Adjuvant (CFA) and injected to intraperitoneal of a mouse. First boosting with 10-15 μ g antigen in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) was followed two weeks after the first immunization. The whole immunization schedule is described in table1. Three days after the final boost, mouse spleen cells were collected for fusion.

Table A.3. Immunization schedule on mouse Balb/c with 30 kD proteins.

Day	Manipulation	Antigen (μ g)	Adjuvant
0	Primary Immunization	10-15	CFA
14	Boost # 1	10-15	IFA
28	Boost # 2	10-15	IFA
32	Boost # 3	10-15	IFA
46	Boost # 4	10-15	IFA
50	Fusion 3-4 day after boosting # 4	-	-

b) Fusion of mouse spleen cells with myeloma cells

Prior to cell fusion, the partner (myeloma) cell line was expanded and a booster injection of antigen administered to the primed animals. On the day of fusion, the spleens were harvested. Spleen cells and partner cells are washed, harvested, and mixed. Cell fusion is performed at 37°C in the presence of polyethylene glycol (PEG). The resulting fused-cell mixture is harvested and plated onto tissue plates. After

incubation with hypoxanthine, azaserine (HA) medium and feeding over 2 weeks , the hybridomas were then ready for screening.

Cell preparations :

Myeloma cell : A day before performing cell fusion, myeloma cells was checked under an inverted microscope to make sure that they are not contaminated and there is enough cells for the fusion.

Spleen cells : The immunized Balb/c mouse was sacrificed and spleen aseptically harvested.

The cells (myeloma and spleen cells) were counted and assessed viability in each cell suspension using a hemacytometer and Trypan blue exclusion. Add an appropriate number of myeloma cells into the entire volume of spleen cells using, cell ratio of 10 : 1 (spleen: myeloma) and sediment by centrifugation .

Cell fusion :

The supernatant was aspirated and pellet suspended by tapping the end of the tube. Polyethylene glycol (PEG) was added while tapping the side of the tube for thorough mixing. The pellet was separated and suspended under RPMI medium. The pellet was next resuspended in HA medium, at appropriate volume to bring the cells to about 1×10^5 cells/well/200 μ l and dispensed into 96 well plates (200 μ l/well). Resulting hybridomas were checked ,about 10-14 days after fusion, under an inverted microscope and screened for the clone cells with high titer by ELISA method.

c) Cloning of hybrid cell by limiting dilution:

Monoclonal antibodies are secreted by the progeny of a single cell that can produce only a single antibody. Cloning is required to ensure that the problem of polyspecificity are avoided and the risk of overgrowth by nonproducing cells minimized. Although cloning can also be performed by the soft-agar technique, clone derived by this technique must be adapted to liquid culture before the supernatants can be tested. Cloning by limiting dilution allows direct testing of the supernatants, therefore, 10-14 days after first limiting dilution, the hybridoma clones can be directly checked under an inverted microscope and the titer screened by ELISA. The clones having high titer can be subjected to second limiting dilution for monoclonal antibody with high specificity.

d) Immunoglobulin type checking :

Type of immunoglobulins were checked by using ELISA and isotyping kit. Immunoglobulin standards in isotyping kit are rabbit anti - mouse immunoglobulin panel ;IgG1,IgG2a ,IgG2b, IgG3,IgM,IgA,K chain and λ chain. Second antibody is goat anti-

rabbit immunoglobulin horseradish peroxidase conjugate. Substrate is TMB peroxidase and stopping solution is 1% HCl

e) Production of ascites fluid containing monoclonal antibody

A major advantage of using monoclonal antibodies over polyclonal antisera is the potential available of large quantities of the specific monoclonal antibody. In the general, hybridoma cells ($2-2.5 \times 10^6$ cells) are injected into pristinised Balb/c mice. After a few weeks, the ascites containing high concentration of monoclonal antibody together with other proteins is collected. To obtain a purified preparation of the monoclonal antibody, an affinity chromatography purification is required. A high-titer monoclonal antibody preparation can be obtained from the ascites fluid of BALB/c (8-9 weeks) inoculated intraperitoneally with monoclonal antibody – producing hybridoma cell. The fluids are collected several times following injection of the hybridoma cell.

f) Purification of Monoclonal Antibody

The ascites fluid obtained from intraperitoneal of BALB/c mice was precipitated with ammonium sulphate, at 4°C , at final saturation of 40%. The suspension was centrifuged at 10,000 rpm for 20 min. The pellet was dissolved in 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.0 and dialyzed overnight in the same buffer. A protein A Sepharose column was equilibrated with 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.0 for 2-3 column volumes, before loading with the dialyzed sample. The column was then washed with 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.0 and eluted with 0.1 M citric acid pH 3.0 about 5-10 column volumes. Each eluted fraction was neutralized with 1.0 M tris-HCl buffer pH 9.0 (60 μl /ml of fraction). The OD_{280} of each fraction was determined and the eluted peak fractions were pooled and concentrated by centrifugation in concentration tube and subjected to dialysis by using gel filtration column.

Results and discussion:

a) Result on cell fusion trials

a.1) Mouse number 1

Spleen cells of mouse number 1 immunized with purified 30 kD antigen were harvest and fused with myeloma cells. Two weeks later, hybrid cells were screened antibody production by ELISA method. The supernatant from 346 clones of hybrid cells were used for antibody titer determination. The result indicated 24 clones with high titer against 30 kD ($\text{OD}_{450} > 4.00$), 45 clones with titer OD more than 3.00 ($\text{OD}_{450} > 3.00$), and 49 clones with titer OD more than 2.00 ($\text{OD}_{450} > 2.00$). The ELISA OD screening

result and details on the corresponding clone cells applied to microtiterplate were shown in Table A.4 and A.5, respectively. The clone no. 57, 73, 204, 213, 251, 302, 323, 326 were selected and subjected to first limiting dilution.

Table A.4. The hybrid clone numbers from which their supernatants were applied to microtiterplate for antibody titer measurement by ELISA method as shown in Table A.5.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<u>A</u>	<u>Blank</u>	<u>C15</u>	<u>C323</u>	<u>C302</u>	<u>C221</u>	<u>C57</u>	<u>C208</u>	<u>C242</u>	<u>C250</u>	<u>C260</u>	<u>C268</u>	<u>C276</u>
<u>B</u>	<u>Blank</u>	<u>C16</u>	<u>C24</u>	<u>C215</u>	<u>C222</u>	<u>C73</u>	<u>C209</u>	<u>C243</u>	<u>C251</u>	<u>C261</u>	<u>C269</u>	<u>C277</u>
<u>C</u>	<u>NC</u>	<u>C17</u>	<u>C210</u>	<u>C216</u>	<u>C223</u>	<u>C230</u>	<u>C236</u>	<u>C244</u>	<u>C252</u>	<u>C262</u>	<u>C270</u>	<u>C278</u>
<u>D</u>	<u>NC</u>	<u>C18</u>	<u>C211</u>	<u>C217</u>	<u>C224</u>	<u>C231</u>	<u>C237</u>	<u>C245</u>	<u>C253</u>	<u>C263</u>	<u>C271</u>	<u>C279</u>
<u>E</u>	<u>PC</u>	<u>C19</u>	<u>C202</u>	<u>C218</u>	<u>C225</u>	<u>C232</u>	<u>C238</u>	<u>C246</u>	<u>C254</u>	<u>C264</u>	<u>C272</u>	<u>C280</u>
<u>F</u>	<u>PC</u>	<u>C20</u>	<u>C204</u>	<u>C219</u>	<u>C207</u>	<u>C233</u>	<u>C239</u>	<u>C247</u>	<u>C255</u>	<u>C265</u>	<u>C273</u>	<u>C281</u>
<u>G</u>	<u>C13</u>	<u>C21</u>	<u>C206</u>	<u>C206</u>	<u>C226</u>	<u>C204</u>	<u>C240</u>	<u>C248</u>	<u>C256</u>	<u>C266</u>	<u>C326</u>	<u>C282</u>
<u>H</u>	<u>C14</u>	<u>C22</u>	<u>C213</u>	<u>C220</u>	<u>C227</u>	<u>C235</u>	<u>C241</u>	<u>C249</u>	<u>C257</u>	<u>C267</u>	<u>C340</u>	<u>C283</u>

NC = Negative control; PC = Positive control;

C = Hybrid clone cell exp.; C13 = Hybrid clone cell number

Table A.5. The optical density of antibody produced by corresponding hybridomas in Table A.4.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<u>A</u>	<u>0.04</u>	<u>Out</u>	<u>Out</u>	<u>Out</u>	<u>1.03</u>	<u>Out</u>	<u>0.99</u>	<u>0.81</u>	<u>0.85</u>	<u>0.73</u>	<u>1.57</u>	<u>3.03</u>
<u>B</u>	<u>0.04</u>	<u>0.67</u>	<u>1.48</u>	<u>1.42</u>	<u>0.63</u>	<u>Out</u>	<u>3.89</u>	<u>1.87</u>	<u>Out</u>	<u>Out</u>	<u>0.94</u>	<u>2.12</u>
<u>C</u>	<u>0.23</u>	<u>2.12</u>	<u>1.44</u>	<u>1.42</u>	<u>1.25</u>	<u>3.22</u>	<u>1.27</u>	<u>0.67</u>	<u>1.23</u>	<u>0.57</u>	<u>0.96</u>	<u>0.61</u>
<u>D</u>	<u>0.23</u>	<u>0.78</u>	<u>1.47</u>	<u>1.17</u>	<u>0.67</u>	<u>1.30</u>	<u>1.31</u>	<u>2.04</u>	<u>0.57</u>	<u>0.74</u>	<u>0.57</u>	<u>0.83</u>
<u>E</u>	<u>Out</u>	<u>1.04</u>	<u>2.03</u>	<u>0.86</u>	<u>3.51</u>	<u>0.68</u>	<u>2.94</u>	<u>3.31</u>	<u>0.84</u>	<u>0.52</u>	<u>1.44</u>	<u>3.15</u>
<u>F</u>	<u>Out</u>	<u>0.66</u>	<u>1.40</u>	<u>3.39</u>	<u>1.39</u>	<u>1.38</u>	<u>1.04</u>	<u>1.99</u>	<u>1.77</u>	<u>1.33</u>	<u>0.93</u>	<u>1.03</u>
<u>G</u>	<u>2.51</u>	<u>0.97</u>	<u>2.36</u>	<u>1.50</u>	<u>1.38</u>	<u>Out</u>	<u>1.02</u>	<u>1.36</u>	<u>1.95</u>	<u>1.05</u>	<u>Out</u>	<u>0.97</u>
<u>H</u>	<u>1.10</u>	<u>2.78</u>	<u>Out</u>	<u>1.75</u>	<u>0.63</u>	<u>3.17</u>	<u>1.15</u>	<u>1.10</u>	<u>0.71</u>	<u>1.07</u>	<u>1.05</u>	<u>0.75</u>

Out = OD 450 > 4.00 (high titer)

a.2) Mouse number 2

Spleens of mouse no. 2 immunized with 30 kD antigen under the same condition as mouse number 1 were harvest and fused with myeloma cells. Two weeks later, hybrid cells were screened for anti-30 kD antibody production by ELISA method. The supernatant from 285 clones of hybrid cells were used for antibody titer determination. There were 10 clones with have high titer against 30 kD (OD450 > 3.00). Selection was made on 4 most positive hybridomas and subjected to first limiting dilution.

b) Cloning of hybrid cell by limiting dilutions:

b.1) First limiting dilution

b.1.1) Anti-30 kD hybridmas derived from mouse number 1

The selected eight most positive hybridomas from the first fusion were subjected to limiting dilution. As many as 270 clones were found in the first limiting dilution under an inverted microscope. There were 69 clones exhibiting antibody titer against 30 kD when determined by ELISA method. The titer values and their correspondng clones were shown in Table A.6 and Table A.7, respectively. There were 16 clones with high titer against the 30 kD and clone no. 137, 138, and 170 were chosen for secondary dilution limiting.

Table A.6. Hybridoma clone numbers obtained after first limiting dilution and their corresponding supernatants applied to microtiterplate for measuring the antibody titer by ELISA as shown in Table A.5.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<u>A</u>	<u>Blank</u>	<u>C100</u>	<u>C108</u>	<u>C116</u>	<u>C124</u>	<u>C132</u>	<u>C140</u>	<u>C148</u>	<u>C156</u>	<u>C164</u>	<u>C12</u>	<u>C92</u>
<u>B</u>	<u>Blank</u>	<u>C101</u>	<u>C109</u>	<u>C117</u>	<u>C125</u>	<u>C133</u>	<u>C141</u>	<u>C149</u>	<u>C157</u>	<u>C165</u>	<u>C13</u>	<u>C93</u>
<u>C</u>	<u>NC</u>	<u>C102</u>	<u>C110</u>	<u>C118</u>	<u>C126</u>	<u>C134</u>	<u>C142</u>	<u>C150</u>	<u>C158</u>	<u>C166</u>	<u>C14</u>	<u>C94</u>
<u>D</u>	<u>NC</u>	<u>C103</u>	<u>C111</u>	<u>C119</u>	<u>C127</u>	<u>C135</u>	<u>C143</u>	<u>C151</u>	<u>C159</u>	<u>C167</u>	<u>C15</u>	<u>C95</u>
<u>E</u>	<u>PC</u>	<u>C104</u>	<u>C112</u>	<u>C120</u>	<u>C128</u>	<u>C136</u>	<u>C144</u>	<u>C152</u>	<u>C160</u>	<u>C168</u>	<u>C16</u>	<u>C96</u>
<u>F</u>	<u>PC</u>	<u>C105</u>	<u>C113</u>	<u>C121</u>	<u>C129</u>	<u>C137</u>	<u>C145</u>	<u>C153</u>	<u>C161</u>	<u>C169</u>	<u>C17</u>	<u>C97</u>
<u>G</u>		<u>C106</u>	<u>C114</u>	<u>C122</u>	<u>C130</u>	<u>C138</u>	<u>C146</u>	<u>C154</u>	<u>C162</u>	<u>C170</u>	<u>C18</u>	<u>C98</u>
<u>H</u>		<u>C107</u>	<u>C115</u>	<u>C123</u>	<u>C131</u>	<u>C139</u>	<u>C147</u>	<u>C155</u>	<u>C163</u>	<u>C171</u>	<u>C19</u>	<u>C99</u>

NC = Negative control; PC = Positive control; C = Hybrid clone cell

Table A.7. The ELISA optical density of anti-30 kD antibody produced by corresponding clones shown in Table A.6.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<u>A</u>		<u>0.37</u>	<u>0.25</u>	<u>0.40</u>	<u>0.26</u>	<u>3.86</u>	<u>1.45</u>	<u>0.33</u>	<u>0.22</u>	<u>0.25</u>	<u>0.35</u>	<u>0.68</u>
<u>B</u>		<u>0.33</u>	<u>0.35</u>	<u>0.53</u>	<u>0.40</u>	<u>3.58</u>	<u>0.29</u>	<u>0.23</u>	<u>0.24</u>	<u>0.26</u>	<u>0.25</u>	<u>0.41</u>
<u>C</u>		<u>0.55</u>	<u>0.49</u>	<u>0.43</u>	<u>0.28</u>	<u>3.47</u>	<u>0.28</u>	<u>0.24</u>	<u>0.23</u>	<u>0.36</u>	<u>0.44</u>	<u>0.35</u>
<u>D</u>		<u>0.40</u>	<u>0.44</u>	<u>0.73</u>	<u>0.32</u>	<u>3.79</u>	<u>0.25</u>	<u>0.30</u>	<u>0.26</u>	<u>0.46</u>	<u>0.25</u>	<u>0.31</u>
<u>E</u>		<u>0.41</u>	<u>0.39</u>	<u>0.299</u>	<u>3.27</u>	<u>3.73</u>	<u>0.20</u>	<u>0.39</u>	<u>0.26</u>	<u>0.33</u>	<u>0.40</u>	<u>0.34</u>
<u>F</u>		<u>0.45</u>	<u>0.43</u>	<u>0.27</u>	<u>2.81</u>	<u>3.82</u>	<u>0.32</u>	<u>0.47</u>	<u>0.28</u>	<u>0.60</u>	<u>0.44</u>	<u>0.30</u>
<u>G</u>		<u>0.43</u>	<u>0.32</u>	<u>0.25</u>	<u>3.53</u>	<u>3.87</u>	<u>0.28</u>	<u>0.22</u>	<u>0.25</u>	<u>3.52</u>	<u>2.89</u>	<u>0.40</u>
<u>H</u>		<u>0.29</u>	<u>0.33</u>	<u>0.35</u>	<u>3.72</u>	<u>2.39</u>	<u>0.24</u>	<u>0.26</u>	<u>0.29</u>	<u>0.33</u>	<u>2.11</u>	<u>0.34</u>

b.1.2) Anti-30 kD hybridomas derived from mouse number 2

Four most positive hybridomas were subjected to first limitation. Two weeks later, hybrid cells were screened by ELISA method. The supernatant from 178 clones of hybrid cells were employed for anti- 30 kD antibody titer determination. There were 12 clones with high titer against 30 kD (OD450 > 3.00) and 4 most positive clones were selected for second limitation.

b.2) Second limiting dilution

b.2.1) Anti 30 kD hybridomas (mouse no.1) from first limiting dilution

Three selected hybrid clones obtained after the first limiting dilution were subjected to second limiting to ensure that monoclonal antibody production derived from one cell only. A total number of 186 clones was obtained from secondary limiting, but only 100 clones showing titer against 30 kD. The titer values and their corresponding clones were reported in Table 8 and 9 respectively. About 32 clone possessed high titer against 30 kD. These clones were amplified in tissue culture flask for production of monoclonal antibody, preservation of cells, characterize the type of immunoglobulin and determination of specificity against 30 kD protein .

Table A.8. Hybridoma clone numbers obtained after second limiting dilution from which their corresponding supernatants applied to microtiterplate for measuring the antibody titer by ELISA method shown in Table A.9.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<u>A</u>	Blank	C5	C13	C21	C29	C37	C44	C52	C60	C68	C76	C84
<u>B</u>	Blank	C6	C14	C22	C30	C105	C45	C53	C61	C69	C77	C85
<u>C</u>	NC	C7	C15	C23	C31	C38	C46	C54	C62	C70	C78	C86
<u>D</u>	PC	C8	C16	C24	C32	C39	C47	C55	C63	C71	C79	C87
<u>E</u>	C1	C9	C17	C25	C33	C40	C48	C56	C64	C72	C80	C88
<u>F</u>	C2	C10	C18	C26	C34	C41	C49	C57	C65	C73	C81	C89
<u>G</u>	C3	C11	C19	C27	C35	C42	C50	C58	C66	C74	C82	C90
<u>H</u>	C4	C12	C20	C28	C36	C43	C51	C59	C67	C75	C83	C91

Table A.9. The ELISA optical density of anti-30 kD antibody produced by corresponding clones shown in Table A.8.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<u>A</u>		<u>0.21</u>	<u>3.14</u>	<u>2.17</u>	<u>2.87</u>	<u>0.25</u>	<u>0.156</u>	<u>0.22</u>	<u>0.18</u>	<u>0.21</u>	<u>0.29</u>	<u>0.30</u>
<u>B</u>		<u>2.57</u>	<u>2.75</u>	<u>0.60</u>	<u>3.04</u>	<u>0.20</u>	<u>0.168</u>	<u>0.28</u>	<u>0.15</u>	<u>0.23</u>	<u>0.15</u>	<u>0.22</u>
<u>C</u>		<u>2.40</u>	<u>3.05</u>	<u>2.05</u>	<u>2.61</u>	<u>0.198</u>	<u>0.171</u>	<u>0.21</u>	<u>0.24</u>	<u>0.18</u>	<u>0.27</u>	<u>0.14</u>
<u>D</u>		<u>3.27</u>	<u>2.22</u>	<u>3.11</u>	<u>2.36</u>	<u>0.23</u>	<u>0.31</u>	<u>0.16</u>	<u>0.28</u>	<u>0.20</u>	<u>0.16</u>	<u>0.21</u>
<u>E</u>	<u>2.74</u>	<u>0.62</u>	<u>3.16</u>	<u>3.25</u>	<u>2.21</u>	<u>0.23</u>	<u>0.19</u>	<u>0.19</u>	<u>0.20</u>	<u>0.20</u>	<u>0.18</u>	<u>0.21</u>
<u>F</u>	<u>3.43</u>	<u>2.78</u>	<u>3.35</u>	<u>3.11</u>	<u>0.24</u>	<u>0.22</u>	<u>0.21</u>	<u>0.23</u>	<u>0.20</u>	<u>0.17</u>	<u>0.24</u>	<u>0.21</u>
<u>G</u>	<u>2.24</u>	<u>0.40</u>	<u>2.70</u>	<u>3.32</u>	<u>0.22</u>	<u>0.23</u>	<u>0.24</u>	<u>0.20</u>	<u>0.21</u>	<u>0.20</u>	<u>0.26</u>	<u>0.17</u>
<u>H</u>	<u>1.49</u>	<u>3.01</u>	<u>3.03</u>	<u>2.96</u>	<u>0.27</u>	<u>0.19</u>	<u>0.25</u>	<u>0.21</u>	<u>0.25</u>	<u>0.20</u>	<u>0.17</u>	<u>0.21</u>

b.2.2) Anti-30 kD hybridoma (mouse number 2) from first limiting dilution

Four most positive hybridomas were selected to subjected to second limitation. Two weeks later, hybrid cells were screened by ELISA method. The supernatant from 206 clones of hybrid cells were determined the titer. The result indicated 82 clones with high titer against 30 kD (OD₄₅₀ > 4.00) and 39 clones with OD₄₅₀>3.00. Twenty most positive clones were selected for immunoglobulin typing using isotyping kit , ELISA method.

c) Typing of monoclonal antibody

c.1) Anti-30 kD hybridomas derived from mouse number 1

Monoclonal antibodies from 33 hybrid clones obtained after the second limiting dilution were characterized for the type of immunoglobulin by using isotyping kit (Bio-Rad, USA). The result revealed that 29 clones were IgG2b Kappa class, 2 clones IgG1 with low titer, 2 clones with no antibody secretion and high titer only observed on IgG2b and κ chain.

Table A.10. Titer values (OD 450) obtained from isotyping kit in characterization of second limiting of fusion clone (mouse number 1).

	C 14	C 17	C 18	C 19	C 20	C 21	C 23	C 24	blank
IgG1	1.194	1.461	1.124	1.151	1.548	0.995	1.140	1.058	0.042
IgG2a	0.310	0.347	0.232	0.271	0.399	0.201	0.25	0.210	0.042
IgG2b	Out	3.971	3.889	Out	3.996	3.879	Out	3.995	0.042
IgG3	0.251	0.343	0.213	0.242	0.396	0.208	0.222	0.191	0.040
IgM	0.404	0.508	0.336	0.402	0.552	0.278	0.386	0.292	0.040
IgA	0.732	0.757	0.634	0.920	0.814	0.587	0.734	0.607	0.092
κ chain	3.561	3.79	2.623	3.598	Out	3.735	3.858	Out	0.091
λ chain	0.312	0.34	0.238	0.292	0.398	0.218	0.260	0.295	0.051

c.2) Anti-30 kD hybridoma from mouse number 2

Twenty most positive clones, obtained after the second limiting dilution, were selected for typing of the immunoglobulin. Types of immunoglobulin that produced from these clones all are all IgM Kappa class since the result indicated higher titer values on IgM than any other types. All twenty clones were preserved at -80°C for the stock. Some data on characterization by isotyping kit (ELISA system) was shown in Table A.11.

Table A.11. ELISA OD 450 obtained from isotyping kit obtained from immunoglobulin characterization among clones derived from the second limiting dilution (mouse no. 2).

	C153	C65	C70	C124	C72	C121	C122	C123	blank
IgG1	0.155	0.175	0.157	0.144	0.157	0.134	0.138	0.136	0.042
IgG2a	0.097	0.093	0.095	0.097	0.095	0.089	0.098	0.098	0.042
IgG2b	0.090	0.093	0.094	0.090	0.094	0.088	0.092	0.092	0.042
IgG3	0.144	0.166	0.153	0.155	0.141	0.145	0.139	0.149	0.040
IgM	2.85	3.15	3.03	3.09	3.08	3.03	2.96	2.82	0.040
IgA	0.125	0.097	0.091	0.097	0.092	0.094	0.095	0.124	0.092
κ chain	2.183	2.793	2.062	2.668	2.859	2.551	2.78	2.503	0.091
λ chain	0.156	0.144	0.166	0.153	0.150	0.141	0.145	0.134	0.051

d) Purification of anti- 30 kD monoclonal antibody

After loading the sample suspension onto the protein A column, the column was washed with binding buffer (0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.0) and eluted with elution buffer (0.1 M citric acid pH 3.0). The fractions were collected and subjected to protein absorbance (OD_{280}) measurement and the antibody specificity to the 30 kD by ELISA method. The profile on protein OD_{280} and antibody specificity OD_{ELISA} were showed in Figure A. 3, respectively. The eluted fraction with high protein concentration and antibody titer (fraction 19-30) were pooled, concentrated and kept in new appropriated buffer.

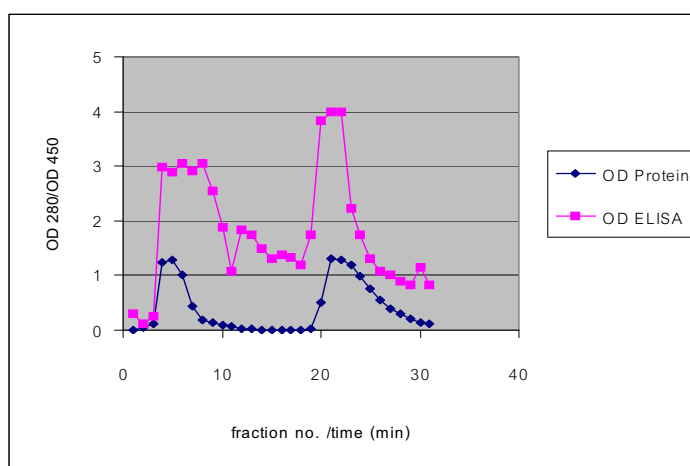


Figure A.3 Column profiles on protein absorbance (OD_{280}) and anti- 30 kD antibody specificity (OD_{450}) of fractions eluted from Protein A column.

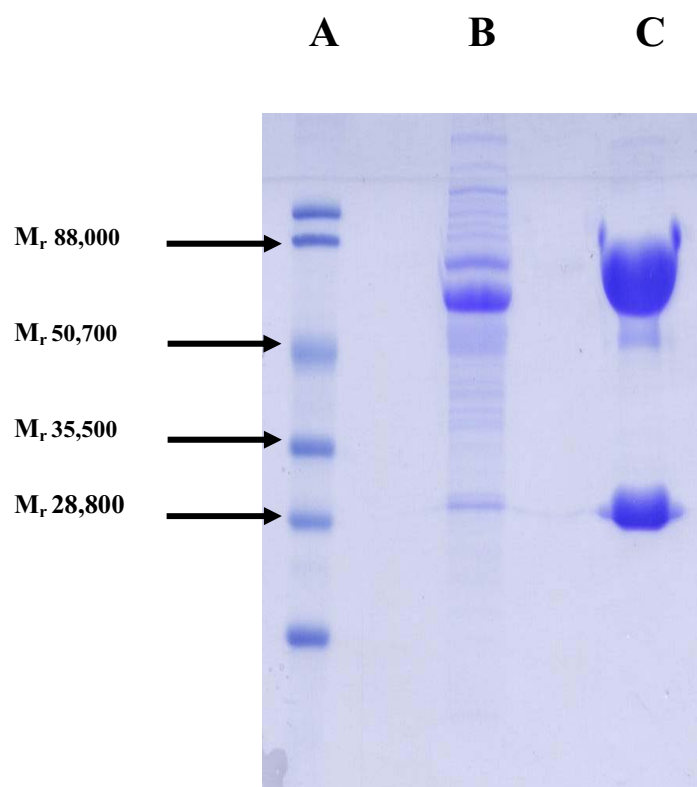


Figure A.4 SDS-PAGE of anti-30 kD monoclonal antibodies.

A: Standard molecular weigh marker (daltons) Low range (BIO-RAD);

B: Unbound fraction or washed peak;

C: Eluted peak fractions (30 μ g)

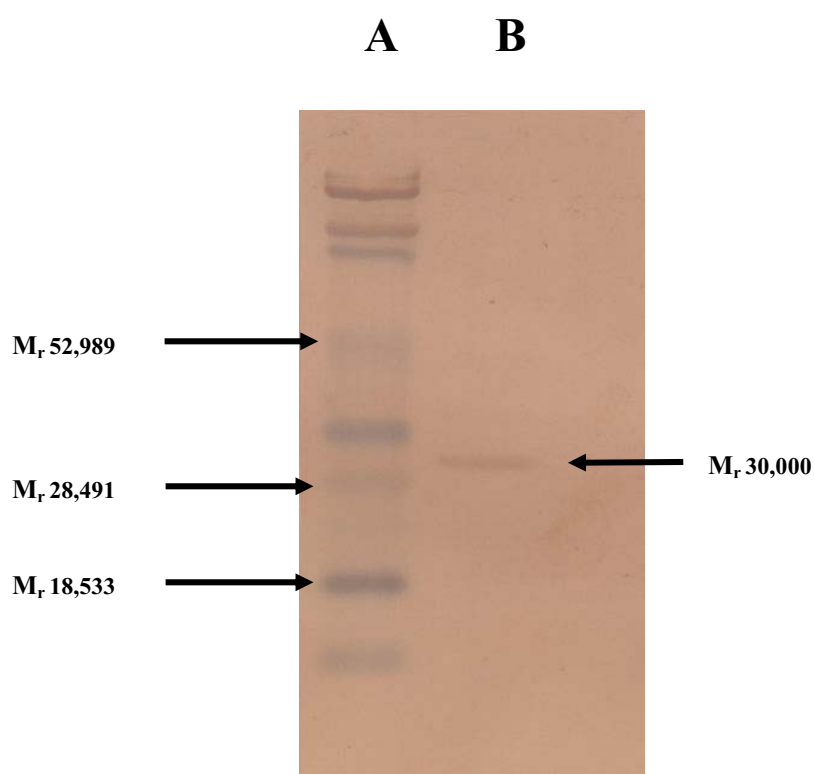


Figure A.5 Western-blotting analysis of 30 kD antigen against anti-30 kD mAb

A: Standard molecular weight marker (daltons) Broad range (BIO-RAD);

B: Purified mouse monoclonal antibodies reacted with 30 kD antigen.

From the correlation profiles on OD measurements, between protein and ELISA in each fraction, the purified monoclonal antibodies were highly specific to the 30 kD. (Figure A. 3). The measurement of OD ELISA in washing peak was 3.045 and elution peak > 4.000 indicated column overloading. However, the monoclonal antibodies for using in test kit was selected from elution peak only since it had higher specificity than washing peak. The purity of the 30 kD monoclonal antibodies was assessed by SDS-PAGE and revealed 28 kD light chain (Figure A.4) and the specificity of purified the monoclonal antibodies was also shown by Western-blotting analysis (Figure A.5).

A.2 การผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน 17 kD

การผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgG ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน 17 kD ได้มีอยู่ในรายงาน progress report No.1 (Appendix 1) ที่ได้ส่งให้ บริษัท BarrierMed แต่มอโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgM ซึ่งเหมาะกับการใช้ทำ agglutination test เท่านั้น จึงได้ปรับปรุง condition ในการฉีดหนูพร้อมทั้งพยายามเลือกหนูในชวอายุที่เหมาะสม แต่ก็ยังได้ มอโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะทั้ง 2 subclass (IgM, IgG) จึงเลือก clone ไปทำการ switching class เพื่อให้ได้ เป็น monoclonal ที่มีความจำเพาะกับ IgG เท่านั้น แต่ค่า titer ที่ได้ก็ไม่สูงมาก ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้:

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การฉีดกระตุ้นหนู

นำโปรตีน 17 kD บริสุทธิ์ที่ได้มีมากพอสำหรับความต้องการที่จะใช้ในกระบวนการทำ monoclonal antibody ซึ่งได้ นำไปฉีดหนู(หนูถีบจักรสายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8-9 สัปดาห์) โดยฉีดแอนติเจน ครั้งละประมาณ 10 ug ผสมกับ Freund's Adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 ตามตารางที่ A.12 เพื่อให้หนูสร้างแอนติบอดี

ตารางที่ A.12. แสดง condition การฉีดกระตุ้นหนูเพื่อผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน 17 kD

หนูเบอร์	แอนติเจนที่ใช้ฉีดครั้งที่1	ระยะเวลาที่ boost	แอนติเจนที่ใช้ฉีดครั้งที่ 2	ระยะเวลาที่ boost	แอนติเจนที่ใช้ฉีดครั้งที่ 3	ระยะเวลาที่ boost	แอนติเจนที่ใช้ฉีดครั้งที่4	ระยะเวลาที่ boost	แอนติเจนที่ใช้ฉีดครั้งที่5	ระยะเวลาที่ boost
1	CFA ผสมโปรตีน 17 kD (1:1v/v) 10 µg/ตัว	2 สัปดาห์	IFA ผสมโปรตีน 17 kD (1:1v/v) 10 µg/ตัว	2 สัปดาห์	เหมือนครั้งที่2	2 สัปดาห์	เหมือนครั้งที่2	2 สัปดาห์	เหมือนครั้งที่2	3 วัน

เพื่อจะได้นำเซลล์ม้ามของหนูที่ผ่านการฉีดแล้ว ไปใช้ขั้นตอนการทำไฮบริโดมาเซลล์ เพื่อทำการแยกโคลน ที่สามารถผลิตมอโนโคลนอลแอนติบอดี (Mab) ต่อโปรตีน 17 kD

b) การทำ limiting dilution

นำ hybridoma cell มาจากหลุมที่ได้ตรวจสอบแล้วว่าผลิต anti-ต่อโปรตีน 17 kD มานับเซลล์และทำให้เจือจางใน feeder cell suspension (เซลล์ม้ามจากหนู BALB/C ปกติเข้มข้น 10^6 cells/ml ของ H medium) โดยปรับให้มีความเข้มข้นของ hybridoma cell 0.5-1 เซลล์ต่อหลุมในปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วสังเกตดูหลุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีหนึ่งเซลล์เจริญเติบโตเป็นโมโนโคลนเซลล์ก็นำน้ำเลี้ยงมาตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน 17 kD

c) การตรวจหาความจำเพาะของชนิด Immunoglobulin ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 17 kD

การตรวจหาความจำเพาะของชนิด immunoglobulin ของโมโนโคลนเซลล์ที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน 17 kD ทำได้โดยเคลือบเพลทด้วยโปรตีน 17 kD 0.1 $\mu\text{g/ml}$ /หลุม อบที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้างหลุม แล้ว block หลุมด้วย 1% BSA อบที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้างหลุม เติมห่วงที่จะตรวจ อบที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้างหลุม เติมนิตของ Immunoglobulin อบที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้างหลุม แล้วเติม conjugate linked HRP อบที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้างหลุม เติม TMB substrate อบที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 %HCl อ่านค่า OD450 (ELISA)

d) การ switching class clone ดัง เพื่อผลิตเฉพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดี subclass IgG

การ switching class clone เพื่อผลิตเฉพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดี subclass IgG โดยมีขั้นตอนดังนี้

-เลี้ยง hybridoma cell ให้อยู่ในช่วง log phase จากนั้นทำการปั่นเก็บแล้วนับให้ได้จำนวนที่ต้องการ เติม 20 μl ของ anti – mouse IgM (0.5 mg/ml) บ่มที่ 37 °C 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นที่ 800 rpm ที่ 25 °C 10 นาที เติม 40 μl ของ Rabbit complement บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 90 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นที่ 800 rpm ที่ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้น resuspend ด้วย medium RPMI (10% FBS) 20 ml ทำการย้ายลงใน 96 wells plate (200ul/well) บ่มใน CO₂ incubator ประมาณ 14 วันเพื่อรอ check type ภายหลังจากการ switching class

ขั้นตอนการ check type ที่เทียบกันระหว่าง IgM กับ IgG ด้วยวิธี ELISA มีขั้นตอนดังนี้

-coat plate ด้วย Rabbit anti – mouse IgM และ Rabbit anti – mouse IgG บ่มที่ 37 °C 60 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติม 1% BSA บ่มที่ 37 °C 60 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมน้ำเลี้ยงเซลล์ 50 $\mu\text{l/well}$ บ่มที่ 37 °C 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติม conjugate anti – IgM, IgG 100 $\mu\text{l/well}$ บ่มที่ 37 °C 60 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง เติม substrate 100 $\mu\text{l/well}$ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เติม 1% HCl 100 $\mu\text{l/well}$ อ่าน OD. ที่ 450 nm

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการใช้ condition ในการฉีดกระตุ้นโปรตีน 17 kD ในสัตว์ทดลอง ผลของการเชื่อมเซลล์ม้ามกับ myeloma cell โดยวิธี hybridoma technology เพื่อให้ได้ hybrid clone ต่อ โปรตีน 17 kD ที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ ปรากฏว่าเกิด hybrid clone จำนวน 117 โคลน และมี hybrid clone จำนวน 2 โคลน (ตารางที่ A.13) ที่สามารถหลั่งสารต่อโปรตีน 17 kD ได้

ตารางที่ A.13. แสดงค่า OD 450 (ELISA) ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 17 kD

รหัสโคลน	OD450 (ELISA)
102	มากกว่า 4.00
17	มากกว่า 4.00

การตรวจสอบชนิดของ Immunoglobulin (subclass) ได้คัดเลือก monoclonal ที่มี titer สูงจำนวน 26 clone มาตรวจหา subclass ผลปรากฏว่า monoclonal ที่ได้ส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะต่อ IgM และมีความจำเพาะทั้ง 2 subclass (IgM, IgG) (ตารางที่ A.14,15) เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องเลือก clone ที่ได้นี้มาทำการ switching class เพื่อให้ได้ monoclonal ที่มีความจำเพาะกับ IgG เท่านั้น

ตารางที่ A.14. ผลการ Screening เพื่อ check titer ระหว่าง IgG (บน) เทียบกับ IgM (ล่าง) ของ clone 12F

IgG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.736	0.654	0.612	0.649	0.585	0.598	0.57	0.628	0.616	0.613	0.625	0.682
B	0.648	0.578	0.484	0.501	0.499	0.537	0.528	0.521	0.488	0.579	0.574	0.644
C	0.612	0.521	0.47	0.48	0.522	0.46	0.432	0.448	0.481	0.497	0.496	0.586
D	0.59	0.516	0.432	0.521	0.445	0.436	0.388	0.43	0.435	0.468	0.506	0.632
E	0.566	0.411	0.418	0.409	0.395	0.447	0.413	0.405	0.475	0.459	0.467	0.511
F	0.533	0.445	0.388	0.369	0.4	0.399	0.376	0.375	0.415	0.423	0.398	0.513
G	0.499	0.415	0.412	0.358	0.401	0.39	0.386	0.379	0.414	0.39	0.408	0.457
H	0.522	0.411	0.382	0.454	0.43	0.409	0.39	0.463	0.397	0.373	0.407	0.463

IgM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.886	1.705	1.793	1.84	1.65	1.776	1.683	1.77	1.661	1.598	1.713	1.619
B	1.706	1.602	1.564	1.542	1.48	1.617	1.549	1.507	1.477	1.53	1.568	1.64
C	1.611	1.438	1.422	1.533	1.488	1.42	1.295	1.374	1.354	1.447	1.344	1.468
D	1.515	1.436	1.241	1.447	1.291	1.355	1.165	1.281	1.392	1.352	1.362	1.429
E	1.471	1.113	1.207	1.223	1.166	1.69	1.192	1.218	1.261	1.336	0.085	1.318
F	1.3358	1.179	1.164	1.078	1.102	1.174	1.107	1.064	1.178	1.199	0.091	1.145
G	1.197	1.1	1.051	1.002	1.044	1.065	1.074	0.998	1.067	0.983	0.096	1.062
H	1.219	0.999	0.999	1.122	1.079	1.073	0.858	1.166	1.067	0.961	0.151	0.27

ตารางที่ A. 15 ผลการ screening เพื่อ check titer ระหว่าง IgG (บน) เทียบกับ IgM (ล่าง) ของ clone 11D

IgG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.756	0.732	0.595	0.628	0.589	0.618	0.628	0.629	0.635	0.648	0.678	0.781
B	0.631	0.565	0.512	0.478	0.483	0.527	0.541	0.471	0.499	0.519	0.517	0.660
C	0.622	0.553	0.471	0.469	0.474	0.449	0.500	0.449	0.487	0.498	0.548	0.677
D	0.502	0.514	0.455	0.482	0.414	0.419	0.454	0.453	0.494	0.532	0.539	0.669
E	0.519	0.522	0.424	0.406	0.374	0.358	0.371	0.404	0.442	0.499	0.512	0.627
F	0.449	0.438	0.372	0.394	0.348	0.342	0.359	0.391	0.423	0.420	0.453	0.563
G	0.459	0.403	0.367	0.390	0.358	0.352	0.423	0.381	0.370	0.400	0.417	0.480
H	0.489	0.459	0.409	0.386	0.433	0.378	0.386	0.395	0.392	0.394	0.418	0.453

IgM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.561	1.464	1.325	1.410	1.257	1.336	1.237	1.257	1.303	1.303	1.383	1.364
B	1.485	1.377	1.330	1.189	0.891	1.233	1.192	1.139	1.238	1.255	1.231	1.232
C	1.445	1.346	1.325	1.280	1.356	1.083	1.118	1.120	1.178	1.166	1.210	1.325
D	1.334	1.199	1.138	1.245	1.129	1.047	1.201	1.150	1.141	1.225	1.161	1.252
E	1.131	1.219	1.056	1.129	1.014	0.933	0.992	1.030	1.040	1.113	1.092	1.123
F	1.014	0.934	0.965	1.017	0.946	0.862	0.785	0.913	0.895	0.894	0.906	1.118
G	0.998	0.913	0.927	0.953	0.948	0.915	0.938	0.928	0.903	0.946	0.909	0.968
H	1.172	0.996	0.993	0.976	1.060	0.966	0.826	0.944	0.962	0.890	0.976	0.981

จากการ switching class ครั้งที่ 1 เทียบกับ ก่อนทำการ จะเห็นว่า Titer ของ IgM ยังสูงกว่า IgG ดังนั้นจะต้องมีการทำ switching class ต่อไปอีกอย่างน้อย 1-2 ครั้งซึ่ง ผลสุดท้ายได้คัดเลือกโมโนโคลนไ้วจำนวน 4 โคลน เพื่อให้ผลิต IgG ได้เพียง subclass เดียวโดยไม่มี titer ของ IgM เหลืออยู่เลย

A.3 การศึกษา cross-reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 30 kD ที่มีต่อโปรตีน 17 kD

เนื่องจาก โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 17 kD ที่ได้หลังการทำ class switching มีค่า titer ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษา cross-reaction ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 30 kD ว่ามีต่อโปรตีน 17 kD ด้วยหรือไม่ หากมี cross reactivity ก็จะสามารถใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 30 kD ในการตรวจจับโปรตีน 17 kD ด้วย ทำให้สะดวกและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นสำหรับใช้ในชุดทดสอบ

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษา cross-reaction โดยวิธี Indirect ELISA โดยนำโปรตีน 17 kD มาเคลือบเพลทที่ 0.1µg/หลุม อบที่ 4 °C 1 คืน ล้างเพลท 3 ครั้งด้วย PBS-T block หลุมด้วย 1% BSA อบที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้างเพลท 3 ครั้งด้วย PBS-T เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 30 kD คือ โคลนชื่อ C87 และ C131 โดยเริ่มเจือจางที่ 1:100 และทำการเจือจางไปเรื่อยๆ อบที่ 37°C 1 ชั่วโมง ล้างเพลท 3 ครั้งด้วย PBS-T เติม rabbit anti-mouse immunoglobulin linked HRP เจือจางที่ 1 ; 1000 อบที่ 37°C 1 ชั่วโมง ล้างเพลท 3 ครั้งด้วย PBS-T เติม TMB substrate อบที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 %HCl อ่านค่า OD ELISA 450

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการตรวจสอบการ cross-reaction พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 30 kD กับโปรตีน 17 kD ด้วยวิธี ELISA ผลปรากฏว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากรหัสโคลน C 17, 87 และ C131 สามารถ cross-react กับ โปรตีน 17 kD ได้ (ตารางที่ A.16) โดยระดับความจำเพาะรหัสโคลน 87>131>17 ตามลำดับ ดังนั้นเราน่าจะสามารถใช้โคลนเหล่านี้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะคู่ (dual specificities) ต่อทั้งโปรตีน 17 และ 30 kD เพื่อใช้ในชุดทดสอบ

ตารางที่ A. 16. ค่า ELISA OD₄₅₀ จาก a checkerboard titration ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ 30 kD จากโคลนรหัส 87 และ 131 และ ต่อ 17 kD จากโคลนรหัส 17 จากการทำเจือจาง serial 1:100 dilution

A	Blank										
B	0.069	0.068	0.066	0.061	0.062	0.058	0.058	0.067	0.061	0.059	0.061
C	0.072	0.063	0.062	0.071	0.066	0.057	0.061	0.064	0.058	0.066	0.062
D	0.083	0.074	0.065	0.057	0.065	0.055	0.057	0.064	0.059	0.063	0.060
E 87	OUT	OUT	OUT	OUT	2.954	1.542	1.100	0.487	0.375	0.191	0.208
F131	OUT	OUT	3.04	1.100	0.692	0.429	0.250	0.157	0.104	0.080	0.072
G17	OUT	3.829	2.851	1.342	0.76	0.386	0.216	0.153	0.101	0.074	0.069

OUT: OD₄₅₀ =, > 4.00

A.4 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อ โปรตีน 30 kD และ 17 kD จากโคลน C87 และ C131

จากผลการทดสอบ cross-reaction ที่พบว่ารหัสโคลน C87 และ C131 สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 30 kD ที่สามารถ cross react กับโปรตีน 17 kD ดังนั้นจึงได้ทำการเตรียมและทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนดังกล่าว พร้อมทั้งยืนยันปฏิกิริยา cross reaction ด้วยวิธี Western blot

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเพิ่มจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในช่องท้องหนู

การเพิ่มจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในช่องท้องหนูโดยทำโดย การเพิ่มจำนวน hybridoma cell ใน flask ให้ได้เซลล์ตามจำนวนที่ต้องการก่อนนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนู และ มีการฉีดกระตุ้นหนูด้วย Pristane ในการเตรียมช่องท้องเพื่อผลิต ascitic fluid ก่อนฉีด hybridoma cell ประมาณ 14 วัน จากนั้นก็ฉีด hybridoma cell ตามจำนวนที่เหมาะสม รอประมาณ 7-10 วัน จึงทำการเจาะช่องท้องหนูเพื่อเอา ascitic fluid มาทำการ purified ขึ้นต่อไป

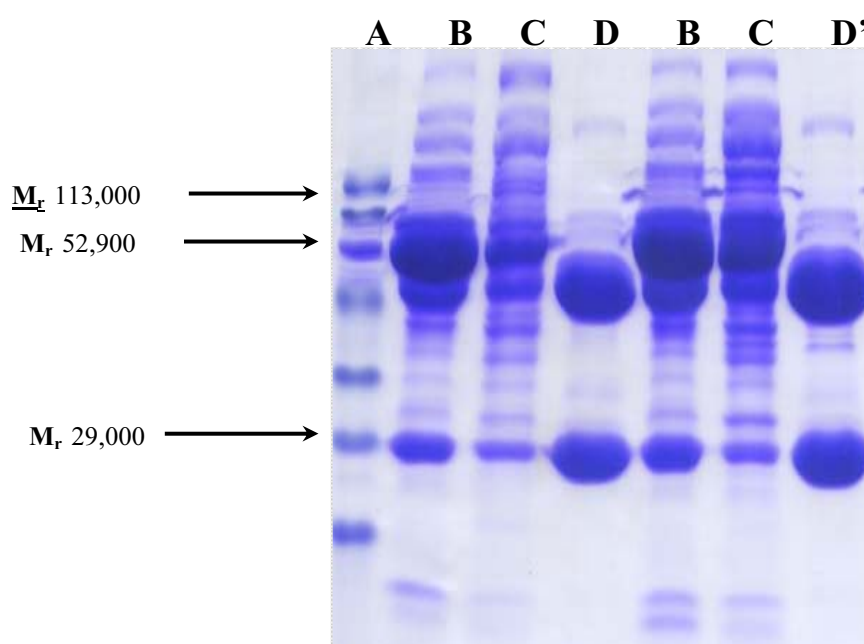
b) การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำน้ำที่เจาะจากช่องท้องหนู (ascitics fluid) ไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Protein A affinity chromatography เพื่อให้ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่บริสุทธิ์และมีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ผลิตชุดทดสอบต่อไป โดยขั้นตอนการทำให้เริ่มต้นที่นำ ascitics fluid ที่ได้มาตกตะกอนให้ได้ถึงจุดอิ่มตัวที่ 40% กับ แอมโมเนียมซัลเฟตที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นจึงนำไปปั่นเพื่อเก็บตะกอนโปรตีนที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำตะกอนที่ได้ไปละลาย

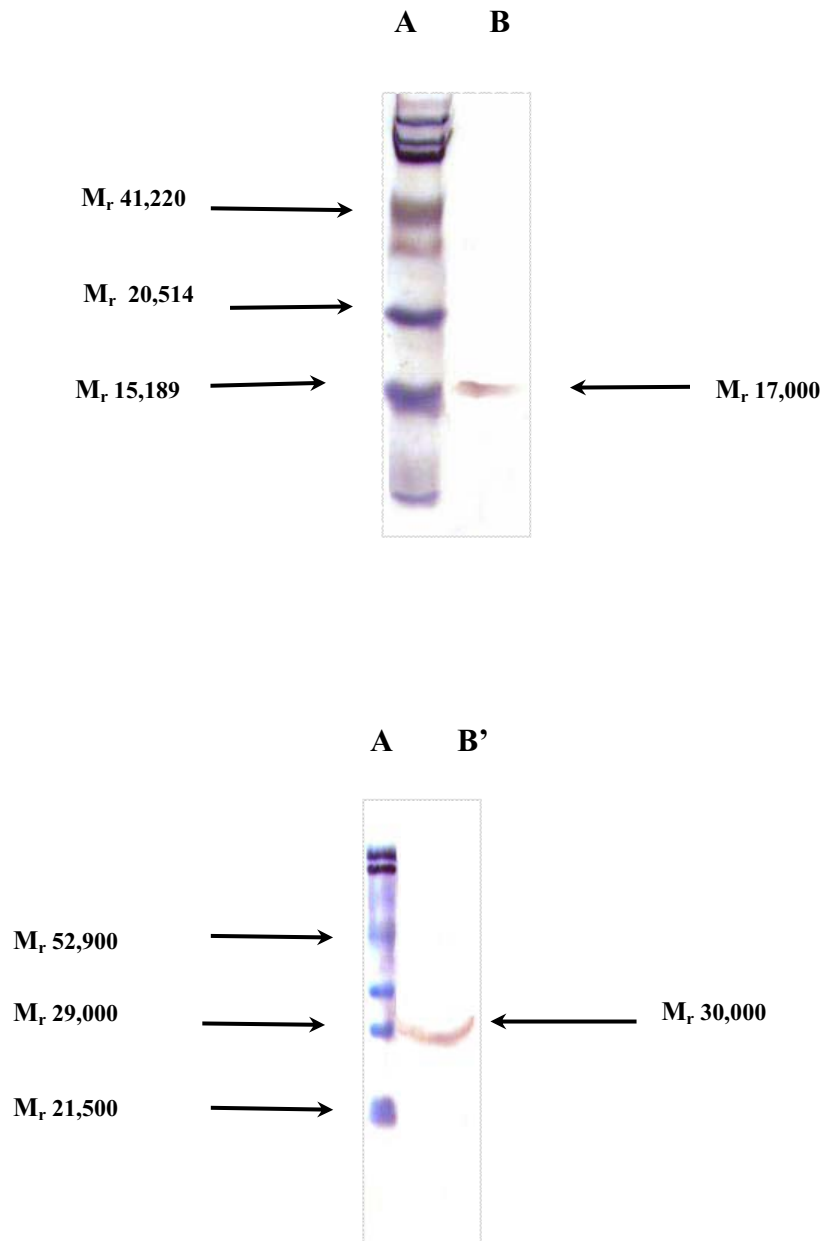
กับบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมและทำการ dialysis ก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ต่อไป โดยจะมีขั้นตอนการ equilibrate และ wash column ด้วย 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.0 และขั้นตอนการ elute โมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วย 0.1 M citrate buffer pH 3.0 จากนั้นจึงนำ fraction ที่เก็บจากการ elute ทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกันระหว่าง OD. protein ที่ 280 nm และ OD. ELISA ที่ 450 nm ก่อนที่จะนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นแล้วจึงวัดปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี Lowry

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

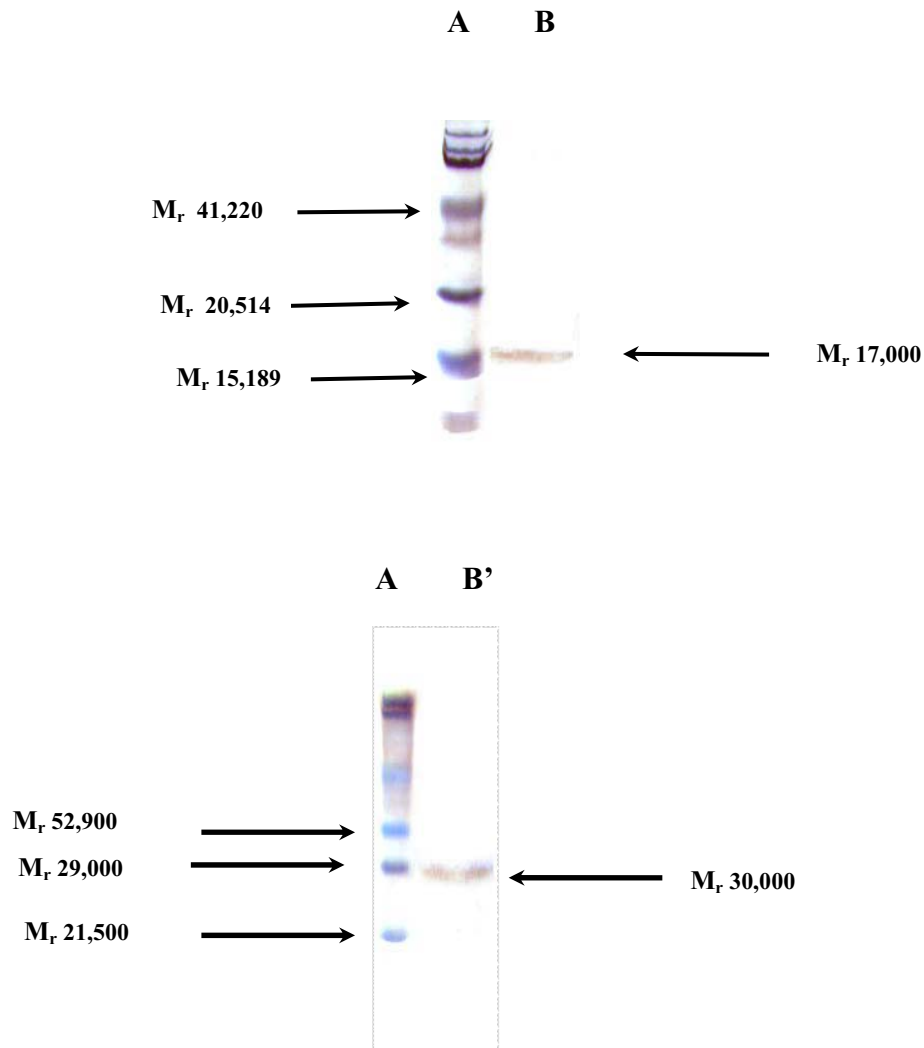
การเพิ่มจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในช่องท้องหนู ได้ปริมาณ ascitic fluid ปริมาณ 30 และ 35 ml จากหนูชุดละ 10 ตัว ที่ฉีดด้วยโคลน 87 และ 131 ตามลำดับ ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ได้โมโนโคลนอลบริสุทธิ์ปริมาณ 6.42 และ 32 mg/ml หรือ 0.1926 และ 4.192 ตามลำดับ โดยสามารถยืนยันความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวได้จากแถบโปรตีน 28 kD Kappa light chain (รูปที่ A.6) โดยจากการศึกษาคุณสมบัติความจำเพาะของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลน 87 และ 131 ต่อโปรตีน 30 kD และ 17 kD โดยวิธี Western blot (รูปที่ A.7-8) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนมีความจำเพาะต่อทั้งโปรตีน 17 และ 30 kD



รูปที่ A.6 SDS-PAGE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography A: แถบโปรตีนมาตรฐาน (ดอลตัน) ขนาด low range (BIO-RAD); B: น้ำช่องท้องหนูซึ่งประกอบด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโปรตีนอื่นๆ; C: โปรตีนที่ไม่ได้จับกับ Protein A ในการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์; D, D': โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ที่ได้จากโคลน 87 และ 131 ตามลำดับ.



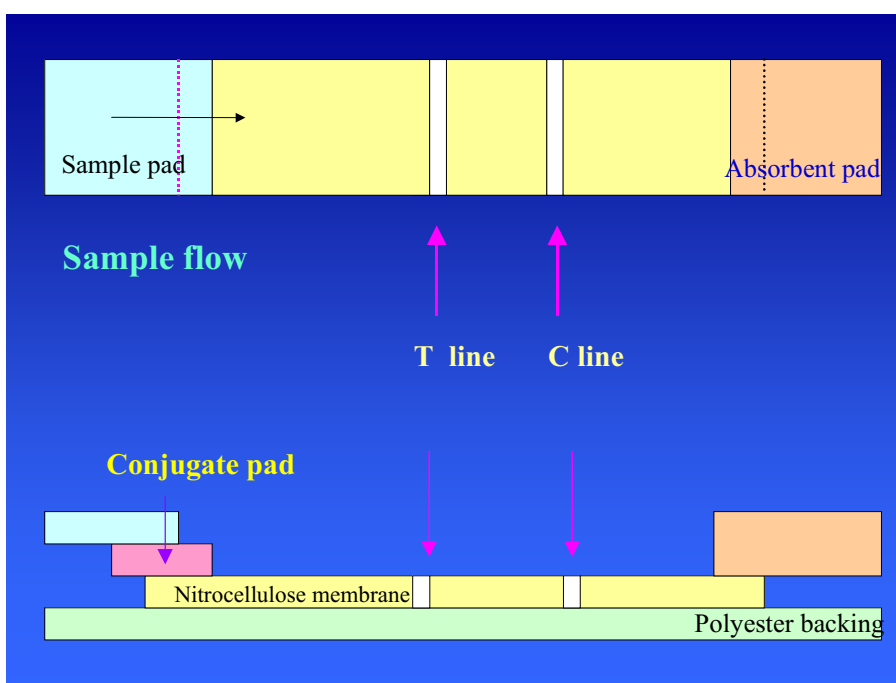
รูปที่ A.7. ผลการวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ (โคลน 87) ต่อโปรตีนแอนติเจน 17 และ 30 kD โดยวิธี Western-Blot. A: แถบโปรตีนมาตรฐาน (तालतन)ขนาด low range (BIO-RAD); B, B': โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ ซึ่งทำปฏิกิริยากับโปรตีน 17 และ 30 kD ตามลำดับ



รูปที่ A.8. ผลการวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบิสซูธิ์ (โคลน 131) ต่อโปรตีนแอนติเจน 17 และ 30 kD โดยวิธี Western-Blot. A: แถบโปรตีนมาตรฐาน (ดัลตัน) ขนาด low range (BIO-RAD); B, B': โมโนโคลนอลแอนติบอดีบิสซูธิ์ ซึ่งทำปฏิกิริยากับโปรตีน 17 และ 30 kD ตามลำดับ

A.5 การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติชนิดรวดเร็วโดยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟ

วิธีการตรวจวินิจฉัยโปรตีนโดยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟ จัดเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นชนิดรวดเร็วที่สามารถอ่านผลการตรวจได้ภายใน 10 นาที โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของตัวอย่างผ่านส่วนต่าง ๆ ของ Membrane และทำให้เกิดปฏิกิริยาของแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่างกับแอนติบอดีที่อยู่บน membrane ทำให้เห็นแถบสีตามชนิดของสารที่ label กับแอนติบอดี ชุดตรวจประกอบด้วย membrane ชนิดต่าง ๆ ดังรูปที่ A.9



รูปที่ A. 9 ภาพแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของชุดตรวจวินิจฉัยโปรตีน

ส่วนประกอบต่าง ๆ ตามรูปที่ A.9 ประกอบด้วย Sample pad (SP) เป็นส่วนที่รับตัวอย่าง, Conjugate pad (CP) เป็นส่วนที่พ่นด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจและติดฉลากด้วย colloidal gold (conjugate), ส่วนที่แสดงผลการตรวจ คือ nitrocellulose membrane ซึ่งจะตรึงด้วยแอนติบอดี 2 ชนิด คือ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจบริเวณ Test line (T) และส่วนควบคุม Control line (C) ซึ่งส่วนมากจะใช้ anti-mouse Ig เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็น conjugate และส่วนสุดท้ายคือ Wick หรือ

Absorbent pad เป็นส่วนที่ซึมซับตัวอย่างหรือของเหลวที่ไหลจาก SP และทำให้ตัวอย่างไหลไปบน membrane ได้อย่างต่อเนื่อง ส่วนต่าง ๆ เหล่านี้ประกอบอยู่ในตลับพลาสติก (cassette housing) เมื่อหยอดตัวอย่างลงในส่วนรับตัวอย่างของตลับพลาสติก (sample well) ซึ่งเป็นบริเวณ SP ตัวอย่างจะไหลผ่าน CP ถ้าในตัวอย่างมีโปรตีนที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ใน CP จะเกิดปฏิกิริยาของแอนติเจน-แอนติบอดี (Ag-Ab gold conjugate) และเมื่อของเหลวไหลผ่าน membrane บริเวณ T จะเกิดปฏิกิริยาของ Ab-Ag-Ab gold conjugate อีกครั้ง ทำให้เห็นแถบสีของ gold บริเวณนี้ เมื่อตัวอย่างไหลผ่านบริเวณ C ต่อไปจะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง anti-mouse Ig และ Ab gold conjugate ทำให้เห็นแถบสีบริเวณ C ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ ดังนั้น เมื่อทำการทดสอบแล้วเห็นแถบสี 2 แถบบริเวณ T และ C แสดงว่า ในตัวอย่างมีโปรตีนที่ต้องการตรวจ และถ้าเห็นแถบสี 1 แถบบริเวณ C แสดงว่าในตัวอย่างไม่มีโปรตีนที่ต้องการตรวจ

อุปกรณ์และวิธีการ

- a) การศึกษาพัฒนาารูปแบบมาตรฐานของชุดตรวจวินิจฉัยประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้
 - a.1) การติดฉลากโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วย colloidal gold (MAb-gold conjugate)

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาผสมกับสารละลาย gold colloid ที่มี pH 8.0 ในอัตราส่วน 5 ug ต่อ gold colloid 1 ml. ที่ Optical density (OD) เท่ากับ 1 ผสมกันด้วย roller หรือ vortex นาน 20 นาที จากนั้นเติม 10% BSA ให้มีความเข้มข้นในสารละลาย gold เท่ากับ 1% ผสมกันต่อไปอีก 20 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 rpm นาน 20 นาที ส่วนใสทิ้งไป และเก็บส่วนตะกอนของ gold ไว้ และปรับความเข้มข้นของ Ab-gold conjugate ให้มี OD ตามที่ต้องการ เช่น 10, 20 และ 30 OD เป็นต้น ด้วย storage buffer จากนั้นนำไปพ่นบน conjugate release pad (CRP) ปริมาณ 10 μ l /cm. อบให้แห้งที่ 40°C นาน 30 นาที และเก็บไว้ในถุงฟอยล์ที่มีสารดูดความชื้นบรรจุอยู่
 - a.2) การตรึงแอนติบอดีบน nitrocellulose membrane

ปรับความเข้มข้นของ MAb และ anti-mouse Ig ใน phosphate buffer ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml และนำไปพ่นลงบน nitrocellulose membrane ที่ปริมาณ 1 μ l /cm. โดยพ่น MAb ที่ตำแหน่ง Test line (T) และพ่น anti-mouse Ig ที่ตำแหน่ง Control line (C) จากนั้นนำไปบ่มให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C นาน 30 นาที และเก็บไว้ในถุงฟอยล์ที่มีสารดูดความชื้นบรรจุอยู่
 - a.3) การประกอบชุดทดสอบ

นำส่วนต่าง ๆ ของชุดทดสอบได้แก่ Wicking pad, SP และ CP ที่พ่นด้วย Ab-gold conjugate และ nitrocellulose membrane ที่ตรึงด้วย Ab แปะทับบน backing ตามตำแหน่งที่แสดงในรูปที่ 1 จากนั้น ตัดให้มีขนาด 4 มม. ด้วยเครื่องตัด และนำชิ้นส่วนที่ตัดได้ประกอบใน

ดัลป์พลาสติก จะได้ชุดทดสอบที่พร้อมจะนำไปทดสอบได้ ชุดทดสอบที่ยังไม่ได้ใช้ให้เก็บในถุงพอย์ปิดสนิทที่บรรจุสารดูดความชื้น

b) การสกัดโปรตีนจากผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ

b.1) การสกัด soluble (hydrophilic) protein

นำถุงมือมาตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 5X5 ซม. แล้วตัดแบ่งครึ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ 16 ชิ้นเท่ากัน ปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ จากนั้นเติม 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 ลงไป 50 ml. เขย่าเป็นเวลา 2 ชม. เมื่อครบเวลาจะได้น้ำสกัดเพื่อนำไปตรวจวินิจฉัยโปรตีนต่อไป

b.2) การสกัด insoluble(hydrophobic) protein

นำถุงมือมาตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 5X5 ซม. แล้วตัดแบ่งครึ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ 16 ชิ้นเท่ากัน ปริมาณ 5 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ เติมคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 2 : 1 ปริมาณ 50 มล. ลงไปและปิดปากบีกเกอร์ให้สนิท ทิ้งไว้ 14 ชม. จากนั้นระเหย คลอโรฟอร์ม : เมทานอลให้แห้ง และเติม 50 mM Tris-HCl pH 7.4 ลงไป 50 ml. เขย่าเป็นเวลา 2 ชม. เมื่อครบเวลาจะได้น้ำสกัดเพื่อนำไปตรวจวินิจฉัยโปรตีนต่อไป

c) การปรับหรือหาความเข้มข้นของ MAb ที่ใช้เป็น Test line

ปรับความเข้มข้นของ MAb ใน phosphate buffer ให้มีความเข้มข้น 1 และ 2 mg/ml และนำไปพ่นลงบน nitrocellulose membrane ที่ปริมาณ 1 μ l/cm. โดยพ่น MAb ที่ตำแหน่ง Test line (T) และพ่น Anti-mouse Ig 1 mg/ml ที่ตำแหน่ง Control line (C) จากนั้นนำไปบ่มให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C นาน 30 นาที และประกอบเป็นชุดทดสอบรวมกับการหา OD ของ Ab-gold conjugate ที่เหมาะสม

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

สำหรับรูปแบบในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยในเบื้องต้นได้นำ MAb clone 131 ซึ่งจำเพาะทั้งโปรตีนขนาด 30 kD และ 17 kD เตรียมเป็น test line ที่ตรึงอยู่บน nitrocellulose membrane นำไปประกอบเป็นชุดทดสอบและศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ร่วมกับการสกัดถุงมือนายก B ซึ่งใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการสกัดโปรตีนในถุงมือนายก ปรากฏว่า ผลที่ได้จากใช้สารสกัด hydrophilic protein ในการทดสอบกับชุดทดสอบที่เตรียมขึ้นมา พบว่า ชุดทดสอบไม่สามารถตรวจพบโปรตีนในของเหลวที่สกัดได้ แต่เมื่อใช้การสกัด hydrophobic protein ในการทดสอบกับชุดทดสอบที่เตรียมขึ้นมา พบว่า สามารถตรวจพบโปรตีนในในถุงมือที่สกัดได้จำนวน 4 จาก 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ A.17)โดยพบเข้มของแถบสีที่ตำแหน่ง T มากสุดในถุงมือ L4 มากกว่า L1, L3 และ L5 (ตารางที่ A.17) ทั้งนี้หลังจากได้มีการปรับเปลี่ยนเวลา (ตารางที่ A.18) และปริมาณตัวอย่างถุงมือ(ตารางที่ A.19) ที่ใช้ในการสกัด และ ความเข้มข้นของ conjugate (ตารางที่ A.20) ให้เหมาะสมรวมทั้ง บัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายโปรตีนหลังจากระเหย เมทานอล : คลอโรฟอร์ม แล้ว (ตารางที่ A.21)

ซึ่งโดยสรุป วิธีการสกัดตัวอย่างจากถุงมือยางธรรมชาติที่เหมาะสมในขณะนี้คือ ตัดชิ้นถุงมือยางให้มีขนาดเล็ก ๆ ปริมาณ 2 กรัม สกัดใน methanol : chloroform ปริมาตร 10 ml ใน Falcon tube ขนาด 15 มล. ที่เวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกชิ้นส่วนถุงมือออกจากส่วนของเหลวด้วยผ้าก๊อช ระเหยของเหลวใน petri dish ขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิ 60°C ใน water bath ให้แห้งสนิท จากนั้นละลายกลับด้วยบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 1 มล. โดยเขย่านาน 30 นาที นำของเหลวที่ได้ไปปั่นที่ 5,000 rpm นาน 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 100 μ l หยดลงไปใน sample well ของชุดทดสอบ รอผลประมาณ 10 นาทีจึงบันทึกผล ผลการทดสอบอ่านผลเป็น บวก ลบ โดยตัวอย่างตัวอย่างที่ให้ผลลบจะเห็น 1 แถบสีม่วงอมชมพูที่ C และตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็นแถบสีชมพูม่วง 2 แถบ ที่ตำแหน่ง C และ T (รูปที่ A.10) ส่วนการปรับหรือหาความเข้มข้นของ MAb ที่ใช้เป็น Test lineจากผลการทดสอบร่วมกันระหว่าง OD ของ conjugate และปริมาณ Ab ที่ตำแหน่ง test line พบว่า 10 OD เหมาะสมที่จะนำไปผลิตชุดทดสอบรวมกับการตรึง Ab ที่ Test line ปริมาณ 2 mg/ml โดยไม่ทำให้เกิด nonspecific binding กับบัฟเฟอร์ A และให้ผลการทดสอบที่ดีกับบัฟเฟอร์ A ละลายโปรตีนจากถุงมือยาง (ตารางที่ A.22)

ตารางที่ A.18 ผลการทำ innunochromatography กับสารสกัดจากตัวอย่างถุงมือยางต่างๆ

Natural rubber gloves	Result with IC test
L1	+
L2	-
L3	+
L4	++
L5	+

ตารางที่ A.18 ผลของระยะเวลาต่างๆที่ใช้สกัดตัวอย่างจากถุงมือยางธรรมชาติ

เวลาที่ใช้สกัดถุงมือ	ผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบแบบ IC
30 นาที	+ +
60 นาที	+ +
90 นาที	+ +
120 นาที	+ +
14 ชั่วโมง	+ + +
Control (บัฟเฟอร์ A)	-

หมายเหตุ : + หมายถึงผลบวก; จำนวน + ที่มากขึ้น หมายถึงความเข้มที่มากขึ้นของแถบสีที่ test line
 - หมายถึงผลการทดสอบเป็นลบ ไม่ปรากฏแถบสีที่ test line

ตารางที่ A.19 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณถุงมือ ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายโปรตีนหลังจาก
 ระเหยแห้ง

ปริมาณถุงมือ	อุณหภูมิที่ใช้ระเหยแห้ง	บัฟเฟอร์ A ที่ใช้ละลาย	ผลการทดสอบ
5 กรัม	60°C in water bath	1.0 ml	+ ++
2 กรัม	60°C in water bath	0.5 ml	+ ++
2 กรัม	60°C in water bath	1.0 ml	+ +
1 กรัม	60°C in water bath	1.0 ml	-

หมายเหตุ : การระเหย chloroform : methanol จะระเหยใน chemical hood โดยนำ water bath
 ใส่ใน chemical hood

ตารางที่ A.20 ผลของความเข้มข้นของ conjugate (OD) และปริมาณ Ab ที่ตำแหน่ง Test line ต่อการเกิด nonspecific binding และผลการตรวจตัวอย่าง

OD of conjugate	Concentration of Ab at test line	ทดสอบกับบัฟเฟอร์ A	ผลการละลายโปรตีนจากถุงมืออย่างด้วยบัฟเฟอร์ A
10	2 mg/ml	-	++
20	2 mg/ml	+	++
30	2 mg/ml	+	++
30	1 mg/ml	ND	+

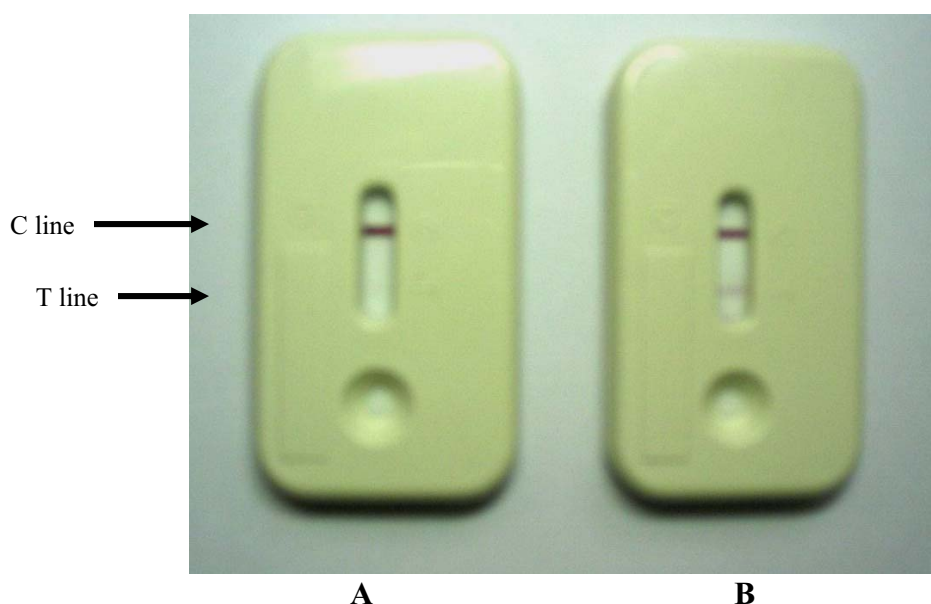
ND = ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ A.21 ผลของบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้ละลายโปรตีนที่สกัดจากถุงมืออย่างธรรมชาติ

ชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลาย	ผลการนำบัฟเฟอร์ไปทดสอบกับชุดทดสอบ (control)	ผลการทดสอบโปรตีนที่ละลายกับด้วยบัฟเฟอร์ที่ปริมาตรต่าง ๆ	
		1 ml	2 ml
Phosphate buffer saline, pH 7.4	+	++	+
50 mM Tris-HCl, pH 7.4	++	++	+
บัฟเฟอร์ A	-	++	+

หมายเหตุ : + = ผลบวก โดยจำนวน + ที่เพิ่มขึ้นแสดงความเข้มของแถบสีที่ T line

- = ผลลบ



รูปที่ A.10. ผลการทำ immunochromatography (IC) โดยใช้ buffer A (A) และ สารสกัดจากถุงมือยาง ที่ละลายใน buffer A (B)

จากผลที่ได้จะเห็นว่าชุดทดสอบที่พัฒนาได้ยังไม่สมบูรณ์นัก จึงมีข้อเสนอแนะแนวทางการพัฒนาและวิจัยรูปแบบของชุดทดสอบที่จะพัฒนาเป็นการค้าเพิ่มเติมดังต่อไปนี้

- การวิจัยที่ได้กระทำในเบื้องต้นมีวัตถุประสงค์หลักคือทำให้สามารถตรวจโปรตีนที่สกัดจากถุงมือยางได้ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการพัฒนาแบบของการสกัดมากกว่าการพัฒนาส่วนประกอบของ immunochromatographic (IC) strip ซึ่งมีปัจจัยจำกัดในการพัฒนาในเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาต่อไปจะมุ่งเน้นไปที่การพัฒนารายละเอียดของ IC strip ดังนี้

- นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตแล้ว เตรียมเป็น conjugate และ Test line และตรวจดูความเหมาะสมของ แอนติบอดีต่อการเป็น conjugate หรือ Test line โดยทำ checker board

- ศึกษาผลของ nitrocellulose membrane ชนิดต่าง ๆ ต่อความไว และความจำเพาะในการตรวจตัวอย่างจากสารสกัด

- ศึกษาผลของการบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับเตรียม SAP เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจตัวอย่าง

- ศึกษาผลของ surfactant ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการละลายโปรตีนกลับคืนหลังจาก

ระเหยแห้ง โดยเตรียมอยู่ในรูปของบัฟเฟอร์ และช่วยเพิ่มความไว ในการตรวจโปรตีนที่ต้องการ

-ศึกษาผลของการบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับเตรียม CRP เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะในการ ตรวจตัวอย่าง

-ทำการประเมินคุณภาพชุดทดสอบโดยทดสอบกับถุงมือยางธรรมชาติที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

-รูปแบบของชุดตรวจวินิจฉัยโปรตีนเบื้องต้นที่จะพัฒนาเป็นการค้านั้นประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ชุดตรวจวินิจฉัยที่บรรจุอยู่ในซองพร้อมสารดูดความชื้น และบัฟเฟอร์ A ที่ใช้ละลายโปรตีนที่สกัดจากถุงมือยางหลังจากกระเหย คลอโรฟอร์ม :เมทานอล แล้ว ทั้งสองส่วนนี้อาจบรรจุอยู่ในซองเดียวกัน ถ้ามีวิธีการบรรจุของเหลวปริมาณน้อย ๆ ประมาณ 1.5 ml ในภาชนะที่ปิดสนิท หรืออาจบรรจุบัฟเฟอร์ในขวดที่สามารถใช้กับชุดทดสอบประมาณ 20 test เป็นต้น

A.6 การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้พัฒนาเป็น ELISA kit ตรวจหาโปรตีน 17 kD และ 30 kD

เนื่องจากการนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มาพัฒนาเป็น ELISA kit เพื่อตรวจหา 17 kD และ 30 kD จะมีประโยชน์อย่างมากกับผู้ประกอบการ เพื่อประเมินปริมาณของโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ทั้งในวัตถุดิบน้ำยางข้นที่จะนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์ถุงมือยางและในถุงมือที่ผลิตได้ ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลประกอบคุณสมบัติของสินค้าและสำหรับการปรับปรุงคุณภาพของสินค้า

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ ELISA เพื่อหาโปรตีน 17 และ/หรือ 30 kD ในผลิตภัณฑ์ยาง

a.1) ทำการเคลือบเพลทโดยด้วย 0.1,0.5,1.0, μg / 100ul coating buffer/well ของโมโนโคลนอล แอนติบอดีซึ่งมีความจำเพาะต่อทั้ง 17 และ 30 kD บ่มที่ 4 °C 1 คืนหลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T 3ครั้ง เติม blocking solution (สูตรที่1:0.5% casein in PBS-T, สูตรที่ 2:3% skim milk in PBS-T หรือ สูตรที่3: 1% BSA in PBS-T) ทำการแยกเติมแต่ละสูตรโดยการเติมหลุมละ 200 ul หลังจากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง เติมตัวอย่างตรวจ 100 ul บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง (ทำ negative sample, positive sampleซึ่งทราบผลแล้ว และ reagent blank) แยกเติม conjugate ซึ่งเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งมีความจำเพาะต่อทั้ง 17 , 30 kDa linked HRP (direct ELISA) บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมงหลังจากนั้นล้างด้วย PBS-T 5 ครั้งครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติม TMB substrate จำนวน 100 μl /well เก็บที่มีอุณหภูมิห้อง 30 นาที เติม 1% HCl จำนวน 100 μl แล้วทำการวัดค่า OD 450 จากนั้นทำการสรุปขั้นตอนการศึกษาแล้วทำการตรวจตัวอย่างซึ่งทำการสกัดด้วย 25 ml ต่อปริมาณตัวอย่าง 5 กรัม

b) การพัฒนาชุดทดสอบตรวจหาโปรตีน 17 และ 30 kD ในตัวอย่างถุงมือน้อยโดยวิธี ELISA

b.1) การเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์จำพวกถุงมือน้อย สามารถสกัดใน PBS (phosphate buffer saline) โดยการตัดตัวอย่าง ถุงมือน้อยเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปชั่ง 5 กรัม เติมน้ำ PBS 25 ml แช่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแล้ว บีบเอาเฉพาะ ส่วนใสเพื่อนำมาตรวจหาโปรตีน 17 และ 30 kD

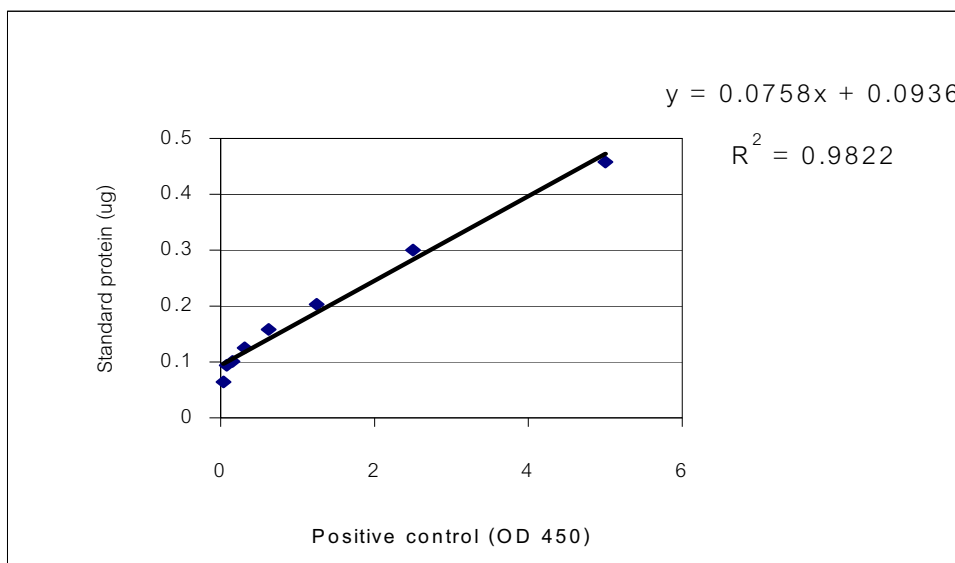
b.2) ขั้นตอนการตรวจหาโปรตีน 17 และ 30 kD โดยวิธี ELISA จากการศึกษาลักษณะที่เหมาะสมสำหรับหาโปรตีน 17 และ 30 kD ผลข้างต้นโดยใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 0.1 $\mu\text{g}/100 \text{ ul/well}$ ในการเคลือบเพลท บ่มที่ 4 °C 1 คืน ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS-T และใช้ 1 % BSA in PBS-T เป็น blocking solution 200 μl /well บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS-T เติมตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง ละ 100 μl /หลุม และ negative control (PBS-T) และ positive control (standard protein 17 หรือ 30 kD แล้วแต่ต้องการหาตัวไหน) เจือจางใน PBS-T บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS-T เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 17 และ 30 kD linked HRP ที่เจือจาง ที่ 1 : 1500 ใน PBS-T บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง ล้าง 5 ครั้ง ด้วย PBS-T ครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติม TMB substrate 100 μl /หลุม บ่มที่ มีด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา เติมน้ำ 1% HCl 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ แล้วทำการวัด OD 450

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

พบว่าวิธี ELISA ซึ่งให้ผลดีในการตรวจ คือ direct ELISA โดยใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 0.1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ /well ในการเคลือบเพลท และใช้ 1 % BSA in PBS-T เป็น blocking solution ในส่วนของ conjugate เป็น โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 17 และ 30 kD linked HRP ที่เจือจางที่ 1 : 1500 ใน PBS-T (ตารางที่ A.22) จากการนำค่า ELISA OD 450 ของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับค่า OD 450 ของ โปรตีนมาตรฐาน 30 kD (positive control) ที่สร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (รูปที่ A.11) ก็สามารถหาปริมาณโปรตีน 30 kD ในตัวอย่างถุงมือน้อยธรรมชาติทั้ง 8 ตัวอย่างได้ ซึ่งพบว่ามีค่าระหว่าง 0.3-33.63 μg โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 12.71 μg (ตารางที่ A.23)

ตารางที่ A.22 ผลการค่าเชื้อจาก conjugate ที่เหมาะสม ภายใต้ condition ต่างๆ

	1:500	1:1000	1:1500	1:2000	1:2500	1:3000
Blank	0	0	0	0	0	0
Negative control (PBS-T)	0.298	0.157	0.094	0.049	0.041	0.041
Negative control (PBS-T)	0.257	0.167	0.088	0.048	0.031	0.037
50 mM Tris –HCl pH7.4	0.294	0.158	0.097	0.01	0.058	0.058
50 mM Tris –HCl pH7.4	0.33	0.152	0.119	0.038	0.038	0.048
Positive control 30 kD	2.46	1.475	1.053	1.109	0.639	0.577



รูปที่ A.11 กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ โปรตีน 30 kD (positive control) และ ELISA OD₄₅₀

ตารางที่ A. 23 ปริมาณโปรตีน 30 kD ที่มีอยู่ในถุงมืออย่างตัวอย่างต่างๆ

Glove extract #	ELISA OD450	30 kD content (μg)
1	0.214	1.58
2	0.049	0.58
3	0.438	4.54
4	3.006	38
5	1.641	20
6	0.328	3.092
7	2.643	33.63
8	0.069	0.3

B. โครงการย่อย 2

การโคลนนิ่งแสดงออก และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ตัวใหม่จากยางพารา

ปัจจุบันหลายประเทศทั้งในยุโรปและอเมริกา ได้ตระหนักถึงอันตรายจากอาการแพ้ที่เกิดจากโปรตีนในน้ำยางพาราที่ใช้ในการผลิตวัสดุภัณฑ์ต่างๆ โดยผู้แพ้จะมีอาการแพ้แบบเฉียบพลัน (type I) ซึ่งมีบางรายที่อาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต เนื่องจากโปรตีนของน้ำยางพารามีเป็นร้อยๆ ชนิด แต่ปัจจุบันได้มีผู้รายงานการค้นพบโปรตีนที่สามารถทำให้เกิดอาการแพ้แล้ว 13 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงตั้งแต่ 5-115 kD โปรตีนดังกล่าวได้แก่ Hev b1 (Rubber elongation factor); Hev b2 (β -1,3 Glucanase); Hev b3 (Small rubber particle protein); Hev b4 (Microhelix component); Hev b5 (Acidic latex protein); Hev b6.01 (Prehevein); Hev b6.02 (Mature hevein); Hev b6.03 (C-domain of prohevein); Hev b7 (Patin-like protein); Hev b8 (Latex profilin); Hev b9 (latex enolase); Hev b10 (Manganese superoxide dismutase); Hev b 11 (class I endochitinase), Hev b12 (lipid transfer protein) Hev b 13 (latex esterase) ในจำนวนโปรตีนที่ได้มีการรายงานแล้วว่าทำให้เกิดการแพ้นั้น มีเพียง Hev b1 และ Hev b3 ที่เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ และเคลือบอยู่บนผิวของอนุภาคยาง

โดยปัจจุบันยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ใดๆ ทางคลินิกที่ให้ผลแม่นยำ 100% เพื่อวินิจฉัยว่าผู้ป่วยมีการแพ้โปรตีนจากยางหรือไม่ วิธีที่เสี่ยงมากที่สุดแต่ดีที่สุดและได้ผลแม่นยำในระดับ 95% และ 99% คือการทำ skin prick test โดยใช้สารละลายโปรตีนที่เตรียมจากน้ำยางสดที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับสำหรับการ prick ลงบนผิวหนังของผู้ที่แพ้โดยตรง โดยเมื่อเร็วๆ (J. Allergy and Clin. Immuno.109, 2002) ได้มีการนำชุด allergens ผสม 8 ชนิด ที่ทำบริสุทธิ์จากน้ำยางสด ซึ่งประกอบด้วย Hev b1, 2, 3, 4, 6, 7b และ 7c กับ allergen Hev b5 ซึ่งเตรียมจากการทำ cloning ความเข้มข้นช่วง .001 ถึง .01 mg/ml ไปทดสอบโดยการทำ skin prick test เพื่อดูความไว (sensitivity) กับบุคลากรทางการแพทย์ที่แพ้โปรตีนจากยางจำนวน 62 คน ปรากฏว่าได้ ความแม่นยำเพียง 91.9 % โดยพบความถี่ ของ IgE reactivity ต่อ allergen Hev b5 เท่ากับ 65% (สูงสุด), Hev b2 , 63%; Hev b3, 24% ; Hev b4, 39%, Hev b7, 45% และ Hev b1, 23% (ต่ำสุด) จากผลของค่า sensitivity ที่ได้ น่าจะชี้ให้เห็นว่ายังมี allergen ตัวสำคัญอื่นอีกที่ยังขาดอยู่และต้องค้นหาต่อไปเพื่อให้ได้ค่า sensitivity ที่สูงขึ้น

หากมองจากสภาพธรรมชาติของโมเลกุลของตัวโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ เราสามารถแบ่งโปรตีนดังกล่าวออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ละลายน้ำ หรือ ใช้น้ำล้างออกได้ กับ ชนิดที่ไม่ละลาย หรือ ใช้น้ำล้างไม่ออก จะเห็นว่าในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ยางของผู้ประกอบการ จะสามารถกำจัดเฉพาะโปรตีนชนิดที่ละลายน้ำได้ เป็นส่วนใหญ่เท่านั้น จากความรู้พื้นฐานที่ได้ทำการศึกษาวิจัยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดการกระตุ้นของท่อน้ำยาง ผู้วิจัยและคณะได้พบว่าในน้ำยางพารามีโปรตีนอยู่กลุ่มหนึ่งที่ไม่ละลายน้ำ และเป็นส่วนประกอบของ rubber coagulum ซึ่งได้แก่กลุ่มเมมเบรนโปรตีนของอนุภาคยางและอนุภาคกันหลุด(อนุภาค

ทอยด์) ที่ทำหน้าที่เป็นก้อนอุดตันในท่อน้ำยาง (Wititsuwannakul et al 2008, Appendix...) โปรตีนดังกล่าวจะปนอยู่กับเนื้อยางหรือผลิตภัณฑ์ยาง และยากที่จะกำจัดออกโดยการล้างด้วยน้ำ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการค้นหาโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ตัวใหม่จากยางพาราจากกลุ่มของเมมเบรนโปรตีนที่เตรียมมาจากอนุภาคกันหลุด (bottom fraction membrane, BFM)

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมเมมเบรนโปรตีนจากน้ำยางสด

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆ (โดยการใช้ภาชนะแช่น้ำแข็งช่วยในการเก็บน้ำยาง เพื่อป้องกันการแตกของอนุภาคลวทอยด์) ไปแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge (45,000g , 45 min) เพื่อแยกน้ำยางออกเป็นชั้นบนที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง ชั้นกลางหรือส่วนใสของ cytosol (C-serum) และ ชั้นกันหลุด (bottom fraction, BF) นำชั้นกันหลุดที่ประกอบไปด้วยอนุภาค (luotid และ Frey Wyssling) ที่มีเมมเบรนห่อหุ้ม ไปขจัดโปรตีนปนเปื้อนโดยการล้างด้วย isotonic buffer ทำการสลายอนุภาคของ BF ด้วยการ Freeze-thaw แช่หลายครั้งที่อุณหภูมิ -20°C สลับกับอุณหภูมิห้อง ปั่นแยกส่วนของเหลวที่ได้ (B-serum) ออกจากส่วนของ BF membrane (BFM) ขจัดโปรตีนปนเปื้อนออกจาก BFM โดยการล้างด้วย isotonic buffer ทำการสกัดโปรตีนไม่ละลายน้ำออกจาก BFM ด้วย Tris-buffer ที่มี 0.2 % Triton X-100

b) การทำ allergen specific IgE และ IgG ELISA assay

นำละลายแอนติเจนที่เป็นโปรตีน BMF (10 $\mu\text{g/ml}$) ปริมาตร 50 μl ไป coat ลงบน หลุม microplate ทำการอบ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการล้างแอนติเจนส่วนที่ไม่จับกับหลุม หรือที่เหลืออกโดยการล้าง plate จำนวน 5 ครั้งด้วย บัฟเฟอร์ล้าง PBS-T (0.05% tween 20/PBS, pH 7.2) ทำการ block microplate ด้วย 2% skim milk ที่ละลายใน PBS-T อบ ที่ 37°C , 2 ชม และ ล้าง microplate 3 ครั้งด้วย PBS-T ต่อไปเติมตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจสอบไป หลุม ละ 50 μl (diluted 1:5 ด้วย 2% skim milk/PBS) โดยอบที่ 37°C , 1 ชม. ตามด้วยการล้าง microplate 5 ครั้งด้วย PBS-T เติม HRP labeled antihuman IgE หรือ HRP labeled antihuman IgG แล้วแต่กรณี ทำการอบที่ 37°C , 1 ชม. แล้วล้าง microplate 4 ครั้งด้วย PBS-T ตามด้วยการ substrate 3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine (TMB) แล้วอบในที่มืดที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วหยุด ปฏิกิริยาด้วยการเติม 100 μl ของ 1N HCl และนำไปวัดสีที่เกิดขึ้นที่ 450 nm ด้วย เครื่อง microplate reader

c) การหา immunoreactive allergen โดยอาศัย co-immunoprecipitation

การหา immunoreactive allergen จาก BFM โดยอาศัยเทคนิค co-immunoprecipitation สามารถเริ่มต้นโดยการติดฉลาก BFM ด้วย biotin หรือ การทำ biotinylation ของโปรตีน BFM เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอน co-immunoprecipitation ทำโดยการนำ BFM โปรตีนไปปฏิกิริยากับสารละลาย biotin reagent (10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin) ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยการแช่น้ำแข็ง ทำการกำจัด biotin reagent ส่วนเกินออกโดยการล้างด้วย

บัฟเฟอร์ PBS-M pH 7.4 (0.14 M NaCl, 8 mM sodium phosphate, 2 mM potassium phosphate และ 0.01 M KCl)

การทำ co-immunoprecipitation ทำโดยใช้ Seize X Immunoprecipitation Kit (Pierce Biotechnology) นำ Seize X Protein A gel ไปเชื่อมกับ IgG_{2a} subclass monoclonal antibody (mAb) ต่อ human Fcε (Biodesign International, Saco, ME) โดยอาศัย disuccinimidyl suberate (DSS) cross-linker โดยการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วยการล้าง 5 ครั้ง หลังจากนั้นทำการเติมซีรัม (350 µl) ลงไปบน anti-human Fcε mAb conjugated protein A bead ทำการล้าง 5 ครั้ง แล้วตามด้วยการเติมโปรตีน biotinylated BFM แล้วทำการบ่มด้วยการหมุนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ทำการล้าง 5 ครั้งแล้วทำการชะ immuno-preipitated proteins ออกจาก protein A bead โดยการใช้น้ำบัฟเฟอร์ pH 2.8 แล้วนำไปแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE (15%) ถ่ายโปรตีนดังกล่าว ลงในแผ่นเมมเบรน PDVF แล้ว blocked บริเวณที่ว่างบนแผ่นเมมเบรนด้วย 5% skim milk/PBS ที่ 4°C ซ้ำคืน แล้วนำบ่มกับ HRP-conjugated streptavidin เพื่อให้สามารถมองเห็น biotinylated BFM proteins ด้วยเทคนิค chemiluminescence ด้วยระบบ ECL western blotting analysis ตามด้วยการ exposed กับ Kodak X-ray film

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

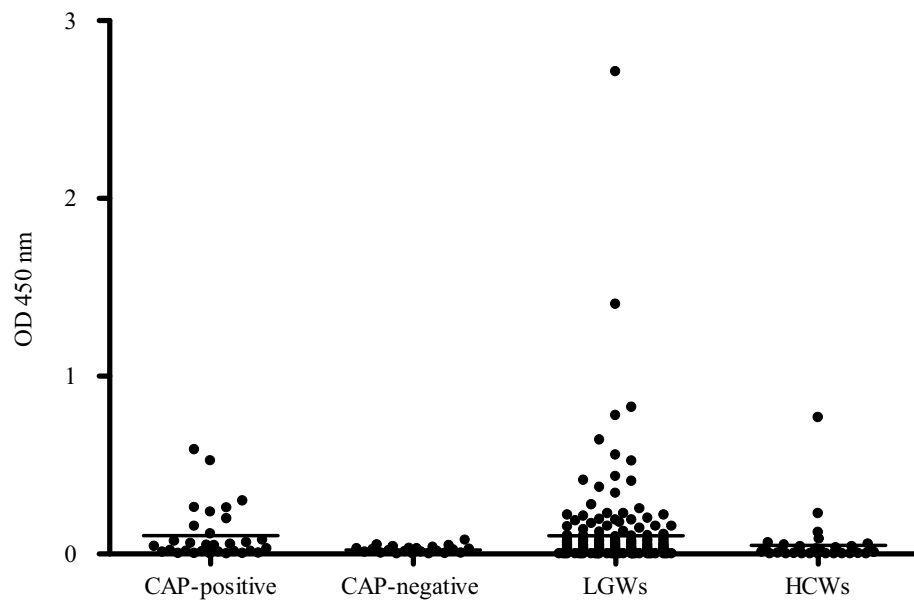
ค่า BFM specific IgE จากการใช้กลุ่มเลือดตัวอย่างจากคน 4 กลุ่ม (รูปที่ B.1) พบว่าค่าเฉลี่ย allergen specific IgE จากตัวอย่างซีรัมเลือดคนงานโรงงานถุงมือยาง (Latex glove worker, LGW) จำนวน 170 คนเท่ากับ 0.10 ± 0.26 OD โดยมีคนงานเพียง 38 คนที่มีค่า BFM specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ย สำหรับค่าเฉลี่ย BMF specific IgE ของเลือดตัวอย่างจากกลุ่ม CAP⁺ พบว่ามีระดับใกล้เคียงกับกลุ่มคนงานโรงงานถุงมือยาง โดยมีคนในกลุ่ม CAP⁺ จำนวน 9 คนที่มีค่า BFM specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ย ในขณะที่กลุ่ม CAP⁻ มี 11 จาก 22 คนที่มีค่า BMF specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ย (0.02 ± 0.02 OD) และกลุ่มบุคลากรบริการด้านสุขภาพ (HCW) มี 7 จาก 35 คนที่มีค่า BFM specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ย (0.04 ± 0.13 OD) หากใช้เกณฑ์ 0.06 OD ซึ่งได้มาจากค่าเฉลี่ย + 2 SD ของกลุ่ม CAP⁻ ($0.02 + 0.07 = 0.09$) ในการตัดสินใจตัดสิน จำนวนตัวอย่างที่น่าจะให้ผลบวกหรือมี IgE ต่อ BMF allergen น่าจะมีจำนวน 56, 11, 1 และ 5 คน จากกลุ่ม LGW, CAP⁺, CAP⁻ และ HCWs ตามลำดับ ค่า BFM specific IgE สูงสุด 3 อันดับแรกได้แก่ ซีรัมหมายเลข 4, 248 และ 253 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.71, 1.40 และ 0.78 OD ตามลำดับ นอกจากนั้นค่า BFM specific IgG จากการใช้กลุ่มเลือดตัวอย่างจากคน 4 กลุ่ม (รูปที่ B.2) พบว่ามีค่าเฉลี่ย BFM specific IgG ในกลุ่ม LGW, CAP⁺, CAP⁻ และ HCWs เท่ากับ 0.20 ± 0.34 , 0.09 ± 0.13 , 0.02 ± 0.04 และ 0.03 ± 0.04 OD ตามลำดับ จำนวนตัวอย่างที่น่าจะให้ผลบวกหรือมี IgG ต่อ BMF น่าจะมีจำนวน 50, 9, 7 และ 15 คน จากกลุ่ม LGW, CAP⁺, CAP⁻ และ HCWs ตามลำดับ หากใช้เกณฑ์การตัดสินทำนองเดียวจากค่าเฉลี่ย SD ที่ได้จากกลุ่ม CAP⁻

จะเห็นได้ว่าคนกลุ่ม LGW มี IgE และ IgG ต่อ BFM สูงกว่าคนกลุ่มอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลุ่ม LGW มีโอกาสสัมผัสกับ BFM ซึ่งอยู่น้ำยางและผลิตภัณฑ์ถุงมือยางที่ผลิตออกมาใหม่ๆ ได้มากกว่ากลุ่มอื่นๆ

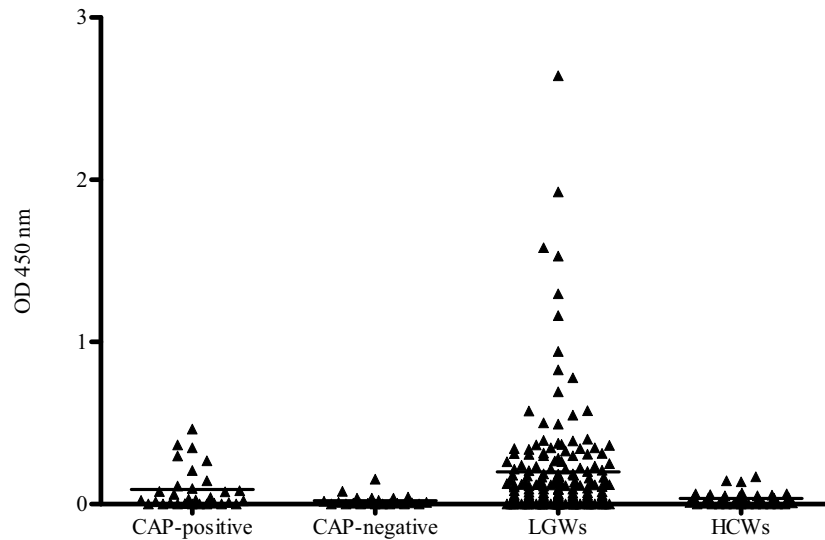
นอกจากนี้จาก plot แบบ scatter format (รูปที่ B.3) พบว่าค่า correlation ระหว่าง BFM specific IgE และ IgG ระหว่างซีรั่มหมายเลข 4, 248 และ 253 มีระดับสูงสุด และโดยค่า OD สำหรับ specific IgG เท่ากับ 2.64, 1.16 และ 1.53 ตามลำดับ (ตารางที่ B.1) โดยที่ LGW หมายเลข 4 เท่านั้นที่พบว่ามีอาการแพ้โปรตีนจากยาง และผลจากการทำ skin prick test ก็เป็นลบทั้งหมด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าระดับ IgG มีอิทธิพลต่อการตอบสนองต่อการแพ้ หาก Fc γ RIIB ไปรวมเกาะกลุ่มหรือ co-aggregated กับ Fc ϵ RI เนื่องจากการเกิด allergen cross-linking โดยอาศัย IgG และ IgE อาการที่เกี่ยวข้องกับ por-allergenic signal ก็จะมีหมดไป (Kraft et al, 2006)

จากการหา immunoreactive allergen โดยใช้เทคนิค co-immunoprecipitation เป็นเทคนิคที่นิยมทำกันเพราะ สภาพธรรมชาติของ epitopes ของ allergen จะยังคงอยู่ทั้งหมด ซึ่งไม่เหมือนการทำ immunoblot ที่มีการสูญเสียสภาพธรรมชาติของ epitopes ร่วมด้วย โดยเมื่อใช้ซีรั่มจาก LGW หมายเลข 4 พบว่า โปรตีน BFM ขนาด 55 kD เป็น IgE reactive allergen (รูปที่ B.4 A) โดยโปรตีน BFM ดังกล่าวมีปริมาณอยู่น้อยมากไม่สามารถย้อมหรือมองเห็นแถบโปรตีนได้จากการทำ SDS-PAGE (รูปที่ B.4 B) แต่เมื่อใช้ซีรั่มจาก CAP⁺ หมายเลข P1396 ก็ไม่พบว่า BFM โปรตีน 55 kD เป็น immunoreactive allergen ทั้งๆที่ซีรั่ม CAP⁺ จะมีระดับ IgE ที่สูง (รูปที่ B.4 A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในชุดทดสอบ CAP ยังขาดโปรตีน 55 kD ซึ่งหากเพิ่มโปรตีนตัวนี้ลงไปด้วยในชุดทดสอบ ด้วยก็จะทำให้สามารถวินิจฉัยการแพ้โปรตีนจากยางพาราได้แม่นยำขึ้น

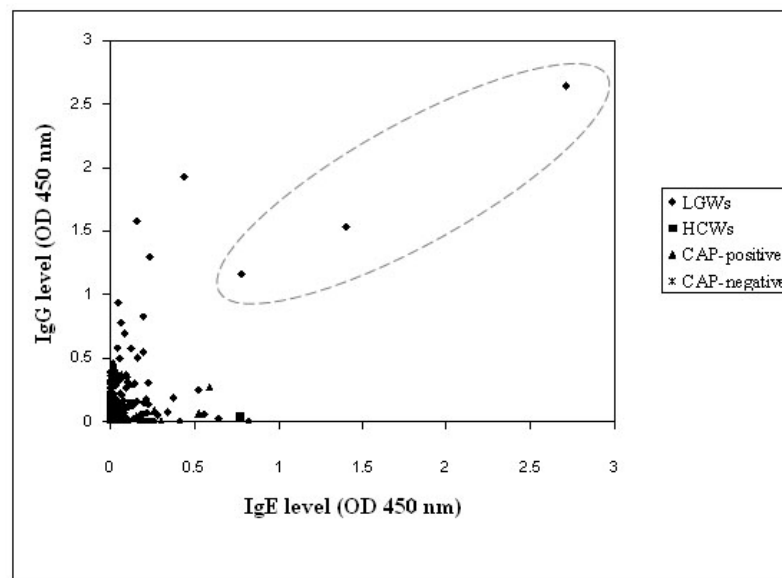
ถึงแม้โปรตีน BFM ขนาด 55 kD มีขนาดใกล้เคียงกับ Hev b 4 (50-57 kD) แต่ Hev b 4 เป็น latex allergen ชนิดที่ละลายน้ำได้ดีโดยอยู่ใน B-serum ดังนั้นโปรตีน BFM ขนาด 55 kD จึงน่าจะเป็นโปรตีนไม่ละลายน้ำชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดการแพ้ ซึ่งยังต้องทำการยืนยันโดยเทคนิคทางการโคลนนิ่งและแสดงออกต่อไป แต่เนื่องจากปริมาณโปรตีน 55 kD มีอยู่น้อยมากใน BFM ผู้วิจัยได้พยายามทำบริสุทธิ์โปรตีน 55 kD เพื่อนำไปหาลำดับกรดอะมิโนเพื่อนำไปใช้สร้าง primer สำหรับโคลนนิ่ง แต่ก็ไม่สามารถทำได้สำเร็จ



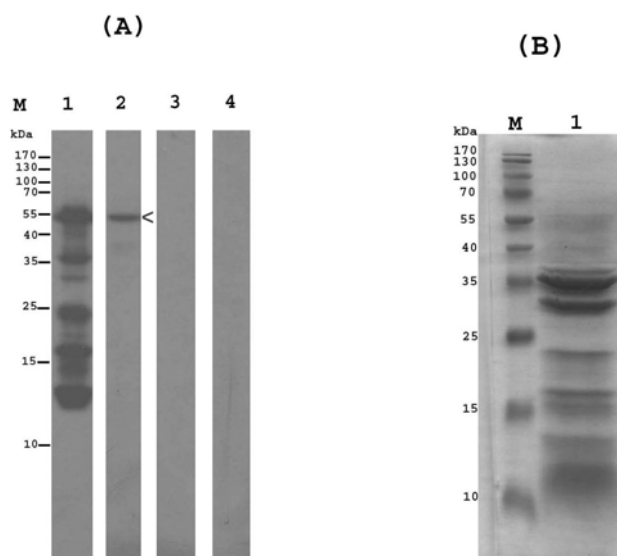
รูปที่ B.1 Relative comparison of specific IgE level from 31 CAP⁺, 22 CAP⁻, 170 LGW and 35 HCW samples by indirect ELISA. Each data point represents the specific IgE level in relation to the absorbance value at OD 450 nm. Solid horizontal lines represent the means of individual categories. These data are representative of three independent experiments. (Mengumpun et al, 2008, Appendix 3)



รูปที่ B.2 The IgG level from 31 CAP⁺, 22 CAP⁻, 170 LGW and 35 HCW samples was assayed by indirect ELISA. Solid horizontal lines represent the means of individual categories. These data are the representative of three independent experiments. (Mengumpun et al, 2008, Appendix 3)



รูปที่ B.2 Correlation of specific IgE and IgG levels obtained from indirect ELISA (Fig B.1 and B.2, respectively). Each data point represents an individual sample from 31 CAP⁺, 22 CAP⁻, 170 LGW and 35 HCW groups. LGWs no. 4, 248, 253 are shown in the ellipse area. (Mengumpun et al, 2008, Appendix 3)



รูปที่ B.4. Identification of immunoreactive allergen by co-immunoprecipitation assay (A). Protein mixtures of biotinylated BFM proteins are shown in lane 1. Fractions collected from incubation with LGW sample no. 4, CAP⁺ sample no. P1396 and CAP⁻ sample no. P2136 are shown in lanes 2, 3, and 4. Whole protein extract is shown by Coomassie Blue R250 staining in polyacrylamide gel under denaturing condition (B). BFM proteins were shown in lane. (Mengumpun et al, 2008, Appendix 3)

References:

- Kraft S, Novak N. (2006) Fc receptors as determinants of allergic reactions. Trends in Immunology 27: 88-95.
- Mengumpun, K., Yayapiwatana, C., Hamilton, R.G., Sangsupawanich, P., Wititsuwannakul, R. (2008) Identification of a novel hydrophobic allergen from *Hevea brasiliensis* bottom fraction membrane. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology (final revision resubmitted).

C. โครงการย่อย 3

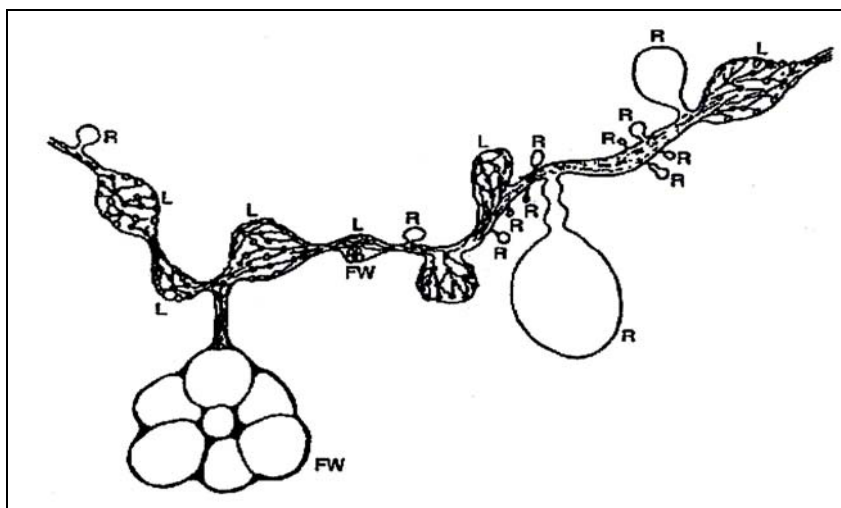
การศึกษาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยาง

ถึงแม้ว่าได้มีการศึกษาเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยางธรรมชาติ มาเป็นระยะเวลากว่า 50 ปีแล้ว ตั้งแต่ปี คศ. 1950 แต่ความรู้ที่ได้ ก็ยังห่างไกลจากความสมบูรณ์อยู่มาก ปัจจุบันยังไม่เป็นที่รู้ชัดว่ามี โปรตีนใดบ้าง ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำชีวสังเคราะห์ยาง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรตีนดังกล่าวมักเป็น hydrophobic protein หรือ อยู่กับเมมเบรน ซึ่งยากแก่การทำบริสุทธิ์ ด้วยวิธีมาตรฐานทางชีวเคมีทั่วไป นักวิทยาศาสตร์ปัจจุบันจึงพยายามแก้ปัญหาดังกล่าว โดยอาศัย เทคนิคทาง proteomics และ genomics เข้าช่วย อย่างไรก็ตาม การที่จะใช้ประโยชน์สูงสุด จากผลงานวิจัยที่ได้ จำเป็นต้องอาศัยหลักความรู้พื้นฐานทางด้านกระบวนการชีวสังเคราะห์ยาง ธรรมชาติเป็นเกณฑ์

พอลิเมอร์ยางธรรมชาติประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น *cis*-isoprene เกือบทั้งหมด โดยขั้นตอนเริ่มแรก (initiation) ของการทำชีวสังเคราะห์ยางจะมีการใช้ allylic diphosphate เป็น priming co-substrate แล้วตามด้วยขั้นตอน elongation หรือ prenyl chain extension เพื่อการ สร้างเป็นพอลิเมอร์ยาง (Archer and Audley, 1987; Madhavan et al., 1989; Cornish and Backhaus, 1990). การสังเคราะห์ allylic prenyl diphosphates จะต้องอาศัยเอนไซม์ *trans*-prenyl transferase ซึ่งได้พบเอนไซม์ดังกล่าวมีอยู่ทั้งในส่วนของอนุภาคกันหลอดและส่วนของ C-serum ที่ได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสด (Tangpakdee et al., 1997; Wititsuwannakul and Wititsuwannakul, 2001) และได้พบว่ากิจกรรมการสังเคราะห์ยางจะสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย allylic diphosphates ที่มีความยาวจาก C₅-C₂₀ โดยยิ่งยาวยิ่งกระตุ้นได้ดีขึ้น เช่น C₅ < C₁₀ < C₁₅ < C₂₀ (Archer and Audley, 1987). ซึ่งต่อมากการศึกษาโดยอาศัยเทคนิคทาง ¹³C-NMR พบว่ากลุ่มหน่วยย่อยไอโซพรีนที่ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้น (initiating species) ในการต่อเติมหน่วยย่อย IPP แบบ *cis* addition ไปเรื่อยๆ จนเป็น rubber polymer (*cis*-1,4-polyisoprene) เป็น *trans*-allylic diphosphate จำพวก farnesyl pyrophosphate (Tanaka et al., 1996). ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบว่อนุภาคยางเป็นแหล่งที่สร้าง initiating species ด้วยหรือไม่ มีการควบคุมการสร้าง initiating species พร้อมทั้งความยาวของพอลิเมอร์ยาง อย่างไร

คณะผู้วิจัยได้พบว่าของอนุภาคกันหลอด (ซึ่งไม่ใช่จากอนุภาคยาง) (Wititsuwannakul et al., 2003) และเมมเบรนของอนุภาคกันหลอด (Wititsuwannakul et al., 2004, Appendix 4) ที่สามารถเตรียมได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge ก็มีประสิทธิภาพในการสร้างพอลิเมอร์ยางเช่นกัน จึงทำให้คาดว่ารายงานการศึกษาชีวสังเคราะห์ยางบนอนุภาคยางที่มีมาในอดีตนั้น เป็นการศึกษาบนอนุภาคยางบริสุทธิ์จริงๆ หรือเป็นอนุภาคยางที่ปนเปื้อนด้วยเมมเบรนโปรตีนจากอนุภาคกันหลอดที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ยาง ที่หลุดออกไปหรือคายเมมเบรนร่วงแห ซึ่งได้มีการสาธิตไว้เป็นภาพวาด (ดั่งรูปด้านล่าง) โดย Southorn (1961) โดยจะเห็นได้ว่าอนุภาคในน้ำยางที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง (rubber) อนุภาคลูทอยด์

(lutoid) และ อนุภาค เฟรวิสลิ่ง (Frey Wysling) นั้นในสภาพธรรมชาติในท่อน้ำยาง จะ เชื่อมโยงกันเป็นเครือข่ายร่างแห (reticulum) แขนงลอยอยู่ในส่วนของของเหลว (cytosol) ในน้ำ ยาง แรงเหวี่ยงของเครื่อง ultracentrifuge ทำให้น้ำยางสดที่นำมาศึกษามีการสูญเสียความ เสถียรของเครือข่ายเมมเบรนร่างแหดังกล่าว นอกจากนั้นSouthorn (1961)ยังได้สันนิษฐานไว้ว่า เครือข่ายร่างแหเหล่านี้ น่าจะเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่สร้างพอลิเมอร์ยาง



รูป C.1 รูปสารถึงถึงความเป็นไปได้ของการเชื่อมโยงของอนุภาคต่างๆในท่อน้ำยาง โดย Southorn , 1961

เมื่อทำการแยกน้ำยางสด โดยการปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 49,000g นาน 45 นาที อนุภาคต่างๆที่ประกอบเป็นเครือข่ายร่างแหจะถูกแรงเหวี่ยงแยกออกจากกัน โดย อนุภาคยางจะลอยขึ้นไปอยู่ชั้นบนสุดโดยบริเวณใต้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟรวิสลิ่งเกาะติดอยู่ด้วย เล็กน้อย ส่วนใหญ่ของอนุภาคลูทอยด์และเฟรวิสลิ่งจะถูกเหวี่ยงไปอยู่บริเวณก้นหลอด ดังนั้นการ ค้นพบถึงประสิทธิภาพของอนุภาคกันหลุด ในการทำชีวสังเคราะห์ยางโดยคณะผู้วิจัย [Wititsuwannakul et al., 2003, Wititsuwannakul et al, 2004 (Appendix4) ; Rattanapittayaporn et al.2004 (Appendix5)] จึงเป็นการเสริมข้อสันนิษฐานของ Southorn (1961)

การศึกษาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยางในรายงานนี้ จึงเป็นการศึกษา ต่อเนื่องจากที่เคยทำไว้ โดยจะทำการวิเคราะห์ขนาดของพอลิเมอร์ยางที่สร้างโดยอนุภาคต่างๆ ของร่างแหเมมเบรน พร้อมทั้ง จะศึกษาหาคุณสมบัติของอนุภาค เฟรวิสลิ่งซึ่งเป็นสมาชิกของ เครือข่ายร่างแหเพิ่มเติม เพราะในอดีตแถบไม่มีข้อมูลการศึกษาก่อน

C.1) ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดของพอลิเมอร์อย่างสังเคราะห์โดยเมมเบรนโปรตีนของอนุภาคต่าง ๆ ในเครือข่ายร่างแห

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมและล้างอนุภาคกันหลุด

นำน้ำยางสดที่กรีดจากต้นยางพันธุ์ RRIM600 โดยรองรับด้วยภาชนะที่แช่ไว้ในน้ำแข็ง ไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 49,000g เป็นเวลา 40 นาที น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นบนสุดเป็นชั้นของอนุภาคยาง ชั้นกลางเป็นของเหลวใส cytosol (C-serum) และชั้นล่างสุดเป็นส่วนของอนุภาคกันหลุด (bottom fraction, BF) แยกเอาส่วนของ BF ไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] ที่ผสมด้วย 0.9% NaCl (w/v) จำนวน 3 ครั้ง และแยกส่วนของ BF ที่ผ่านการล้างสะอาดแล้ว (washed bottom particles, WBP) ด้วยการปั่นแยกที่ 4500g เป็นเวลา 30 นาที เก็บไว้ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง

b) การเตรียมเมมเบรนจากอนุภาคกันหลุด

นำ WBP หรืออนุภาคกันหลุดที่ผ่านการล้างแล้วไปทำให้แตกโดยไปผสมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 3 เท่าแล้วกวนโดยใช้เครื่องกวน แยกส่วนของเมมเบรนออกโดยการปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 4500g นาน 60 นาที แล้วทำการล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] ที่ผสมด้วย 0.9% NaCl (w/v) เก็บส่วนของเมมเบรนที่ผ่านการล้าง (washed bottom membrane, WBM) เก็บไว้ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง

c) การเตรียมและล้างอนุภาคยาง

แยกเอาส่วนของอนุภาคยางขนาดเล็ก หรือบริเวณ Zone 2 ตามที่ Moir (1950) ได้อธิบายไว้ หลังการปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 49,000g เป็นเวลา 40 นาที นำไปล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] ปริมาตร 5 เท่า นำอนุภาคยางที่ผ่านการล้าง (washed rubber particle, WRP) เก็บไว้ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง

d) การวิเคราะห์ปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง

Assay mixture ของปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยางประกอบด้วยสับเตรท IDP , allylic diphosphate initiator $^{14}\text{C-IDP}$, $^3\text{H-FPP}$ หรือ $^{14}\text{C-UPP}$,เมมเบรนโปรตีนจาก WRP หรือ WBM โดยผสมอยู่ใน บัฟเฟอร์ (50 mM Tris-HCl, pH7.7) ตามรายละเอียดที่บ่งกำกับไว้ได้รูป หรือตาราง พร้อมด้วย reagents เริ่มปฏิกิริยา (30 mM KF, 5 mM MgCl_2 และ 10 mM DTT) และมีการเติม 20 mM EDTA ลงในปฏิกิริยาควบคุม โดยจะทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำแข็ง ก่อนนำไปสกัด radiolabeled rubber

e) การวิเคราะห์ radiolabeled rubber ที่ได้จากปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง

ทำการตกตะกอน radiolabeled rubber ($^3\text{H-rubber}$ หรือ $^{14}\text{C-rubber}$) ที่ได้จากปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง โดยการเติมเอทานอลลงไป ใน assay mixture แล้วปั่นแยกตะกอนที่ 12000g นาน 45 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายในสารละลาย hexane:toluene (1:1) แล้วปั่นแยก

เอาส่วนที่ละลาย ไประเหยเพื่อลดปริมาตรลงแล้วตกตะกอน radiolabeled rubber บริสุทธิ์ ด้วยอะซิโตนหรือเอทานอล นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน toluene ปริมาตร 150 μl ทำบริสุทธิ์ radiolabeled rubber ด้วยการตกผลึก ด้วยอะซิโตนแห้งเย็นปริมาตร 750 μl จำนวน 3 ครั้ง นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน toluene ซึ่งบรรจุอยู่ในขวด scintillation แล้วนำไปใส่ในเครื่อง scintillation counter เพื่อวิเคราะห์คำนวณหาปริมาณสารรังสีของ radiolabeled rubber ที่ได้ต่อไป

f) การทำชีวสังเคราะห์ยางโดย WRP ต่อจาก ^{14}C -UPP Rubber ที่สร้างโดย WBM

นำ 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7 (37,650 cpm) ที่สร้างจาก ^{14}C -UPP โดย WBM ไป incubate กับ WRP ในบัฟเฟอร์ (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7) ปริมาตร 200 μl ที่ประกอบด้วย 40 mM DOC, 5 mM MgCl_2 , 10 mM DTT และ 1 mM IPP ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่น้ำแข็ง และทำการแยก ^{14}C -rubber ดังรายละเอียดที่กล่าวในข้างต้น

g) การวิเคราะห์ molecular weight distribution (MWD) ของ ^{14}C -rubber

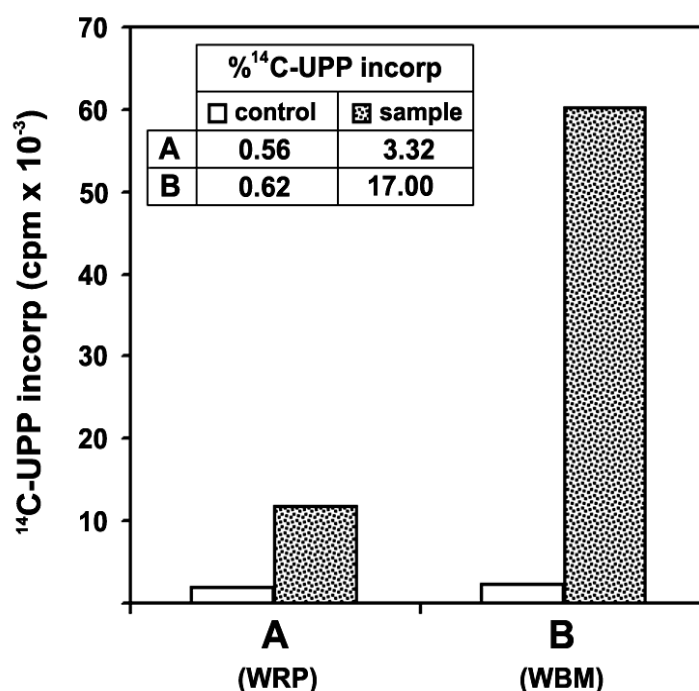
นำสารละลายใส tetrahydrofuran (THF) ที่มี ^{14}C -rubber บริสุทธิ์ละลายอยู่ไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel permeation chromatography (GPC) โดยใช้ซีรีของคอลัมน์ TSK gel (Tosho) ที่ต่อเนื่องกัน 4 คอลัมน์ มีค่า exclusion limit ดังนี้ 1.01×10^6 , 1.72×10^5 , 1.13×10^4 และ 1.30×10^3) การทำ GPC ใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที ทำการวัดค่าดูดกลืนแสง ($\lambda 210 \text{ nm}$) และ ปริมาณรังสีของ polyisoprene ใน fraction ต่างๆที่ถูกชะออกมาทุกๆนาที่ พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers.

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

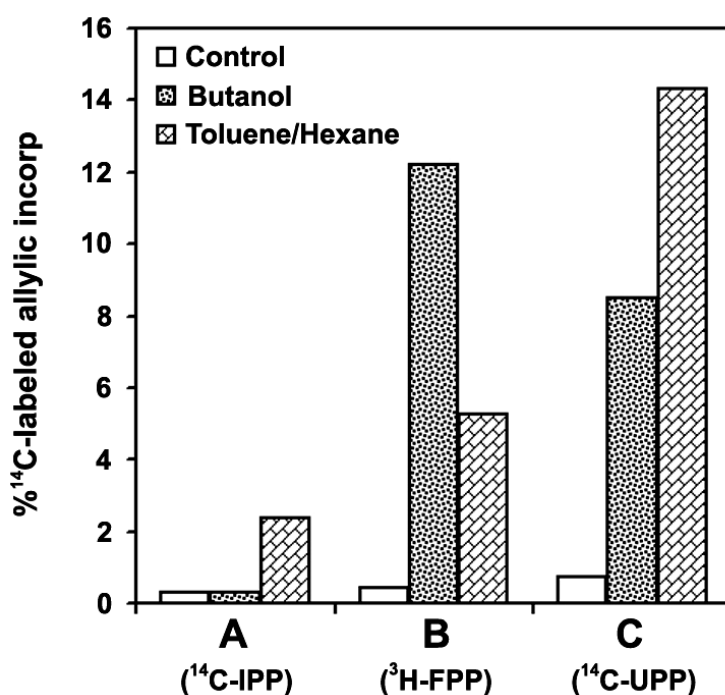
จากผลในรูปที่ C.1 จะเห็นว่าเมื่อใช้ ^{14}C -UPP เป็น allylic diphosphate initiator เมมเบรนโปรตีนของอนุภาคลูทอยด์และเฟรวิสร้าง หรือ อนุภาคมก้นหลอด (WBM) มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ยางได้มากกว่าอนุภาคขนาดเล็กถึง 5 เท่า โดยประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ยางของ WBM ที่ได้จากการใช้ ^{14}C -UPP เป็น allylic diphosphate initiator จะสูงกว่าที่ได้จากการใช้ ^{14}C -IPP และ ^3H -FPP ประมาณ 6 และ 2.5 เท่าตามลำดับ (รูปที่ C.2) โดยน้ำหนักโมเลกุลของยางที่สร้างจาก ^{14}C -UPP โดย WBM ที่วิเคราะห์ได้จาก GPC อยู่ในช่วง $1 - 4 \times 10^5$ และมี MWD เป็นแบบ skewed unimodal (รูปที่ C.3-4) โดยน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์อย่างดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าหรือเพิ่มขึ้นเป็น 9×10^5 เมื่อนำไป incubate กับ WRP ที่มีการเติม 60 μM IPP โดยมี MWD แบบ unimodal (รูปที่ C.5)

ผลของการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลยาง ที่สร้างโดยเมมเบรนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ของยางธรรมชาติ ทำให้ได้ความรู้พื้นฐานใหม่ที่สนับสนุนข้อสันนิษฐานของนักวิทยาศาสตร์ (Southorn, 1961) ยุคบุกเบิก ว่าโมเลกุลยางน่าจะถูกสร้างขึ้นในร่างแหเมม

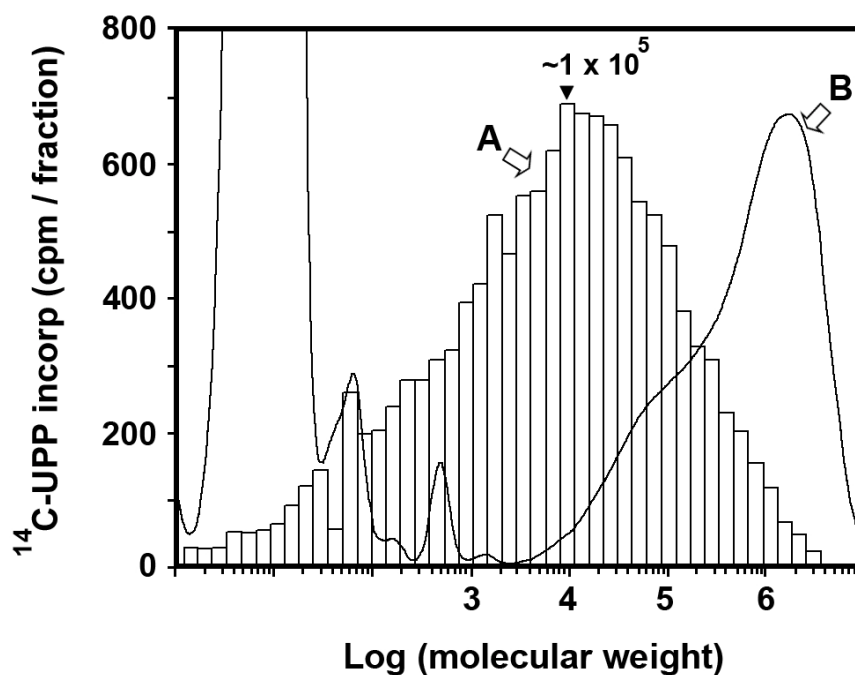
เบรนที่เชื่อมอนุภาคยาง อนุภาคลูทอยด์ และ อนุภาค เพรวีลิ่ง เข้าด้วยกัน โดยลำดับขั้นตอนการสร้างระดับ early elongation จะเริ่มจากอนุภาคกันหลุดซึ่งประกอบด้วยอนุภาคเพรวีลิ่งและอนุภาคลูทอยด์ ทำการสร้างได้พอลิเมอร์ที่มีขนาดเล็ก ($1 - 4 \times 10^5$) และมี MWD เป็นแบบ skewed unimodal หลังจากนั้นการสร้างระดับ late elongation ให้ได้พอลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (9×10^5) จะเกิดขึ้นที่อนุภาคยางขนาดเล็ก ตามลำดับ ทั้งนี้จะอาศัยเอนไซม์ rubber transferase ชนิดต่างๆที่เกาะอยู่กับเมมเบรนของอนุภาคดังกล่าว



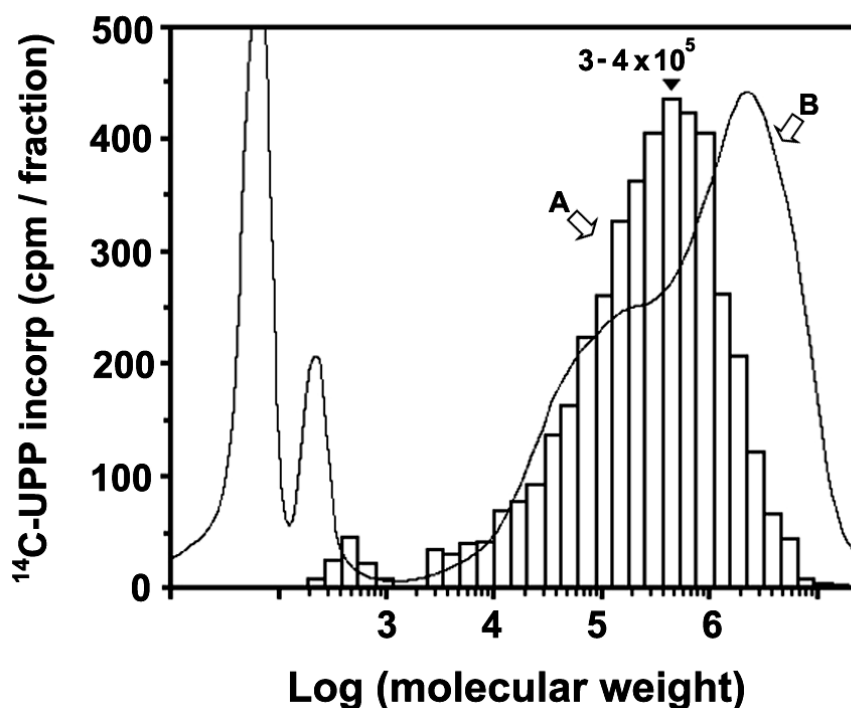
รูปที่ C.1 ชีวสังเคราะห์ยางโดย WRP (A) และ WBM (B) ซึ่งปริมาณที่ใช้เทียบเท่า น้ำหนักแห้งประมาณ 20 mg และมี ¹⁴C-UPP (354,000 cpm) เป็น allylic initiator โดยในปฏิกิริยาควบคุมจะใส่ 20 mM EDTA ระดับกิจกรรมแสดงในรูปของ % ¹⁴C-UPP ที่ถูก incorporate เข้าไปในโมเลกุลยางที่ได้จากการสกัด toluene/hexane (1:1, v/v).



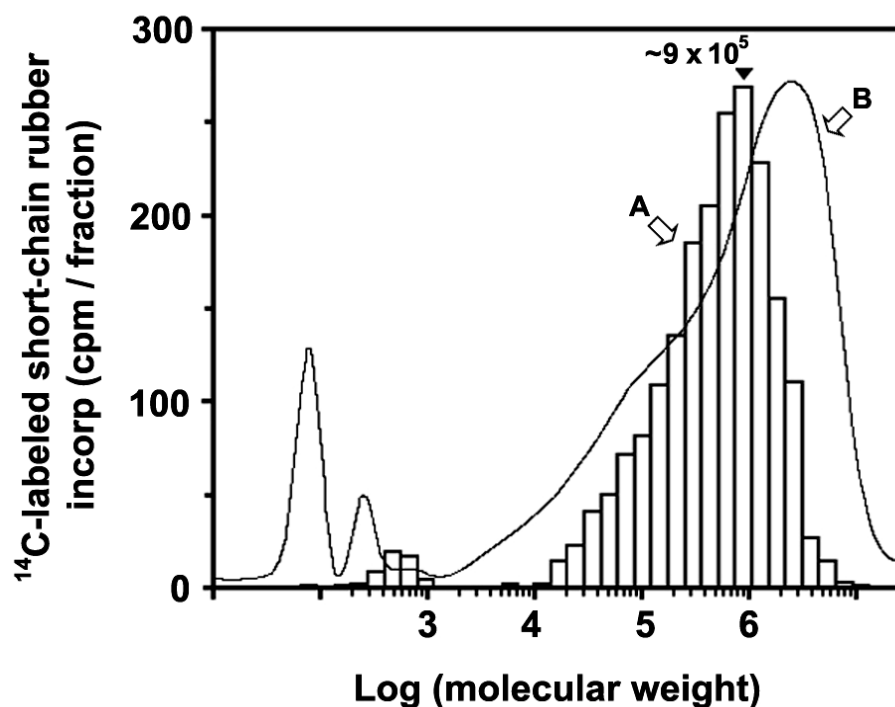
รูปที่ C. 2 อิทธิพลของ allylic isoprene ที่มีต่อชีวสังเคราะห์ยางโดย WBM (B) ปฏิกริยา ปริมาตร 200 μl ประกอบด้วย WBM (ปริมาณน้ำหนักแห้ง 20 mg), 60 μM IPP , radiolabeled allylic initiators [12.5 μM ^3H -FPP ,7 ci/mol(B) or 100,900 cpm ^{14}C -UPP] สำหรับปฏิกริยา (A)ไม่มี allylic initiator แต่มี 15 μM ^{14}C -IPP (15 ci/mol) โดยใน ปฏิกริยาควบคุมจะใส่ 20 mM EDTA ระดับกิจกรรมแสดงในรูปของ % ^{14}C -UPP ที่ถูก incorporate เข้าไปในโมเลกุลยางที่ได้ จากการสกัด toluene/hexane (1:1, v/v).



รูปที่ C.3 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของยางที่สร้างโดยส่วนของ WBM ที่ตกตะกอนด้วย acetone ช่วง 0-20% โดยมี UPP เป็น allylic initiator ด้วย GPC ทำแยก radiolabeled rubber ออกจาก origin spot หลังการนำไปแยกด้วย ด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้ อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที ทำการวัดค่า ปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสง ที่ $\lambda 210$ nm ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชะ ออกมาทุกๆ นาที พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers.



รูปที่ C.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของยางที่สร้างโดย WBM โดยมี UPP เป็น allylic initiator ด้วย GPC ทำแยก radiolabeled rubber ออกจาก origin spot หลังการนำไปแยกด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที ทำการวัดค่า ปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสง ที่ $\lambda 210$ nm ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชะออกมาทุกๆ นาที พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers.

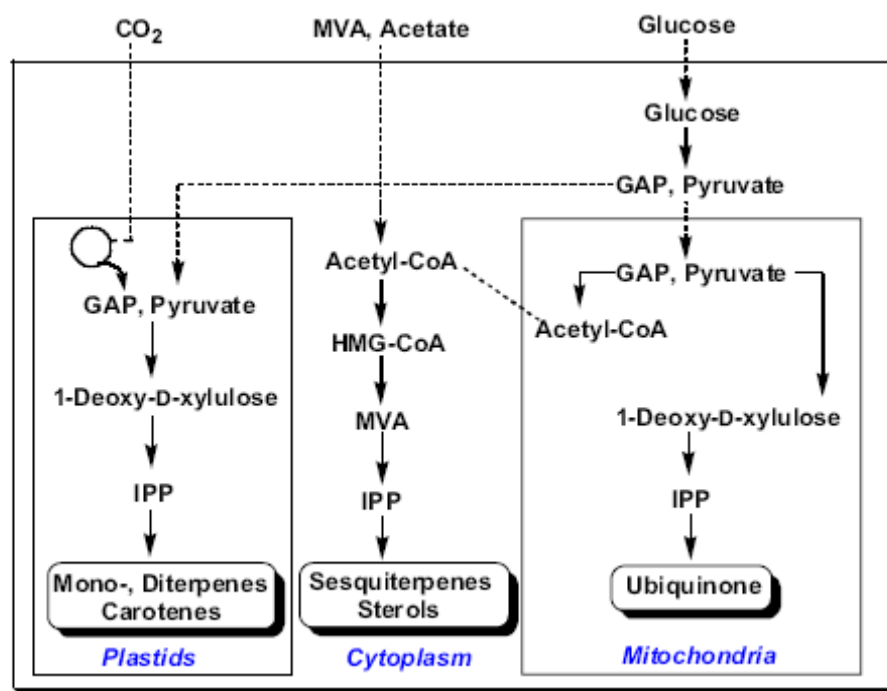


รูปที่ C.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ยางดังที่เพิ่มเมื่อนำพอลิเมอร์ยางที่สร้างโดย WBM (รูปที่ C.3) ไปincubate กับ WRP ที่มีการเติม $60 \mu\text{M}$ IPP โดยนำ radiolabeled rubber ที่แยกได้จาก origin spot หลังการทำ TLC ไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที่ ทำการวัดค่าปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสง(B) ที่ $\lambda 210 \text{ nm}$ ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชะออกมาทุกๆนาที่ พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers.

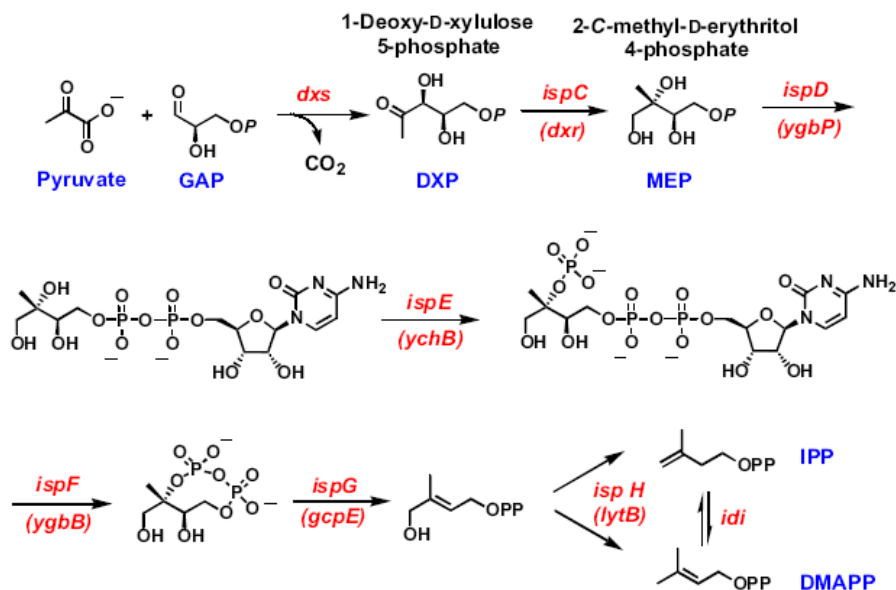
C.2) การ ศึกษาคุณสมบัติของอนุภาค เพรวิสสิ่งที่อยู่ในเครือข่ายร่างแห

C2.1) การโคลนนิ่งเอนไซม์ *1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR)*

อนุภาคอนุภาคเพรวิสสิ่งนี้แตกต่างจากอนุภาคลูทอยด์ และอนุภาคภายในเครือข่ายร่างแห (reticulum) ตรงที่เป็นอนุภาคที่มีเมมเบรนห่อหุ้ม 2 ชั้น คล้ายกับอนุภาค plastid จำพวก chromoplast และ leucoplast ของพืชอื่นโดยทั่วไป วิธีการสังเคราะห์ isoprene ในอนุภาค plastid จะเป็นแบบ MEP pathway ซึ่งจะแตกต่างจากวิถี (MVA pathway) ที่มี HMG-CoA reductase เป็น rate-limiting enzyme และเกิดขึ้นใน cytosol (รูปที่ C.6) แต่วิถี MEP pathway จะอาศัย glyceraldehyde 3-phosphate และ pyruvate ซึ่งได้จากการสลาย glucose โดยวิถี pentose phosphate เป็นสารตั้งต้นและมี 1-Deoxy-D-xylulose reductase (DXR) เป็น rate-limiting enzyme (รูปที่ C.7)



รูปที่ C.6 วิธีการสังเคราะห์ isoprene ใน ออร์แกเนลล์ (plastid และ mitochondria) และไซโตพลาสซึม



รูปที่ C.7 The non-mevalonate pathway or 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate/1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway (MEP/DOXP pathway) of isoprenoid biosynthesis

ดังนั้น หากอนุภาคเฟรวิสลิง สามารถสร้าง IPP ได้จาก glucose ก็อาจมีความเป็นไปได้ว่าต้นยางสามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ในเครือข่ายร่างแหให้ไปเป็นยางโดยตรง

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมอนุภาคเฟรวิสลิง

นำน้ำยางสดมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 1700g อุณหภูมิ 10°C นาน 30 นาที ใน swing-out bucket rotor เพื่อลดการชนกระแทกระหว่างอนุภาคต่างๆของน้ำยางในขณะที่ถูกเหวี่ยง ทำการกำจัดส่วนครึ่งบนซึ่งส่วนใหญ่เป็นอนุภาคยางออกไป แล้วนำส่วนครึ่งล่างที่เหลือไปปั่นแยกที่ 7000g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที โดยใช้ fixed angle rotor น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นยางจะอยู่บนสุด โดยได้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟรวิสลิงสีเหลืองอมส้มแขวนลอยอยู่ ทำการรวบรวมอนุภาคแขวนลอยดังกล่าว แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 59,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที ทำการล้างตะกอนอนุภาคเฟรวิสลิง 3 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์

b) การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ^{14}C -prenyl ที่สร้างจาก ^{14}C -glucose โดยอนุภาคเฟรวิสลิง

นำอนุภาคเฟรวิสลิงที่เตรียมได้ไปทำให้แตกโดยวิธี sonication แล้ว นำไปสกัดเอาส่วนใสโดยการปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 10,000g ที่ 4°C นาน 10 นาที นำส่วนใสปริมาตร 100

μM ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 280 μg ไปใส่ใน reaction mixture ปริมาตร 500 μL ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 30 mM KF, 0.15 NADPH, 74 μM mevinolin (ในกรณีที่ใช้) และ 1 mM [^{14}C]glucose (5 Ci/mol) ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการแยกผลิตภัณฑ์ prenol diphosphate ด้วย 1-butanol แล้วทำการสลายหมู่ฟอสเฟตด้วยออกโดยใช้เอนไซม์ potato acid phosphatase สกัดผลิตภัณฑ์ prenols ที่ได้ด้วย pentane แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC บนแผ่น reverse LKC-18 plate และใช้ acetone/water (19:1, v/v) เป็นตัวชะ ทำการเปรียบเทียบขนาดกับ prenols มาตรฐานที่สามารถมองเห็นได้โดยอาศัยไอระเหยไอโอดีนพร้อมกับวิเคราะห์หาปริมาณ radioactive ในผลิตภัณฑ์ prenols ด้วยเครื่อง Bioimage analyzer

b) การโคลนนิ่ง cDNA ของ 1-deoxy-D-xylulose reductase (DXR)

ทำโดยใช้ PCR product ที่มีความจำเพาะซึ่งได้ออกแบบมาจากลำดับเบส 5' ไทด์ของเอนไซม์ solanesyl diphosphate synthase ในฐานข้อมูล มาใช้เป็นตัวติดตามในการตรวจหายีนดังกล่าวจากห้องสมุดจีโนมที่เตรียมจากน้ำยางพารา จากนั้นชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวได้ถูกนำมาออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ ดังรายละเอียดใน (Yoonrum et al, 2008, Appendix 6)

g) การวิเคราะห์การแสดงออก mRNA ของ DXR

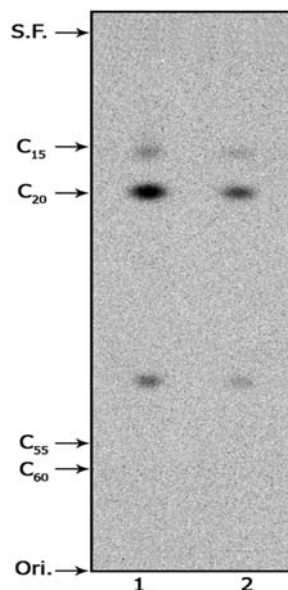
ทำการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR โดยการ amplify total RNA (1 กรัม) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วย primer ที่ออกแบบจำเพาะกับ DXR

f) การหาตำแหน่งที่อยู่ของ DXR ภายในเซลล์

การหาตำแหน่งที่อยู่ของ DXR ภายในเซลล์ ทำโดยอาศัยเทคนิคทาง Gateway cloning system ดังรายละเอียดใน Yoonrum et al, 2008 (Appendix 6)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการนำ [^{14}C] glucose ไป incubate กับอนุภาคเฟรวิสลิง ในสภาพที่มีตัวยับยั้ง HMG-CoA reductase (mevinolin) พบว่าอนุภาคเฟรวิสลิงสามารถสร้างสาร [^{14}C] prenol ได้หลายชนิดรวมทั้ง FDP และ GGDP จาก [^{14}C] glucose แต่ปริมาณที่ได้จะเห็นว่าต่ำกว่าที่ได้ในสภาพที่ไม่มีการใส่ตัวยับยั้ง mevinolin (รูปที่ C.8) และเนื่องจากมีการรายงานที่ FDP เป็น allylic diphosphate ที่ถูกใช้เป็น initiation species ในการเริ่มกระบวนการชีวสังเคราะห์ยาง ดังนั้นอนุภาคเฟรวิสลิงอาจจะทำหน้าที่สร้าง initiating primer ให้กับพอลิเมอร์ยางก็ได้ แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานใดๆ ได้ทำการยืนยันว่าอนุภาคเฟรวิสลิงเป็นอนุภาคประเภท plastid จริงๆ ดังนั้นคณะวิจัยจึงได้ทำการโคลนเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose reductase (DXR) ซึ่งเป็น rate-limiting enzyme ในการสังเคราะห์ isoprene โดยวิธี MEP ใน plastid จากการนำ cDNA library ที่เตรียมได้จากน้ำยาง เพื่อเป็นการยืนยัน



รูปที่ C.8 TLC autoradiogram ของ [14 C]prenyl (หลังการย่อยด้วย acid phosphate) ที่ได้จากการ incubate [14 C] glucose กับอนุภาคอนุภาคเฟรวิสลิ้ง ในสภาพที่ไม่มี (lane 1) และมี mevinolin (lane2) ผสมอยู่ด้วย (S.F. = solvent front; Ori = origin) (Yoonrum et al, 2008, Appendix 6)

ผลการโคลนยีน DXR จากยางพารา (HbDXR) โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมได้จากน้ำยางพบว่า ยีน HbDXR ประกอบไปด้วยหนึ่ง putative ORF (open reading frame) ที่มี % การเรียงลำดับเบสคล้ายคลึงกับ DXR ในพืชอื่นๆคือ *L. esculentum* (86%), *A. thaliana* (82%), *S. rebaudiana* (82%), and *O. sativa* (80%) (รูปที่ C.9) โดยโปรตีนที่สังเคราะห์จาก HbDXR จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว และคาดว่าจะมี molecular mass เท่ากับ 50.97 kDa นอกจากนั้นยังพบว่าระดับการ expression ของยีน HbDXR มีมากที่สุดในส่วนเนื้อเยื่อส่วนที่มาจากช่อดอกและลำต้นอ่อนของต้นกล้วย มีระดับปานกลางในน้ำยาง และแทบไม่มีเลยในใบยางแก่ (รูปที่ C.10) ดังนั้นยีน HbDXR ที่โคลนได้น่าจะเป็นชนิดที่มีความจำเพาะต่อท่อน้ำยาง จากการตรวจดูยีน HbDXR ด้วย ChloroP algorithm พบว่า HbDXR มีกรดอะมิโน 80 ตัวด้าน N-terminal ที่น่าจะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่เป็น transit peptide เพื่อนำ DXR เข้าไปใน plastid ซึ่งสามารถยืนยันจากผลการทดลองโดยการ fuse ยีน HbDXR ด้วย GFP fluorescent ตรงบริเวณ C-terminal แล้วนำไปใส่ในเซลล์ *Arabidopsis* ปรากฏว่าสามารถพบยีน HbDXR ในบริเวณที่เป็น chromoplastid (chloroplast) (รูปที่ C.11) ดังนั้น อนุภาคเฟรวิสลิ้งจึงเป็นอนุภาคพลาสติดที่

จำเพาะสำหรับท่อน้ำยาง และน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างหน่วยย่อยไอโซพรีน ที่ใช้ในการสร้าง หมู่พรีนิลเช่น FDP และ GGDP ซึ่งใช้เป็น primer สำหรับการสร้างโมเลกุลยาง ในขั้นตอน initiation step

A. thaliana	1:MMTNSIS--AESKAISLDTSRF--NFIPKLSGGFSLRRNQGRGFGKGVKCSVKV---QQQQQPPFAWPGRA--VPEAPRQS--WDG	79
L. esculentum	1:--MAENLIS--BAEIKSISLNSKSSYNLSHLFTFGGLSIRRKECSGAFKRVQCSA-----QLPPFAWPGRAVAEPGRQS--WDG	77
O. sativa	1:--MAKVVSPFGDLAAVSHLDSNRGG--AFNQKLVDFLQTRDRRAVSL--RRTCCSM-----QQAPFAWPGRAVVEFGRRS--WDG	75
S. rebaudiana	1:--MSLSYLS--PTQTNLITSDCKSQ--THLLKLGGGFCFKRKDVKLAG--KGIRCSA-----QPPFFFAWPGTALVDPGTKN--WDG	74
H. brasiliensis	1:--MAENLIS--BAEIKSISLDTSKS--SHLTKLPGGFSKRRKDFGAAPGKKVQCSA-----QPPFFFAWPGRAFPDLGRKT--WDG	73
S. leopoliensis	1:-----	1
E. coli	1:-----	1

A. thaliana	80:PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVRRFKKALVAVRNESIVNELKPAIADLDYKLEIIPGEQGVIEV	167
L. esculentum	78:PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVVELKPAIADMEDKFEIIPGEQGVIEV	165
O. sativa	76:PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKPAIADCWKEFEIIPGEQGVIEV	163
S. rebaudiana	75:PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKPAIADADYMEFEIIPGEQGVIEV	162
H. brasiliensis	74:PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKPAIADVEEKEFEIIPGEQGVIEV	161
S. leopoliensis	1:MKAVTLIGSTGSGIGTQTLILEQYPPDFRIVGLAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKPAIADLDNPELHLTGEAGGVIEV	88
E. coli	1:MKQLTLIGSTGSGIGTQTLVVRHNPEHFRVVALVAGKNVVRNVEVCLLESRYAVMDDASAKLKKIMLQQQGSRTVELVSGQAACDM	88

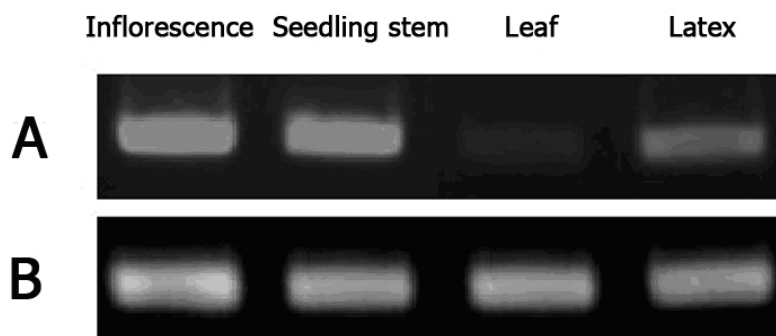
A. thaliana	168:ARHPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGF--FVLPIAKHKNVWILFADSEHSAIFQCIQGLPE---GA-----	246
L. esculentum	166:ARHPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGF--FVLPIAKHKNVWILFADSEHSAIFQCIQGLPE---GA-----	244
O. sativa	164:ARHPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGF--FVLPIAKHKNVWILFADSEHSAIFQCIQGLPE---GA-----	242
S. rebaudiana	163:ARHPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKNLANKETLIAGGF--FVLPIAKHKNVWILFADSEHSAIFQCIQGLPE---GA-----	241
H. brasiliensis	162:ARHPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGF--FVLPIAKHKNVWILFADSEHSAIFQCIQGLPE---GA-----	240
S. leopoliensis	89:ARYGDAEIVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGF--FVLPIAKHKNVWILFADSEHSAIFQCIQGLSTHADFRPAQVV	175
E. coli	89:DALEVDVQVMAAIVGAGLLETLRAIFAGKTHLLANKESHVTCGRLEMDAVKQSKAQLLFV--DSEHNAIFQSLPQPIQHNLGYADLEQ	175

A. thaliana	247:--LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFNWNSMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMIETQ	332
L. esculentum	245:--LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFNWNSMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMIETQ	330
O. sativa	243:--LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFNWNSMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMIETQ	328
S. rebaudiana	242:--LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFNWNSMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMIETQ	327
H. brasiliensis	241:--LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFNWNSMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMIETQ	326
S. leopoliensis	176:AGLRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFNWNSMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGLDYDDIEIVIH PQSI IHSMIETQ	263
E. coli	176:NGVVSILITSGGGPFRETFPLRDLATMTPDCAERHFNWNSMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGLDYDDIEIVIH PQSI IHSMIETQ	263

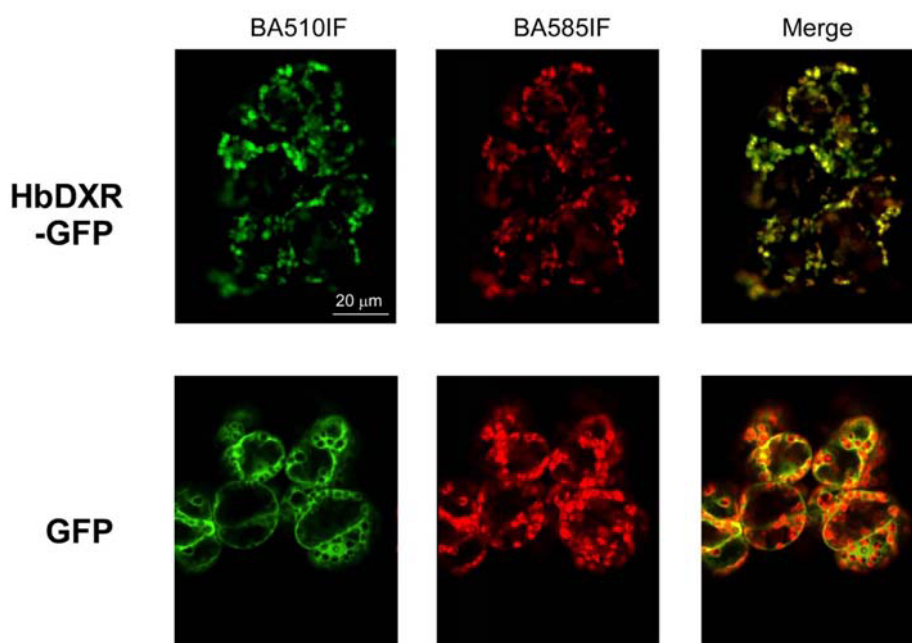
A. thaliana	333:DSSVLAQLGWPMRLPIILYITNSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID	420
L. esculentum	331:DSSVLAQLGWPMRLPIILYITNSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID	418
O. sativa	329:DSSVLAQLGWPMRLPIILYITNSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID	416
S. rebaudiana	328:DSSVLAQLGWPMRLPIILYITNSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID	415
H. brasiliensis	327:DSSVLAQLGWPMRLPIILYITNSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFIN	414
S. leopoliensis	264:DSSVLAQLGWPMRLPIILYITNSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID	348
E. coli	264:DSSVLAQLGWPMRLPIILYITNSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID	348

A. thaliana	421:EKIGYLDIFKIVELTCAHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVHA	477
L. esculentum	419:EKIGYLDIFKIVELTCAHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFAIV	475
O. sativa	417:EKIGYLDIFKIVELTCAHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVFEV	473
S. rebaudiana	416:EKIGYLDIFKIVELTCAHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVIAV	473
H. brasiliensis	415:EKIGYLDIFKIVELTCAHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVIA	471
S. leopoliensis	349:EKIHFSIPRLIERACDRHQTEWQQCPESIDDLIADWARQFVCASYCSLESVV	402
E. coli	349:COIRFTDAALN--GVLEKMEMREPOCV--DDVLVSVANAREVVRKEVMRLAS	398

รูปที่ C.9 Multiple sequence alignment of the deduced amino acid of HbDXR and DXRs from four other plants including two of those from bacteria. The residues boxed in black indicated the positional identity for at least four of six compared sequences. Dashed indicate gaps introduced in order to optimize the alignment. Asterisks indicate the NADPH-binding motif. The putative cleavage site is indicated with an arrowhead. The cDNA accession number are *A. thaliana*; AF148852, *L. esculentum*; AF331705_1, *O. sativa*; AF367205, *S. rebaudiana*; AJ429233, *H. brasiliensis*; DQ437520, *S. leopoliensis*; AJ250721 and *E. coli*; AB013300. (Yoonrum et al, 2008, Appendix 6)



รูปที่ C.10 Analysis of mRNA expression patterns by RT-PCR. A: mRNA expression of HbDXR (28 cycles); B: 18S rRNA expression as an internal control. (Yoonrum et al, 2008, Appendix 6)



รูปที่ C.11 Subcellular localization of HbDXR in *Arabidopsis* T87 cells. Cells expressing HbDXR, fused with GFP at C-terminus of GFP and GFP, were observed by laser confocal microscopy. The panels indicated as BA510IF, BA585IF, and Merge show fluorescence images of GFP, the autofluorescence of chlorophylls, and the merged image of green and red fluorescence, respectively. (Yoonrum et al, 2008, Appendix 6)

C.2.2 การโคลนนิ่งเอนไซม์ *solanesyl diphosphate synthase*

จากการที่อนุภาคเฟรวิสริง เป็นอนุภาคเดียวที่อยู่ในเครือข่ายร่างแหที่มีเมมเบรน 2 ชั้น ห่อหุ้ม และเป็นอนุภาคที่มีสีเหลืองอมส้มซึ่งน่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง carotenoids แต่ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับกิจกรรมของอนุภาคนี้นั้นยังมีน้อยมาก คณะวิจัยจึงได้ทำการการวิเคราะห์หาสารจำพวก plastidial isoprenoid เช่น plastoquinone ซึ่งจะถูกสร้างจาก IPP ที่ได้มาจาก MEP pathway ของอนุภาคพลาสติด พร้อมทั้งทำการโคลนนิ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อเป็นการเสริมข้อมูลคุณสมบัติจำเพาะด้านการเป็นพลาสติดของอนุภาคเฟรวิสริงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมอนุภาคเฟรวิสริง

นำน้ำยางสดมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 1700g อุณหภูมิ 10°C นาน 30 นาที ใน swing-out bucket rotor เพื่อลดการชนกระแทกระหว่างอนุภาคต่างๆของน้ำยางในขณะที่ถูกเหวี่ยง ทำการกำจัดส่วนครึ่งบนซึ่งส่วนใหญ่เป็นอนุภาคยางออกไป แล้วนำส่วนครึ่งล่างที่เหลือไปปั่นแยกที่ 7000g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที โดยใช้ fixed angle rotor น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นยางจะอยู่บนสุด โดยได้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟรวิสริงสีเหลืองอมส้มแขวนลอยอยู่ ทำการรวบรวมอนุภาคแขวนลอยดังกล่าว แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 59,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที ทำการล้างตะกอนอนุภาคเฟรวิสริง 3 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์

b) การแยก plastidial isoprenoid

ทำการสกัด prenol lipid ออกจากตะกอนอนุภาคเฟรวิสริง โดยการ reflux ด้วยสารละลาย chloroform/methanol (2:1, v/v) นำสารสกัดไประเหยให้แห้งแล้วละลายด้วย chloroform/methanol (1:1) นำไปแยกด้วย TLC (Kieselgel 60 F254) โดยใช้สารละลาย hexane/diethyl ether/acetic (80:20:1, v/v/v) เป็นตัวชะ นำไปแผ่น TLC ไปส่องใต้แสง UV แล้วแยกเอาส่วนของ prenolquinone (R_f 0.27-0.59) ไปสกัดด้วย chloroform/methanol (1:1) ทำให้แห้ง แล้วนำไปละลายใน solvent A (methanol/propa-o2-ol; 4:1,v/v) แล้วทำการแยก ผ่านคอลัมน์ reverse-phase C18 Symmetry 5 μ m (3.9 mmx150 mm) ที่มีการปรับสภาพด้วยสารผสม solvent A กับ solvent B (methanol/propan-2-ol;1:1,v/v) ในปริมาตรเท่ากัน ด้วยอัตราการไหล 1 มล./นาที โดยฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วทำการชะด้วย linear gradient จาก 50-100% ของ solvent B เป็นเวลา 10 นาที แล้วตามด้วย solvent B อีก 10 นาที เตรียมสารละลายมาตรฐาน ubiquinone 10 ใน solvent เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ และทำการยืนยันสาร plastoquinone ที่เตรียมด้วยได้โดยวิธี Hirooka et al.(2003)

c) การโคลนนิ่ง cDNA ของ solanesyl diphosphate synthase

ทำโดยใช้ PCR product ที่มีความจำเพาะซึ่งได้ออกแบบมาจากลำดับเบสโค้ดของเอนไซม์ solanesyl diphosphate synthase ในฐานข้อมูล มาใช้เป็นตัวติดตามในการตรวจ

หายีนดังกล่าวจากห้องสมุดจีโนมที่เตรียมจากน้ำยางพารา จากนั้นชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวได้ถูกนำมาออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ ดังรายละเอียดใน (Phatthiya et al, 2007)

d) การเตรียม Hevea solanesyl diphosphate synthase (HbSDS)

ทำโดยการนำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a/HbSDS ซึ่งได้โคลนยีน SDS ที่มาจาก พลาสมิด pGEM T-easy/HbSDS มาชักนำให้โปรตีน SPS แสดงออก แล้วทำการแยก SDS จากส่วน pellet fraction ของ cell homogenate หลังการปั่นแยก

e) การวิเคราะห์กิจกรรมของ HbSDS

ส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยางในปริมาตรของสารทั้งหมด 0.1 ml มี 50 mM Tris/HCl buffer, (pH 7.5) , 5 mM $MgCl_2$, 20 mM β -mercaptoethanol , 50 μ M farnesyl diphosphate, 50 μ M [$1-^{14}C$] IPP ($2.15 \text{ GBq.mmol}^{-1}$), 0.5% Triton X-100 และ 200 μ g ของ crude enzyme ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นานี่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

f) การวิเคราะห์ product ที่ได้จากกิจกรรมของ HbSDS

ทำการสกัด product prenyl diphosphate ที่ได้ที่ได้หลังการบ่มด้วย butanol แล้วใช้เอนไซม์ potato acid phosphatase ย่อยหมู่ฟอสเฟตออก จากนั้นนำไปแยกบนแผ่น TLC ชนิด reverse-phase LKC-18 โดยใช้ตัวทำละลาย acetone/water (19:1,v/v) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bio-image analyzer

g) การวิเคราะห์การแสดงออก mRNA ของ HbSDS

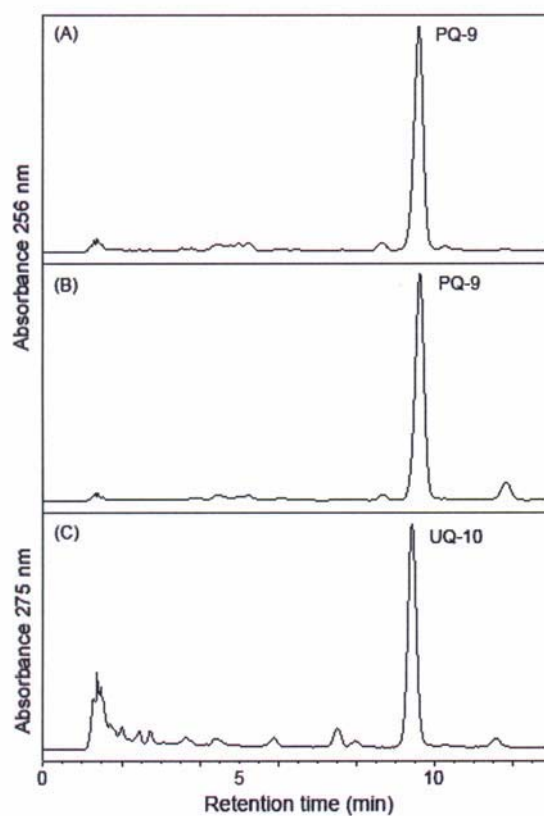
ทำการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR โดยการ amplify total RNA (1กรัม) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆด้วย primer ที่ออกแบบจำเพาะกับ HbSDS

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลจากการนำสาร plastidal isoprenoid ที่สกัดจากอนุภาคเฟรวิสริงไปทำปฏิกิริยาโดยวิธี TLC และ วิเคราะห์ด้วย HPLC (รูปที่ C.12) โดยเปรียบเทียบกับ plastidal isoprenoid (PQ-9 และ UQ-10) ที่สกัดจาก chloroplast และ mitochondria ของใบ ปรากฏว่าเป็นสารสกัดจากเฟรวิสริงเป็นชนิด PQ-9

ผลการโคลนยีน SDS จากยางพารา โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมได้จากน้ำยาง พบว่ายีน HbSDS ประกอบไปด้วยหนึ่ง ORF (open reading frame) ที่ encode กรดอะมิโน 418 ตัว หรือโปรตีนขนาด 46 kD (รูปที่ C.13) โดยการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวใน *E. Coli* จะอยู่ในรูปของ recombinant protein ขนาด 60 kD (รูปที่ C.14) โดยอยู่ในส่วนของตะกอน ทั้งนี้เพราะโปรตีนดังกล่าวประกอบไปด้วยกรดอะมิโนชนิด hydrophobic ถึง 48% ในขณะที่มีกรดอะมิโนชนิด hydrophilic เพียง 28% และมีกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ SDP synthase 1 ของ *A. thaliana* 70%, ODP synthase ของ *E. Coli* 46% , GDP synthase ของ *Citrus siensis* 41%, GGDP (รูป

ที่ C.15) และจาก sequence analysis ของ HbSDS โดย Predotar program พบว่าประกอบไปด้วยส่วนของ plastid targeting sequence นอกจากนั้นยังสามารถยืนยันจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ HbSDS ในสารสกัดที่ได้จาก IPTG-induced *E.Coli* ว่าเป็น SDS ที่โคลนได้สามารถสร้าง C₄₅ prenyl moiety (รูปที่ C.16) โดยเอนไซม์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อ allylic primers ตามลำดับดังนี้ GGDP>FDP>GDP นอกจากนั้นยังสามารถพบการแสดงออกของ HbSDS mRNAs ได้สูงสุดในน้ำยาง ซึ่งสูงกว่าในใบและส่วนลำต้นของต้นอ่อน แต่ไม่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อราก (รูปที่ C.17) ดังนั้น PQ-9 ในอนุภาคเฟรเวีส์จึงน่าจะทำหน้าที่เป็นปัจจัยหนึ่งในปฏิกิริยาต่อเนื่องของกระบวนการ desaturation ที่จำเป็นสำหรับการสร้าง carotenoid หรือ อาจทำหน้าที่เป็นสาร antioxidant คล้ายคลึงกับหน้าที่ของ ubiquinone ใน mitochondria หรือ อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคเหมือนกับที่ได้มีการรายงานไว้ในพืชอื่นๆ



รูปที่ C.12 HPLC chromatogram of *Hevea* prenylquinones. (A) Chloroplast plastoquinone-9 extracted from leaves (B) Frey-Wyssling particle plastoquinone-9 extracted from latex (C) Mitochondrial ubiquinone-10 extracted from leaves. (Phatthiya et al, 2007. Appendix 7)

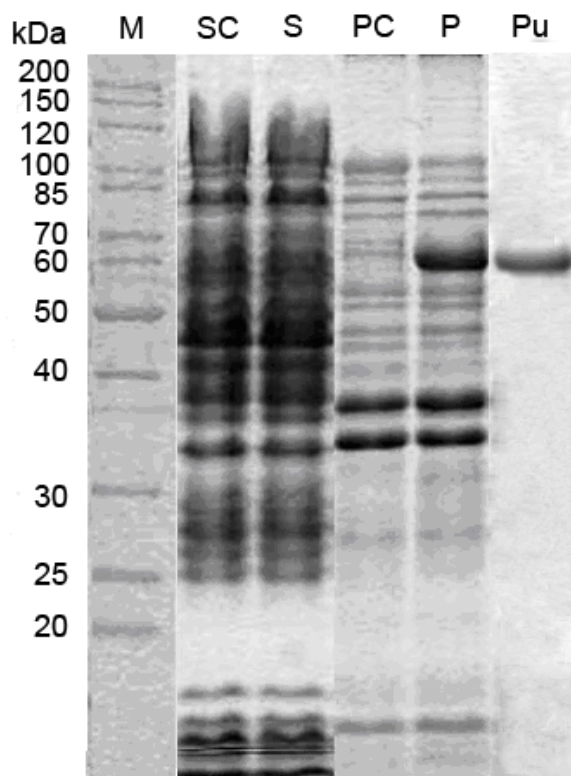
```

1  AATCACTGGCCTCAAACCTCAAACCTGATAAGAACTCCAAGACAAGACACGGTCTATGTGGGCTTATTGGATCCACGAGTGGAGAAGTCCCACTTCTGT
101 CGTCTGTGAAAGAGAACTTCTGAACCTGGAAAACCATTCGACTTCTTTTATTCTTTTGGATTCTTTCAAGTTTCCATCAGAAACCTGTTTTGTTTTTC
201 TTCTTTTCACTCTATTTTCTTGTCTGTTTGTGCTTATGGCAATCTGAACGAGATTGCTATCTGGGTTTGGATTGGAAGTCAAATTTCTTTGCTTTCT
301 GTTTCCTGTTGAGAAATGATGTCAATGACATGCTACAGTCTTGATTTTGAAGGACTGTGTTGATTGGCGGCTTGTGGGTGCTCCTCCAATGCTTCAA
    M M S M T C Y S L D F G R T V F D L A A C G C S S N A S I 29
401 TAGATAGGTGTTCACTGAGGAATTATGCAAGGTCGGTTTATAGGACTTGTAAATAGAGACTATGCTGCTAGAAGATCGCCCTATTGCCGGCAGATAGTGC
    D R C S V R N Y A R S V Y R T C N R D Y A A R R S P Y C R R D S A 62
501 TTGGTGTGAGTTTCTTCGACCAAGGCCCTGAGACTTTACTTAACGGGGTGTAGTCAAGATCCTGCTGTAAATTTGAAGAGTCAAGAGGCCCAATTTCA
    W C R V S S T K A P E T L L N G V S Q D P A V N L K E S R G P I S 95
601 TTGATAAATGTGTTTGAAGCGGTGCTGGTGATCTCCAGACTCTCAACCAAAACCTCGGTCGATTGTTGGTGCAGAAAACCAAGTTTAAATGTCTGCAG
    L I N V F E A V A G D L Q T L N Q N L R S I V G A E N P V L M S A A 129
701 CTGATCAGATATTGGTGTGGTGGGAAAAGGATGCGACCAAGCTTGGTATTCTAGTGTCAAGAGCCACAGCAGAAATAGTAGGGTTAAAAGAAGTCAAC
    D Q I F G A G G K R M R P A L V F L V S R A T A E I V G L K E L T 162
801 TACGAAACATCGAGCTTTAGCAGAGATCATTGAGATGATCCATCTGCAAGCTTAATTCATGATGATGACTAGATGAAAGTAACATGCGAAGAGGAAAA
    T K H R R L A E I I E M I H T A S L I H D D V L D E S N M R R G K 195
901 CAAACGGTTCATCAACTGTATGCCACGAGGGTGGCAGTACTGGCTGGGATTTCATGTTTGTCTCAGTCCATGGTACCTAGCAAATCTTGAAACATTG
    Q T V H Q L Y G T R V A V L A G D F M F A Q S S W Y L A N L E N I E 229
1001 AAGTCATTAAGCTTATCAGCCAGGTTATTAAAGATTTTGAAGTGGTGAATAAAGCAAGCATCTAGTTTGTGTTGACTGCGATGTTGAAGTCTGAGGAGTA
    V I K L I S Q V I K D F A S G E I K Q A S S L F D C D V E L E E Y 262
1101 CTGTGATCAAGAGCTATTACAAAACCTGCCTCTTTAATTGCTGCAAGTACCAAGAGCTGCTATTTTGTGTTGAGTGGGAGTGGTGTGCAACAAATG
    L I K S Y Y K T A S L I A A S T K G A A I F S G V D S S V A E Q M 295
1201 TATGAATATGTAAGAACTTGGTCTGTCTTCCAAGTTGTTGACGAGTACTGGATTTTACGAGTCAAGAGCAGCTGGGGAAGCCAGCTGGCAGTG
    Y E Y G K N L G L S F Q V V D D V L D F T Q S A E Q L G K P A G S D 329
1301 ACTTGGCAAAAGGGAACCTTACCGCCCTGTAATATTGCTCTGGAGAAAGAACCAAACTGAGAGAAATCATTGAGTCTGAATTTCTGTGAGACTGGTTC
    L A K G N L T A P V I F A L E K E P K L R E I I E S E F C E T G S 362
1401 TCTGGATGAAGCTGTTGAGTTGTTAAGCAGTGTGGGGTATTGAAAGAGCACAAGAATTAGCGAAGGAGAAAGCTGATCTTGCAATACAGAATCTTAAT
    L D E A V E L V K Q C G G I E R A Q E L A K E K A D L A I Q N L N 395
1501 TGTCTTCTCGGGGTGATTTTCAATCACATCTCAAAGAAATGTTGTTGACAATCTCGAAGGATTGATTAGTTAGATACTGCTTGATAGGAAACAAATA
    C L P R G V F Q S H L K E M V L Y N L E R I D 418
1601 TAGGTAAGCTTTACAGGGGTATAAACAGAATAAGCTGGATGAGGATCCTTTATGTATCAGTGCAGCAATTGTTTTCTGCAATTGTTTCACTGAGGTTG
1701 GOCCAACAGAAATAACTCCGCAATTTTCTGGTATACAGATTTTGTGGCCATCAATAATGTGAAGCTTCTTTATGTATTTTGTGATTTTCAAAAAA
1801 AAAAAAAAAAAAAA

```

รูปที่ C.13 Nucleotide and deduced amino acid sequences of HbSDS. Number of nucleotide sequence and amino acid sequence are indicated on the left and right, respectively. (Phatthiya et al, 2007. Appendix 7)

Appendix 7)



รูปที่ C.15 SDS-PAGE gel of purified HbSDS. Lane SC and S, soluble protein from non-induced and induced *E. coli* cells, respectively; lane PC and P, insoluble proteins from non-induced and induced *E. coli* cells, respectively; lane Pu, purified HbSDS; lane M, molecular-mass markers. (Phatthiya et al, 2007. Appendix 7)

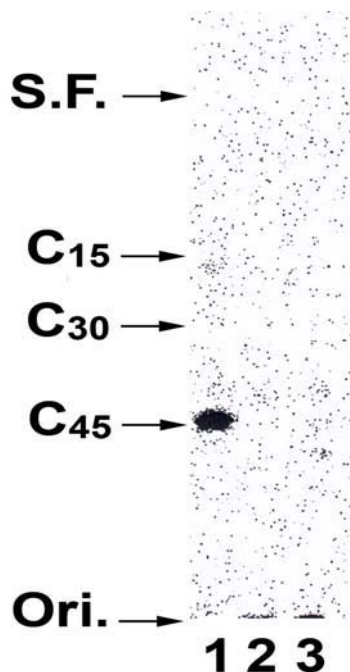


Fig.C.16 TLC autoradiogram of the prenyl alcohols obtained by enzymatic hydrolysis of the products formed by the reaction with cell-free homogenate of IPTG induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 1), non-induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 2), and *E. coli* harboring pET-32 (lane 3). (Phatthiya et al, 2007. Appendix 7)

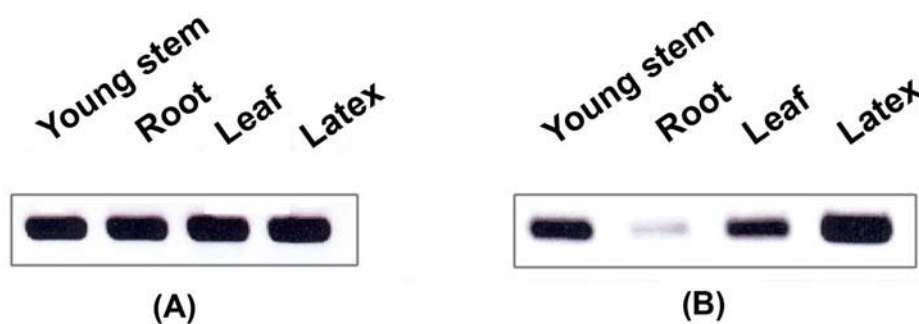


Fig.C.17 Analysis of mRNA expression patterns by RT-PCR. (A) Control (18S rRNA); (B) mRNA expression of HbSDS (35 cycles). (Phatthiya et al, 2007. Appendix 7)

References:

- Archer, B. L., Audley, B. G., 1987. New aspects of rubber biosynthesis. Bot. J Linnean Soc. 94, 181-196.
- Cornish, K., Backhaus, R. A., 1990. Rubber transferase activity in rubber particles of guayule. Phytochemistry 29, 3809- 3813.
- Hirooka, K., Bamba, T., Fukusaki, E., Kobayashi, A. Cloning and kinetic characterization of *Arabidopsis thaliana* solanesyl diphosphate synthase, Biochem. J. 370 (2003) 679-686.
- Madhavan, S., Greenblatt, G. A., Foster, M. A., Benedict, C. R., 1989. Stimulation of isopentenyl pyrophosphate incorporation into polyisoprene in extracts from guayule plants (*Parthenium argentatum*) by low temperature and 2-(3,4-dichlorophenoxy) triethanoamine. Plant Physiol. 89, 506-511.
- Moir, G. F. J., 1959 Ultracentrifugation and staining of *Hevea* latex. Nature 184, 1626-1628.
- Rattanapittayaporn, A., Wititsuwannakul, D. and Wititsuwannakul, R. (2004) Significant role of bacterial undecaprenyl diphosphate (C₅₅-UPP) for rubber biosynthesis by *Hevea* latex enzyme Macromol. Biosci. 4, 1039-1052.
- Phatthiya, A., Takahashi, S., Chareonthiphakorn, N., Koyama, T., Wititsuwannakul, D., Wititsuwannakul, R., 2007. Cloning and expression of the gene encoding solanesyl diphosphate synthase from *Hevea brasiliensis*. Plant Sci. 172, 824- 831.
- Southorn, W. A., 1961. Microscope studies on fresh *Hevea* latex. Rubber Development 14, 2-6.
- Tanaka, Y., Eng, A. H., Ohya, N., Nishiyama, N., Tangpakdee, J., Kawahara, S., Wititsuwannakul, R., 1996. Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*: characterization of initiating species by structural analysis. Phytochemistry 41, 1501-1505.
- Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T., Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., 1997a. Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea* latex. Phytochemistry 45, 269-274.
- Wititsuwannakul, D., Wititsuwannakul, R. 2001. Biochemistry of natural rubber and structure of latex. In: Steinbuchel, A. (ed.), Biopolymers Vol. 2, p p. 151-202. Germany: WILEY-VCH.
- Wititsuwannakul, D., Rattanapittayaporn, A., Wititsuwannakul, R., 2003. Rubber biosynthesis by a *Hevea latex* bottom-fraction membrane. J. Appl. Polym. Sci. 87, 90-96.

- Wititsuwannakul,D., Rattanapittayaporn A., Koyama, T. and Wititsuwannakul, R. (2004) Involvement of *Hevea* latex organelle membrane proteins in rubber biosynthesis activity and regulatory function. *Macromol. Biosci.* 4, 314-323.
- Yoonram, K., Takahashi, S., Rattanapittayaporn, A., Koyama, T., Wititsuwannakul, D., Wititsuwaanakul, R. (2008) cDNA, from *Hevea brasiliensis*, encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase. *Plant Science* (being revised for resubmission)

D. โครงการย่อย 4

การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต้านเชื้อแคนดิดาจากน้ำยางพารา

โครงการย่อย 4 นี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ประจำปี 2543 ภายใต้โครงการย่อย 3 เรื่องการวิจัยสารชีวเคมีที่มีมูลค่าสูงจากน้ำยางพารา) โดยคณะผู้วิจัยได้พบสารที่สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับน้ำยางพาราจากสารชีวเคมีซึ่งอยู่ในส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยาง ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อในช่องปากหลายชนิดรวมทั้ง *Candida albicans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อราในช่องปาก (oral candidiasis) โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดีที่สุด และพบเบื้องต้นว่าสาร anti-candida สามารถทนความร้อนได้ดี และมีน้ำหนักโมเลกุล ประมาณ 10 kD ดังนั้นโครงการนี้จึงเป็นการศึกษาโดยทำบริสุทธิ์พร้อมทั้งวิเคราะห์คุณสมบัติของสาร anti-candida ต่อ

อุปกรณ์และวิธีการ

a) แบบที่เรียที่ใช้ในการศึกษา

Reference strain *C. albicans*

b) วิธีทดสอบ

การทดสอบความสามารถของ โปรตีนยับยั้งแคนดิดาที่เตรียมได้จากน้ำยางสด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแคนดิดา ทำโดยใช้ microdilution technique นำ B-serum หรือ B-serum ในรูปของสารละลายตะกอนโปรตีนที่ตกในช่วง ความเข้มข้น acetone 40-60 และ 60-80% จะถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ undilute, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 ใน microtiter plate (โดยใช้ serum B 100 μ l เจือจางด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ 100 μ l ทำการเจือจาง serial dilution ปริมาตรสุดท้ายหลังการเตรียมเป็น 100 μ l) จากนั้นเติมแบบที่เรียหรือเชื้อราที่เตรียมไว้ (ที่ความเข้มข้นมาตรฐาน Mac Farland 0.5 ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ประมาณ $10^5 - 10^7$ ตัว/มล.) 50 μ l ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ที่ บรรยากาศปกติ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. ในการทดสอบทุกครั้งต้องมี positive control (ประกอบด้วย เชื้อที่ทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ) และ negative control (ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น)

c) การอ่านผลการทดสอบ

หลุมที่มีความขุ่นเท่า positive control มีผลเป็น + หลุมที่มีความใสเท่า negative control มีผลเป็น - และ ค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ให้ผลเป็นลบเป็นค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ของเชื้อนั้นๆ

d) การหาค่า MIC

ทำโดยใช้ Reference Method ของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Document M27, No.25 โดยปีเปิดอาหาร RPMI broth ปริมาตร 100 μ l ลงในหลุมบนแผ่น U-microtiter plate นำสารละลาย antimicrobial ที่ต้องการทดสอบไปทำ

serial dilution 1:2 ที่หลุมดังกล่าวตามลำดับ แล้วเติมเชื้อ ที่ต้องการทดสอบความขุ่น 0.5 McFarland ปริมาตร 50 μl ลงไปในหลุมดังกล่าวทุกหลุม ยกเว้นหลุม control จะเติมอาหารแทนเชื้อ นำ plate ไป incubate ที่อุณหภูมิ 35 °C หรือ อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง หากมีการเจริญเติบโตของเชื้ออาหารเหลวที่เลี้ยงจะมีความขุ่นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อ ในทางตรงกันข้ามหากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้ออาหารที่เลี้ยงจะโปร่งใส

e) การทดสอบ Inhibition

ใช้ loop เลือกโคโลนี *C. albicans* มา 4-5 โคโลนี จาก culture agar plate นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 35-37 °C ยกเว้น นาน 2-8 ชั่วโมง ปรับความขุ่นโดยใช้ sterile saline ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard ทำการเตรียมสารสกัด โดยใช้ micropipette ดูดที่ต้องการทดสอบอย่างมา 10 μl หยดลงบนแผ่น sterile disk ซึ่งวางอยู่บนตะแกรงเหล็กที่อยู่ใน sterile petri dish (หยดลงตรงกลาง) ทำการ inoculate เชื้อที่เตรียมได้ ลงใน SDA plate โดยวิธี streaking (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) แล้วใช้ Forceps คีบแผ่น disk ซึ่งมีสารตัวอย่างทดสอบอยู่ วางใน plate ที่มีเชื้อ incubate ที่ 35-37°C นาน 16-18 ชม. อ่านผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition Zone โดยใช้ Vernier caliber

f) การเตรียม B-serum สารตัวอย่างจากน้ำยางสด

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆโดยใช้ภาชนะแช่น้ำแข็งช่วยในการเก็บน้ำยาง เพื่อป้องกันการแตกของอนุภาคลูทอยด์) ไปแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge (45,000g , 45 min) เพื่อแยกน้ำยางออกเป็นชั้นบนที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง ชั้นกลางหรือส่วนใสของ cytosol (C-serum) และ ชั้นก้นหลอด (bottom fraction, BF) ทำการสลายอนุภาคของ BF ด้วยการ Freeze-thaw ซ้ำหลายครั้งที่อุณหภูมิ -20°C สลับกับอุณหภูมิห้อง บั่นแยกส่วนของเหลวที่ได้ (B-serum)

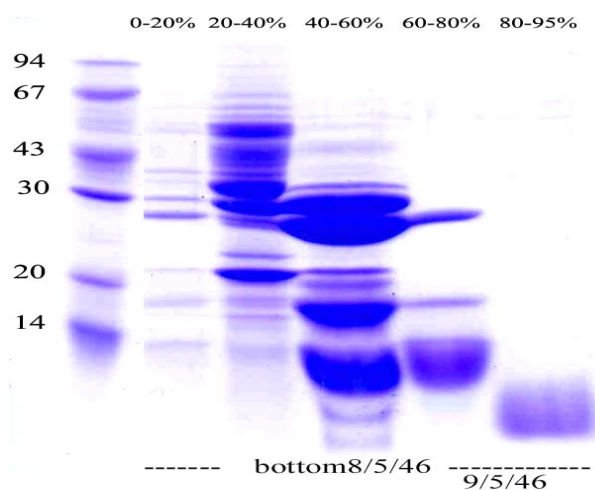
g) การทำบริสุทธิ์สาร anti-candida จาก B-serum

นำ B-serum ซึ่งเตรียมได้จากการนำ bottom fraction ที่ได้จากการบั่นแยกน้ำยางสด ไปผ่านการ freeze-thaw สลับกันหลายๆครั้งที่อุณหภูมิ -20°C และที่อุณหภูมิห้อง แล้วบั่นแยกเอาส่วนใสของ B-serum ไปตกตะกอนอะซีโตน เลือกช่วงที่มี anti-candida activity สูงสุด ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 70-80% ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยแยกผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex G-25

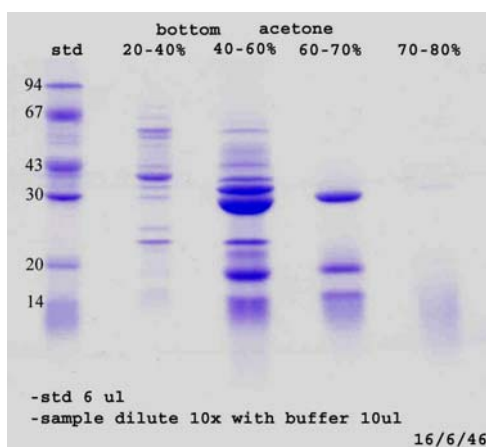
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

a) การทำบริสุทธิ์ และการวิเคราะห์มวลและกรดอะมิโนของ anti-candida protein

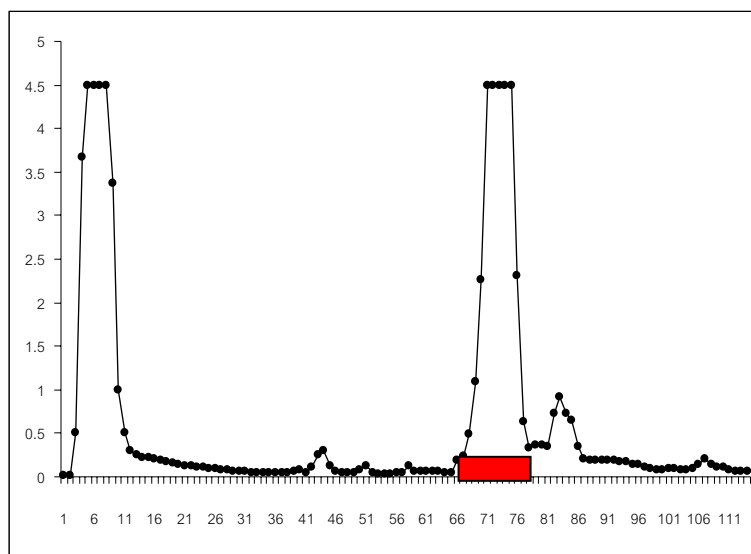
การทำบริสุทธิ์ anti-candida protein สามารถทำได้โดยการนำ bottom fraction ที่แยกได้หลังหารับแยกน้ำยางสด ไปผ่านการทำ acetone fractionation ซึ่งพบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความอิ่มตัวระหว่าง 60-80% จะมี anti-candida activity (รูปที่ D.1) เมื่อนำ active fraction นี้ไปทำ acetone fractionation ซ้ำใช้ถึงขั้น ปรากฏว่าได้ active fraction ในช่วงความอิ่มตัวระหว่าง 70-80% (รูปที่ D.2) โดยให้ค่า MIC ประมาณ 64 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ D.1) และหลังการนำไปวิเคราะห์โดย SDS-PAGE จะเห็นว่ามีแถบโปรตีนหลักเพียงแถบเดียว แต่เมื่อนำไปตรวจสอบโดยวิธี Mass Spec (รูปที่ D.3) พบว่ามีโปรตีนหลัก, peak height 10000 a.i., ช่วง 4.721 kD และมีโปรตีนรองที่ช่วง 3.817 kD (4760 a.i.) และ 4866 kD (4000 a.i.) ปนอยู่ด้วย (รูปที่ D.4) จึงได้นำไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยผ่าน DEAE-Sephadex G-25 column (รูปที่ D.5) ได้ active fraction ที่ให้ค่า MIC 27 $\mu\text{g/ml}$ เห็นโปรตีนเพียงแถบเดียวหลังการนำไปวิเคราะห์โดย SDS-PAGE และ เมื่อนำไปวิเคราะห์โดย Mass Spec (รูปที่ D.6) พบว่ามี peak โปรตีนหลัก peak height 25,000 a.i. ช่วง 4.717 kD และโปรตีนรอง peak height 7500 a.i. ช่วง 4.863 kD. จากผลนี้จึงซึ่งถือได้ว่า anti-candida protein ที่ได้มี น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4.717 kD.



รูปที่ D.1 SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้หลังการนำ bottom fraction ไปตกตะกอนด้วย acetone ช่วงความอิ่มตัว 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% และ 80-95% ตามลำดับ

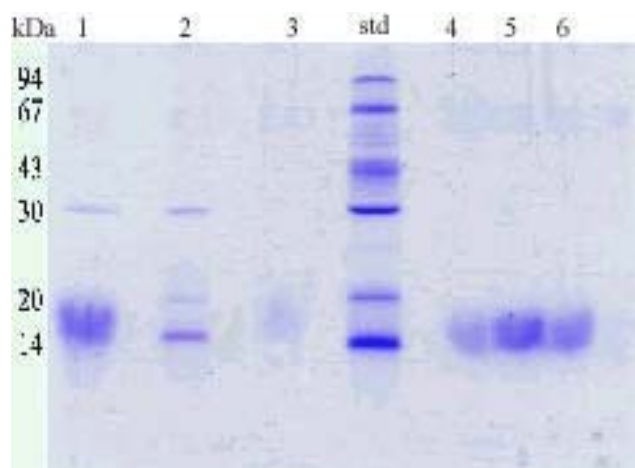


รูปที่ D.2 SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้หลังการนำ bottom fraction ไปตกตะกอนด้วย acetone ช่วงความเข้มข้น 20-40%, 40-60%, 60-70% และ 70-80% ตามลำดับ



รูปที่ D.3 การนำ anti-candida protein ที่ได้จากการตกตะกอนช่วงความเข้มข้นของ โปรตีน 70-80% ไปทำบริสุทธิ์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex G-25

 = anti-candida fraction



รูปที่ D.4 SDS-PAGE ของ anti-candida protein ที่ได้หลังการทำบริสุทธิ์ผ่าน DEAE Sephadex G-25

Lane ที่ 1 = anti-candida protein ที่ได้จากการตกตะกอนด้วย acetone ช่วงความเข้มข้น 70-80%

Lane ที่ 2-3 = unbound fractions

Lane ที่ 4-6 = eluted peak fractions of anti-candida protein

ตารางที่ D.1 Purification of anti-candida protein

Sample	Total protein (μg)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Yield (%)
70-80% acetone fraction	3820	64	100
DEAE-Sephadex A-25:			
Unbound fraction	3342	0	87
Eluted fraction	496	27	13

รูปที่ D 5 Mass spectrum ของ anti-candida protein ที่ได้จากตะกอนที่ตกด้วย acetone ช่วง ความเข้มข้น 70-80%

รูปที่ D 6 Mass spectrum ของ purified anti-candida protein ที่ได้จาก peak fractionของคอลัมน์ DEAE-Sephadex G-25

โดยพบว่า anti-candida บริสุทธิ์มีค่า MIC ประมาณ 27 ug/ml และมีน้ำหนักโมเลกุลที่วิเคราะห์ด้วย Mass Spec (4.717 kD) ที่สอดคล้องกับ hevein (รูปที่ D6) โดยผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบของกรดอะมิโน (ตาราง D. 2) ของสาร anti-candida บริสุทธิ์ และการเรียงตัวของกรดอะมิโนปลาย N-terminal ดังนี้ :

Anti-candida: EQCGRQAGGKL----- 11

Hevein EQCGRQAGGKLCNNLCCSQYGWCGSSDDYCSPSKNCQSNCKG 43

(CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment)

ดังนั้นสาร anti-candida ที่พบใน B-serum ก็คือ hevein ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น chitin binding protein และได้พบว่า มี anti-fungal activity ต่อเชื้อราที่ทำลายพืชหลายชนิด (Archer, B.L. ,1960) โดยไปเกาะจับกับ chitin บน cell wall ของเชื้อ การค้นพบว่า hevein มีฤทธิ์ anti- Candida เป็นการค้นพบใหม่ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อราฉวยโอกาสที่ก่อโรคในคน

ตารางที่ D.2 Amino acid composition ของ anti-candida protein เมื่อเปรียบเทียบกับ hevein

Amino acid (residue/mole)	Anti-candida	Hevein (Parijs et al., 1991)	Hevein (Archer, 1960)	Hevein (Walujono, 1975)
Ala	1	1.3	0.8	1
Cys	2	8	8	7.9
Asp	6.4	7.6	5.1	6.2
Glu	5.6	6	3.9	5.5
Phe	0	0.1	0	0
Gly	5	5.8	3.9	4.9
His	0.9	0.9	1.4	1.4
Ile	0.01	0.2	0	0
Lys	2.8	2.1	2.1	2
Leu	2	2.3	2.1	1.9
Met	0	0	0	0
Pro	2.1	2.5	2.1	1.9
Arg	0.9	1.2	1.9	1
Ser	3.4	3.5	5	3.7
Thr	0.9	1.1	0.9	0.9
Val	0	0.2	0.7	0
Try	0.9	1.1	1.9	1
Total	33.91	43.9	39.8	39.3

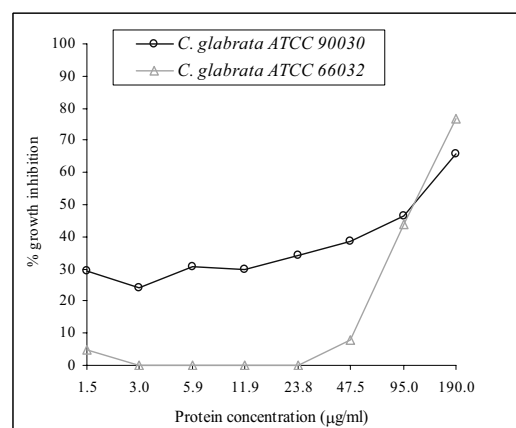
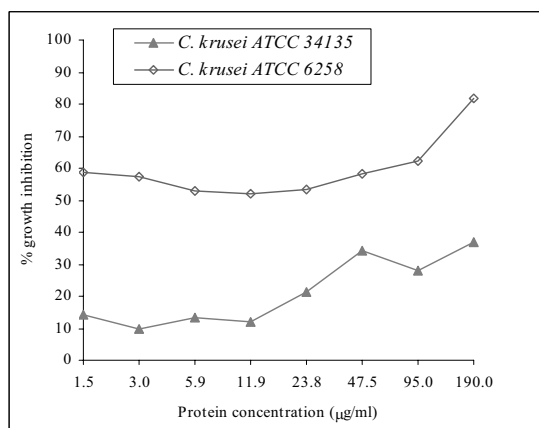
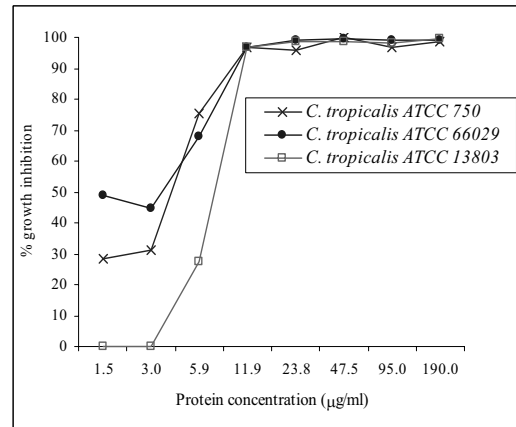
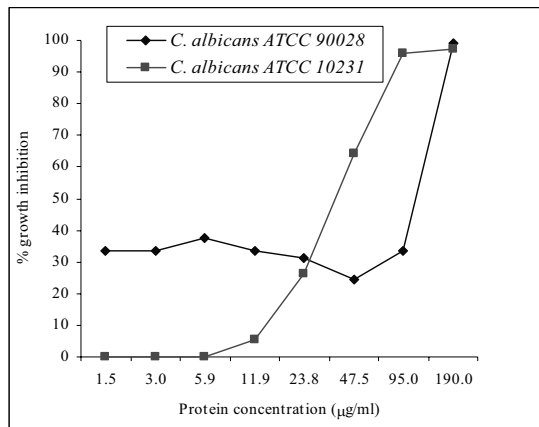
b) คุณสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งแคนดิดาของ anti-candida protein (hevein)

การทดสอบการออกฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้ง candida หลายสายพันธุ์ คือ *C. albican*, *C. tropicalis*, *C. krusei* และ *C. glabrata* พบว่า hevein สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้ง candida ได้ทุกสายพันธุ์โดยสามารถยับยั้ง *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. glabrata* > *C. krusei* ตามลำดับ (รูปที่ D.7) และจากการนำ *C. tropicalis* ซึ่งมีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วย hevein ได้ดีที่สุด มาทดสอบการความสามารถในการถูกเหนี่ยวการเกาะกลุ่มด้วย hevein พบว่า จะต้องความเข้มข้นของ hevein ประมาณ 30 µg/ml ถึงจะสามารถเห็นการเกาะกลุ่มของ *C. tropicalis* และต้องอยู่ในสภาพที่มี Ca^{2+} ผสมอยู่ด้วย โดยหากใช้สารคีเลเตอร์จำพวกมี EDTA ผสมลงทำลายฤทธิ์ Ca^{2+} ก็จะไม่สามารถเห็นการเกาะกลุ่มของ *C. tropicalis* (รูปที่ D.8) ซึ่งแสดงว่า hevein สามารถเกาะจับกับผนัง chitin ของ candida นอกจากนั้นเมื่อนำ chitotriose ซึ่งเป็น trimer ของ N-acetylglucosamine ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ chitin ก็พบว่าน้ำตาล chitotriose มีอิทธิพลยับยั้งการฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ candida (ตารางที่ D.3) ผลที่ได้เสริมกลไกการออกฤทธิ์ของ hevein โดยผ่านการเกาะจับกับผนัง chitin ของ candida

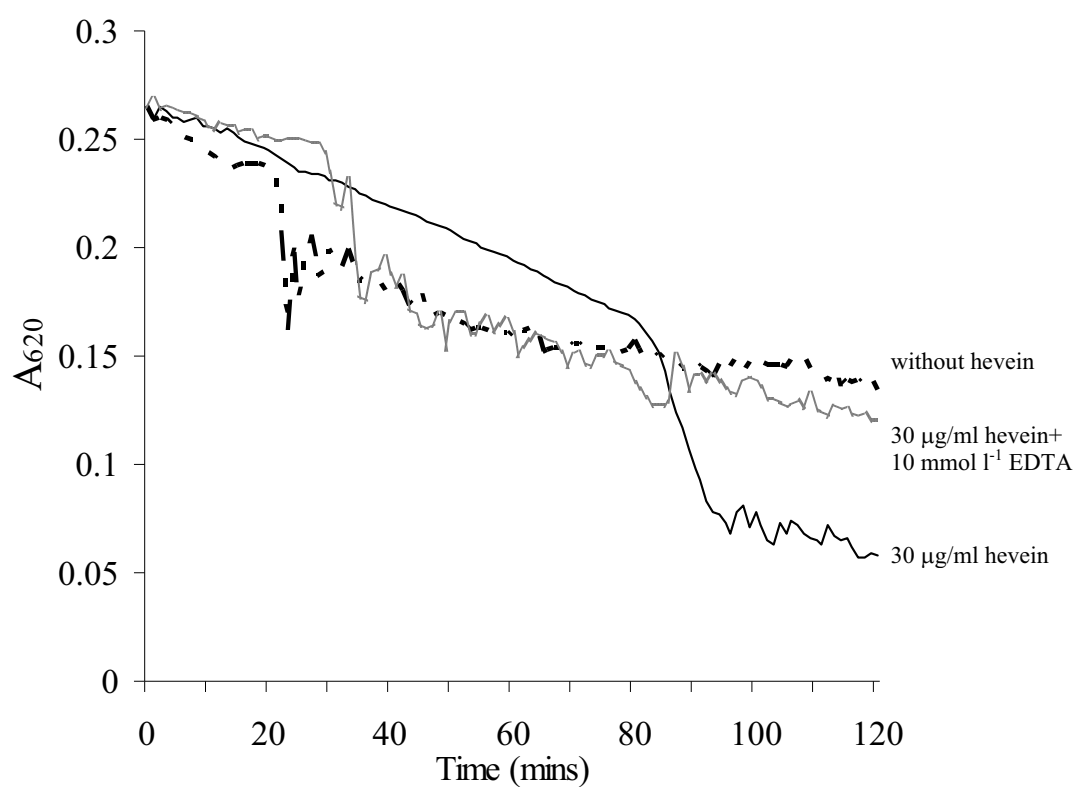
นอกจากนั้นยังพบว่า hevein มีคุณสมบัติที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีโดยสามารถทนต่ออุณหภูมิน้ำเดือดได้นานถึง 30 นาที (รูปที่ D. 9) และทนต่อสภาพ pH กรดและด่างได้ดี (รูปที่ D.10) และ ตัวยับยั้งโปรตีนเอสบริสซูที่แยกได้จากส่วนของ C-serum (Sritanyarat et al., 2006, Appendix 8) สามารถทำหน้าที่เสริมฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ candida (รูปที่ D.10)

ตารางที่ D.3 อิทธิพลของน้ำตาล chitotriose ที่มีต่อการออกฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้ง candida

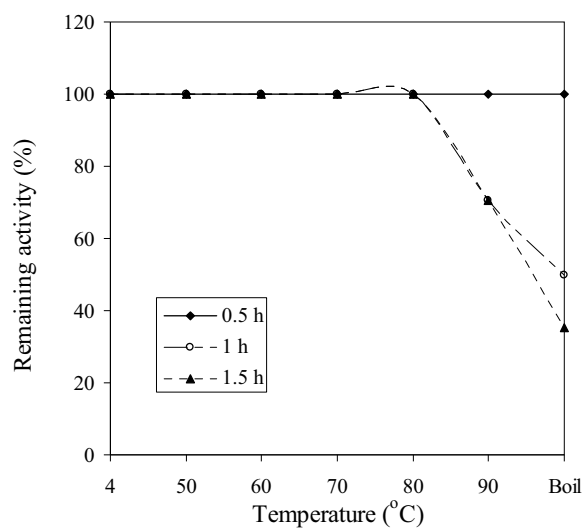
Treatment	Fungal growth inhibition (%)
Hevein Control	100
Hevein + Chitotriose (1 mM)	50
Hevein + Chitotriose (5 mM)	25
Hevein + Chitotriose (10 mM)	0



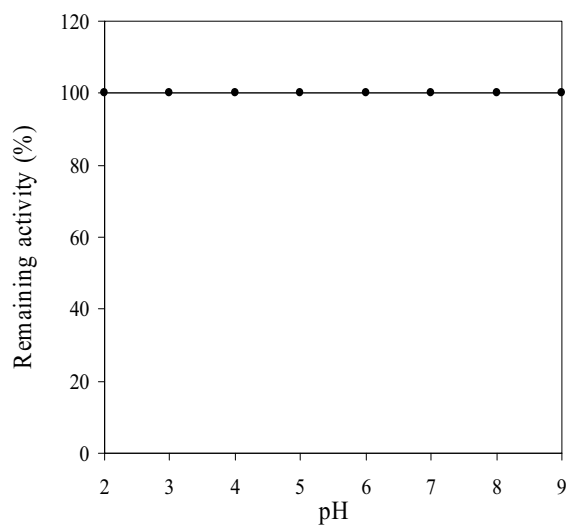
รูปที่ D.7 ฤทธิ์ของ hevein ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ candida species ต่างๆ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่ง ปราศจาก hevein (Kanokwiroon et al, 2008, Appendix 9)



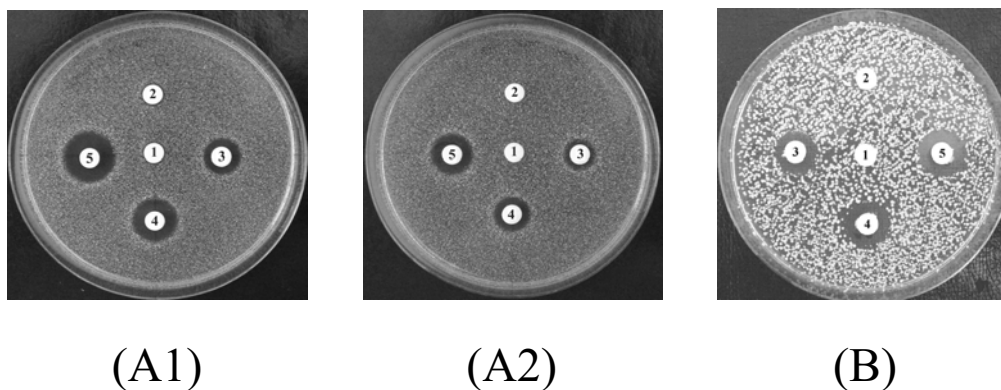
รูปที่ D.8 การเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของ candida โดย hevein ในบัฟเฟอร์ที่มี CaCl_2 1.5 mM (Kanokwiroon et al, 2008, Appendix 9)



รูปที่ D.9 ความเสถียรของ hevein ที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ D.10 ความเสถียรของ hevein ที่ pH ต่างๆ



รูปที่ D.11 (A) อิทธิพลของ hevein ในการยับยั้งการเจริญเติบโต (บริเวณโซนใส) ของ *C. tropicalis* ATCC 750 (A1) and *C. albicans* ATCC 10231 (A2) และ การเสริมอิทธิพลของ hevein ในการยับยั้งการเจริญเติบโต (บริเวณโซนใส) ของ *C. tropicalis* ATCC 10231 โดยสารยับยั้งโปรตีนจากน้ำยางพารา (HPI) สำหรับการทดลอง A1 และ A2 สารตัวอย่างใน discs 1 ประกอบด้วย 40 μ l ของ Tris-HCl buffer , discs 2-5 ประกอบด้วย hevein ปริมาณ 1, 5, 10 and 30 μ g ตามลำดับ ส่วนในการทดลอง B สารตัวอย่างใน discs 1 ประกอบด้วย 40 μ l ของ Tris-HCl buffer; disc 2 ประกอบด้วย 400 μ g ของ HPI; disc 3, 40 μ g ของ hevein; disc 4-5, 40 μ g ของ hevein ผสมกับ 200 และ 400 μ g ของ HPI ตามลำดับ(Kanokwiroon et al, 2008, Appendix 9)

References:

- Archer, B.L. (1960) The protein of *Hevea brasiliensis* latex 4. Isolation and characterization of crystalline Hevein. *Biochem J.* 75, 236-240.
- Kanokwiroon, K., Teanpaisarn, R., Wititsuwannakul, D., Hooper, A.B., Wititsuwannakul, R. (2008) Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. *Mycoses* (2008), doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01490.x (in press)
- Parijs, J.V ., Broekaert, W.F., Goldstein, I.J.,Peumans, W. (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Plata* 183, 258-264.
- Sritanyarat, W., Pearce, G., Siems, W.F., Ryan, C.A., Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D. (2005) Isolation and characterization of iso-inhibitor of the potato inhibitor I family from the latex of the rubber tree, *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 67, 1644-1650.
- Walujono, K., Acholma, R.A. and J.J. Beintema, J.J. (1975) Proceeding of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur, 518-531.

E. โครงการย่อย 5

การศึกษาสารออกฤทธิ์ของโปรตีนยับยั้งโปรตีเอส ต่อเชื้อก่อโรค และการประยุกต์ใช้ทาง การแพทย์

E.1 การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนยับยั้งโปรตีเอสจากน้ำยางพารา (*Hevea protease inhibitor, HPI*)

เนื่องจาก HPI เป็นสารยับยั้งโปรตีเอสตัวใหม่ที่มีอยู่ในน้ำยางจึงจำเป็นต้องทราบข้อมูล คุณสมบัติด้านกายภาพและชีวภาพก่อน เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เหมาะสม โดยเชื้อ

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมน้ำยาง

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆโดยใช้ภาชนะแช่น้ำแข็งช่วยในการเก็บน้ำยาง เพื่อป้องกันการแตกของอนุภาคลูทอยด์) ไปแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge (45,000g , 45 min) เพื่อแยกน้ำยางออกเป็นชั้นบนที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง ชั้นกลางหรือส่วนของ cytosol (C-serum) และ ชั้นก้นหลอด (bottom fraction, BF) ทำการแยกส่วนของเหลวที่เป็น C-serum และใช้ในการ purify PI

b) การทำบริสุทธิ์ HPI

นำ C-serum ที่แยกได้จากน้ำยางสดหลังการทำ ultracentrifugation ไปตกตะกอนด้วย acetone โดยใช้ช่วง % acetone saturation ดังนี้ 0-50, 50-70, 70-80 และ 80-95% ตามลำดับ นำช่วงความเข้มข้นที่ได้ PI สูงสุดไปใช้ในการเตรียม PI

c) การ assay HPI

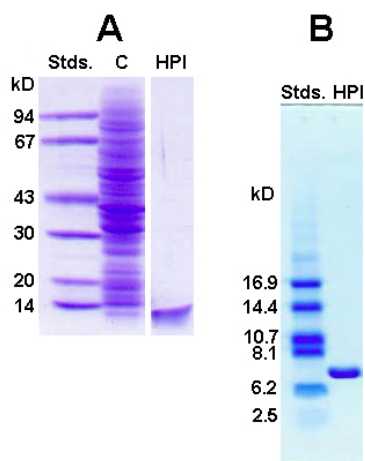
แอกติวิตีของ HPI สามารถวัดได้โดยดูจากความสามารถของ PI ในการยับยั้ง แอกติวิตีของเอนไซม์ โปรตีเอส เช่น trypsin หรือ gingipain ในการย่อย benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีสี โดยการทำให้ stock solution ที่ประกอบด้วย BAPNA จำนวน 30 mg ซึ่งละลายอยู่ใน dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วไป dilute 100 เท่าด้วย 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ก่อนใช้เป็น substrate solution นำ C-serum หรือ PI sample ไป preincubate กับ trypsin (ปริมาตร 100 μ l , 0.1 mg/ml ใน 50 mM Tris-HCl pH 7.5) ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที โดยมีปริมาตรรวม 300 μ l หลังจากนั้นเริ่ม incubation ด้วยการเติม BAPNA substrate solution ปริมาตร 500 μ l ที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetic acid 30% (v/v) ทำการวัดปริมาณของ p-nitroaniline ที่ ถูกสลายออกมาจาก BAPNA ที่ OD 410 nm. โดย 1 unit ของ PI activity จะเท่ากับปริมาณ ค่า O.D. ที่ 410 nm ที่ลดลง 0.1 หน่วย เมื่อเทียบกับ control ซึ่งมีแต่ trypsin หรือ gingipain อยู่ใน reaction mixture

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

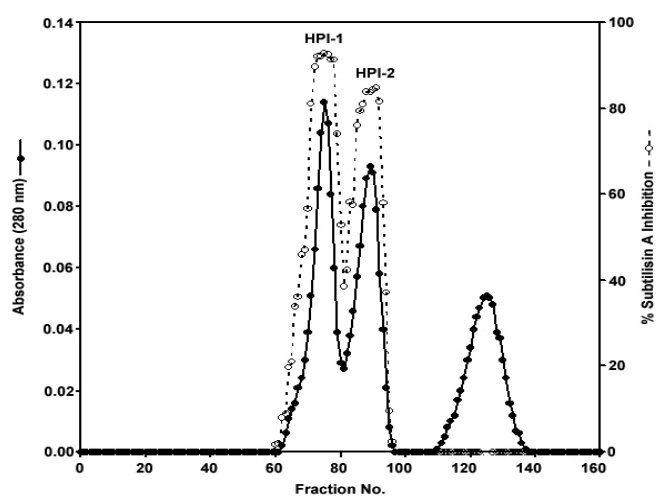
ได้ทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโน ของ protease inhibitor บริสุทธิ์ เพื่อการเปรียบเทียบกับ protease inhibitor ของพืชอื่นๆ การเตรียม protease inhibitor ให้บริสุทธิ์ อาศัยการตกตะกอน C-serum ด้วย acetone ที่ช่วงความเข้มข้นตัว 80-95% (รูปที่ E.1) แล้วนำไป purified ผ่าน คอลัมน์ Sephadex G-75 (รูปที่ E.2) ซึ่งสามารถแยกออกได้เป็น 2 isoprotease inhibitors (HPI-1 และ HPI-2) และได้้นำแต่ละ isoinhibitor ไป purified ผ่าน HPLC (รูปที่ E.3) โดยสามารถแยกได้ 3 isoinhibitors คือ HPI-1 , HPI-2a และ HPI-2b หลังจากนั้นได้นำไปวิเคราะห์หาการเรียงลำดับของกรดอะมิโน พร้อมทั้งเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับพืชอื่นๆ ดังผลในรูปที่ (E.4) นอกจากนั้นยังพบว่า HPI เป็น serine protease inhibitor ที่มีประสิทธิภาพต่ำหรือประมาณ 14.47-18.15% แต่เป็นมีประสิทธิภาพสูงหรือประมาณ 57.59 % ในการยับยั้ง pronase. (รูปที่ E.5 และตาราง E. 1) ของเชื้อ *Streptomyces griseus* ซึ่งประกอบไปด้วย proteases หลายชนิดได้แก่ endopeptidases (serine และ metalloproteases), exopeptidases (carboxypeptidase และ aminopeptidase), neutral protease, chymotrypsin, trypsin, carboxypeptidase, และ aminopeptidase

ตารางที่ E.1 ระดับการออกฤทธิ์ยับยั้ง protease ชนิดต่างๆโดย HPI

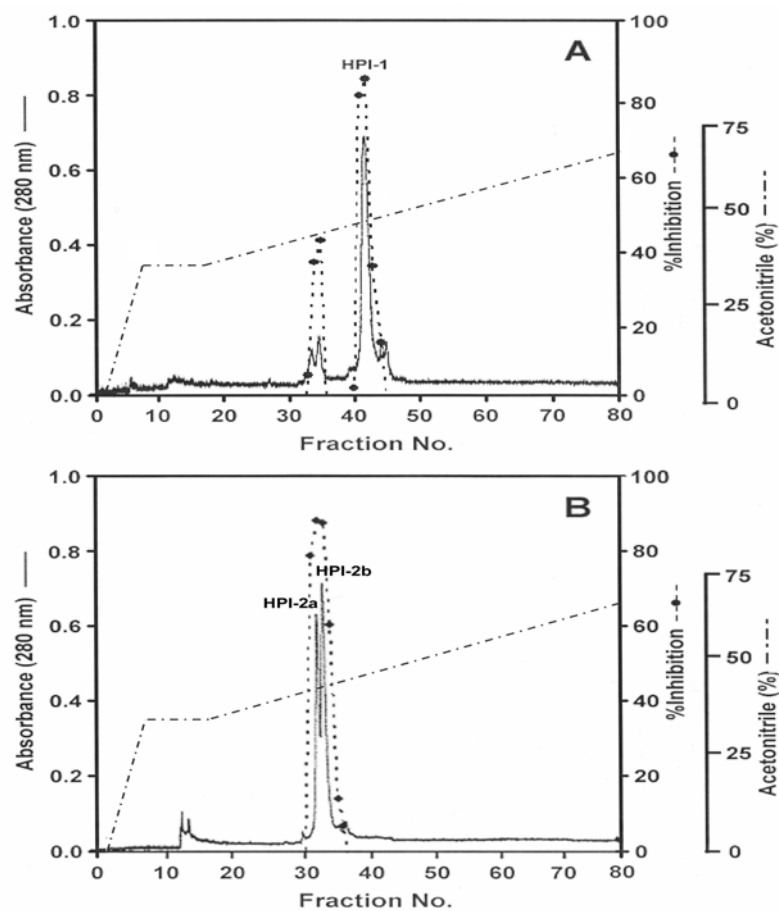
Type of Protease	Enzyme	Inhibition by HPI (%)
Serine protease	Trypsin	14.47
	Chymotrypsin	18.15
Metalloprotease	Thermolysin	4.61
Mix-proteases	Pronase	57.59
Cysteine protease	Papain	7.39
Aspartic protease (acid protease)	Pepsin	0
	Protease (<i>Aspergillus saitoi</i>)	0



รูปที่ E.1 SDS-PAGE (A) และ Tricine SDS-PAGE (B) ของ *Hevea* protease inhibitor (HPI) ที่ ได้จากการตกตะกอน C-serum ด้วย acetone ช่วงความเข้มข้น 80-95%



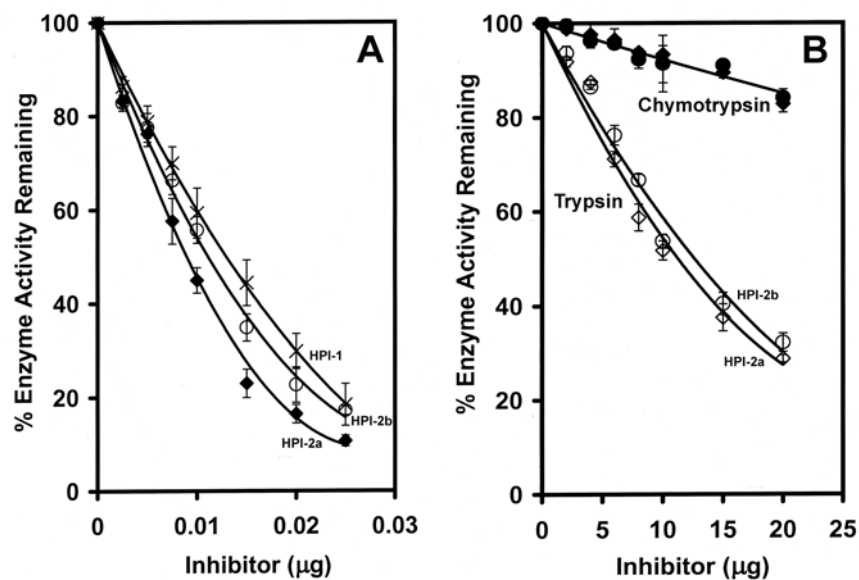
รูปที่ E.2 การนำ HPI จากรูป E.1 ไป purified ผ่าน Sephadex G-75 วิเคราะห์แอกติวิตีของ HPI จาก % การยับยั้ง subtilisin A โดยใช้ Azocasein เป็น สับสเตรท (Sritanyarat et al, 2006, Appendix 8)



รูปที่ E.3 การทำบริสุทธิ์ HPI-1 และ HPI-2 โดยการแยกด้วยคอลัมน์ C18-HPLC โดย
 ใช้น้ำ acetonitrile gradient ในสารละลาย 0.1% Trifluoroacetic acid แอคติวิตี
 ของ PI ทำโดยดู การยับยั้งการทำงานของ subtilisin A โดยใช้ azocasein เป็นสับสเตรท
 (Sritanyarat et al, 2006, Appendix 8)

	1	10	20	30	40	50	60	69	%Identity	Accession No.
HPI	-----<ASQCE	-----VKNSWPELVGTNGDIAAGIIQTENANVKAIVVKEG-	LPITQDLNFRVRVFDENRVVTQ-	VPAIG						
At	-----MSTCE	-----RKNSWPELVGTNGDYAAVIERENPTVNAAMILDG-	SPVTADFR	CDRVRFVDGNRIIVVK-	TEKSG				55	AAM61318
Citrus (45)-LKGVEDGPNLVTS	-----KFDCE	-----RKNSWPELVGKNGEVAATIEKENPCVHAH-	VLEGTFTKDYRIDRVVWVWKKGVIR-	VERIG					55	AAN76363
CMTI-V	-----<SSCE	-----GKNSWPELVGVGGSVAKAIIEERQNPVKAV-	ILEGTFTVKDFR	CDRVRIWVWVKGLVVS-	PRRIG				48	S12897
LUTI	-----<SRRC	-----GKNWPELVGKSNMAATVERENRVHAIIVLKEG-	SAMTKDFR	CDRVVIVVNDHGIVTS-	VRHIT				53	P82381
Elder	-----KMEACARRVSHGRDV	-----GKNWPELVGARGEEAAATVETENPSVTAVIVPEG-	SIVTDER	CDRVVWVVDENGIVTR-	VRVIG				53	CAA87073
BGIA	-----<SGCQ	-----GKRNPQLVGSTGAAAKAVIERENPRRAVIVRVG-	SEVTADFR	CDRVVWVTERGIVAR-	PFAIG				48	P24076
VvPR6	-----MASECE	-----GKNSWPELVGVQGEVAETIKRENPHITTVDILLEGTIVRQDFY-	CDRVVWVVDENGIVIS-	VEFIG					50	AAN85825
BWI-1	-----LRQCS	-----GKQENPELVGERGSKAAKIEENEDVRAIVLPEG-	SAVPRDLR	CDRVVWVVDERGVVD-	TEVVH				51	S66650
BGIT	-----<SRQ	-----GKNSWPELVGSTGAAAKAVIERENPRRAVIVRVG-	SGATKDFR	CDRVVWVTERGIVAR-	PPTIG				44	21112508
ATSI	-----MRECE	-----GKQENPELVGEYGYKAAKIEERENPVRSIVKHHR-	SGFTKDFR	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TERVT				47	P80211
TIMPa (26)-INVLRQ	-----LDVSGSGGPGVTKEKNPELLSTPAKFAMQIIQKENPKLTNVQTVLNGTFTVEDLR	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV						45	CAA78269
SPLTI	-----MQRITD	-----GKNSWPELVGVDAFLAKSTIEKENSPLYVVFQGE-	GETREYI	CDRVRLVVDGNNVIR-	TPSIG				41	AAK95644
PFCI	-----MAE	-----KNSWPELVGEDDEEAVKIIQENPSLDVILMPRGQHWATLDGR	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					48	CAA57203
TomE (31)-IEVSDGLNVLQVHDVSGSFC	PGVTKEKNPELLSTPAKFAMQIIQKENPKLTNVETLLNGSAPTEDLR	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEKVG						43	A32067
PFTI	-----MAE	-----KNSWPELVGKDEEAVKIIQENPSLDVILMPRGQHWATLDGR	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					46	CAA57307
ASI-I (8)-QEQNVPLPRNYKQALETHTP	-----TKTENPELVGVTAEQAEETKIEENMVDVQIQVSPHD-	SFVTADY	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					43	P16064
TomW (27)-DGPEV	-----IKLLKEFESDSRQKQ	QFNPELIGVPALYAKGIIIEKENPSITNPIILLNGSFVTKDFR	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					38	P16231
PI-1 (27)-DGPEV	-----IELQKEFECN	-----GKQENPELIGVPTKLAKGIIIEKENPSITNPIILLNGSFVTKDFR	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					37	P08454
CLSI-I	-----ST	-----RKTENPELVGVTAEEAE-KIKEENSGVEIQVPPG-	SFVTADY	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV				44	P81712
WSCI	-----TDTGDHNNQKTENPELVGKSVEEAKKVILQDKSEAIQVLPVG-	TIVTMEYRIDRVLFVD							34	P82977
CI-2A	-----MSSVEKKPEGVNTGAGDRHNLKTENPELVGKSVEEAKKVILQDKSEAIQVLPVG-	TIVTMEYRIDRVLFVD							35	P01053
MPI	-----MSSTEGGGGGGAAKTENPELVGKSVEEAKKVILQDKSEAIQVLPVG-	SFVTADY	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					39	CAA57677
VSI	-----***RTENPELVGVSAEEAR-KIKEKPEAEIQVPPG-	SFVTADY	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					39	1105220A
LTCI	-----MKLLFAIVALLALFLADISAVKTENPELVGETLEEAQAQILEDRPDAVIKQPEH-	SFVTADY	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					37	AAV35366
LIE	-----TEFG	-----SELKSFPEVVGKTVQAREYFTLHYPQYDVVFLPEG-	SEVTLDR	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV				38	ETLXCH
CI-1C	-----YPEPTEGSI GASGAKTENPELVGMSAEKAKETILRDKPNAQIEI	IPVD-AMVPLNF	CDRVVWVVDSTGVVVR-	TEQV					33	P01054

รูปที่ E.4 ตารางเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง protease inhibitor จากน้ำยาง HPI) กับพืชอื่นๆ [At, *Arabidopsis thaliana*; Citrus, grapefruit flavedo (Citrus x paradise); CMTI-V, pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*); LUTI, common flax seeds (*Linum usitatissimum*); Elder (*Sambucus nigra*); BGIA and BGIT, bitter gourd seeds (*Momordica charantia*); Grapevine, Grapevine (*Vitis vinifera*); BWI-1, buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum*); ATSI, amaranth seeds (*Amaranthus caudatus*); TIMPa, tobacco (*Nicotiana tabacum*); SPLTI, Sweet potato leaves (*Ipomoea batatas*); PFCI and PFTI, pumpkin fruit (*Cucurbita maxima*); TomE, tomato fruit (*Lycopersicon esculentum*); ASI-I, adzuki beans (*Vigna angularis*); TomW, tomato fruits of wild species (*Solanum peruvianum*); PI-1, potato (*Solanum tuberosum*); CLSI-I, beach canavalia seeds (*Canavalia lineate*); WSCI, bread wheat (*Triticum aestivum*); CI-2A and CI-1C, barley seeds (*Hordeum vulgare*); MPI, maize (*Zea mays*); VSI, broad bean (*Vicia faba*); LTCI, common earthworm (*Lumbricus terrestris*); LIE, eglin C from medicinal leech (*Hirudo medicinalis*)]. (Sritanyarat et al, 2006, Appendix 8)



รูปที่ E.5 (A) Titration of the three purified isoinhibitor forms of HPI (HPI-1, HPI-2a, and HPI-2b) against subtilisin A (B) Titration of HPI-2a ($\blacklozenge$, $\diamond$) and HPI-2b ($\bullet$, $\circ$) with trypsin (open symbols) and chymotrypsin (closed symbols). (Sritanyarat et al, 2006, Appendix 8)

E.2 การศึกษาคุณสมบัติของ HPI ต่อการยับยั้ง gingipain ของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis*

เนื่องจากเอนไซม์ gingipains เป็น extracellular protease ของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ทำหน้าที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อเหงือกและเป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontal disease) โดย gingipains จะทำการย่อยโปรตีนจำพวก อัลบูมิน และ โกลบูลิน IgG และ IgA ในเลือดโดยที่ทำหน้าที่หล่อเลี้ยงเหงือก และเป็นภูมิคุ้มกันให้กับเหงือกตามลำดับ ปัจจุบันพบว่าสุขภาพในช่องปากคนไทยเป็นปัญหาระดับชาติปัญหาหนึ่ง เนื่องจากประชาชนขาดความรู้ ความเข้าใจและการดูแลเอาใจใส่ที่ดีพอ จึงกลายเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดผลเสียทางเศรษฐกิจอื่น ๆ ตามมา ประชากรทางภาคใต้ของไทยในจังหวัดสงขลา มีความเสี่ยงต่อสภาวะโรคปริทันต์ในระดับสูง โดยพบว่าร้อยละ 84-93 มีสภาวะโรคปริทันต์อักเสบเล็กน้อยถึงปานกลาง และ ร้อยละ 10-30 มีสภาวะโรคระดับรุนแรง

เอนไซม์ gingipains ประกอบด้วย Arg-gingipain (Rgp) and Lys-gingipain (Kgp) จัดอยู่ในกลุ่ม cysteine proteases ที่มีกิจกรรมประเภท "trypsin-like" จากตารางที่ E.1 จะเห็นว่า HPI สามารถยับยั้ง protease ทั้งชนิด trypsin และ cysteine proteases ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะประเมินความสามารถในการยับยั้ง gingipains ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมเชื้อ *P. gingivalis*

ทำการเลี้ยงเชื้อ *P. gingivalis* W50 และ *P. gingivalis* ATTC 33277 ในอาหาร brain heart infusion broth (BHI) ที่เสริมด้วย yeast extract, hemin และ vitamin k แล้วนำไปเลี้ยงภายใต้บรรยากาศ H_2 10%, CO_2 10% และ N_2 80% อุณหภูมิ $37^\circ C$ เป็นเวลา 3 วัน

b) การสกัดเอนไซม์ gingipain ของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis*

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ *P. gingivalis* ที่มีอายุ 3 วัน ทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ 10,000 rpm นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้และนำไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนที่ความเข้มข้น 60% จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บตะกอนที่ได้ที่ 10,000 rpm นาน 20 นาที ตะกอนที่ได้จะถูกนำมาเป่าเพื่อไล่อะซิโตนออกด้วยแก๊สไนโตรเจนจากนั้นนำมาละลายใน 50 mM Tris-HCl pH 7.4 และนำไปไดอะไลซ์ใน 50 mM Tris-HCl pH 7.4 นาน 24 ชั่วโมงที่ $4^\circ C$

จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้นโดยอาศัย CM cellulose ดูดน้ำออกจาก dialysis bag ทำการกำจัดส่วนที่ไม่ละลายออกโดยนำไปหมุนเหวี่ยง และเก็บสารละลายโปรตีน (crude gingipain) ไว้ที่อุณหภูมิ $-20^\circ C$

c) การทดสอบการยับยั้ง gingipain ด้วย HPI

ดัดแปลงตามวิธีของ Gusman et al. (2000) แอคติวิตีของตัวยับยั้ง gingipain สามารถวัดได้โดยดูความสามารถในการลดความสามารถของ Arg-gingipain ต่อการย่อย สับ

สาร benzoyl-Arg-p-nitroanilide (BAPNA) (0.5 mM) ซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 ที่ประกอบด้วย 1 mM CaCl_2 , 50 mM L-Cysteine และ Lys-gingipain สำหรับการย่อยสลายสาร N-p-tosyl-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide (Lys-pNA) (0.5 mM) ซึ่งละลายอยู่ใน 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ที่ประกอบด้วย 5 mM L-Cysteine

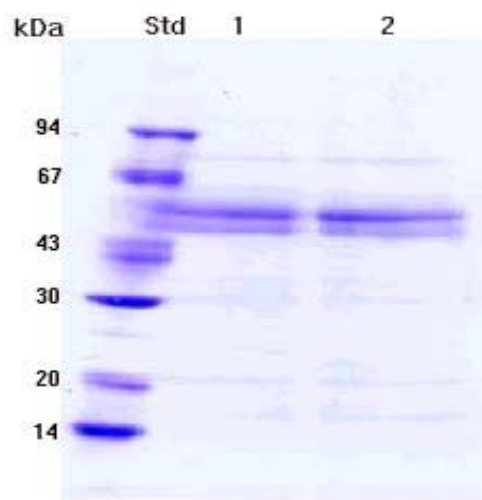
นำ HPI ที่ได้จากการตกตะกอน C-serum ในช่วงความเข้มข้น 80-95% มาทำการเจือจางแบบลำดับสอง (2-fold serial dilution) และนำไปปฏิกิริยากับ crude gingipain เชื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเติมสารตั้งต้นไป แล้วนำไปปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetic acid 30% (v/v) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร กำหนดให้ความว่องไวของเอนไซม์ 1 หน่วยเท่ากับ 1 ไมโครโมลของ p-nitroanilide ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายสารตั้งต้นเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหาค่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์จึงนิยามเป็นร้อยละ 50 (IC_{50})

การศึกษาผลการยับยั้งของตัวยับยั้งอื่นๆ คือ 0.1 mM p-chloromercuribenzoic acid, 0.1 mM N-Ethylmaleimide, 0.5 mM Leupeptin, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM Iodoacetamide และ 0.01 g/ml Trypsin inhibitor from soybean ทำโดยนำตัวยับยั้งที่ต้องการทดสอบมาทำการเจือจางแบบลำดับสองและปฏิกิริยากับ gingipain เพื่อหาค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ดังวิธีการที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

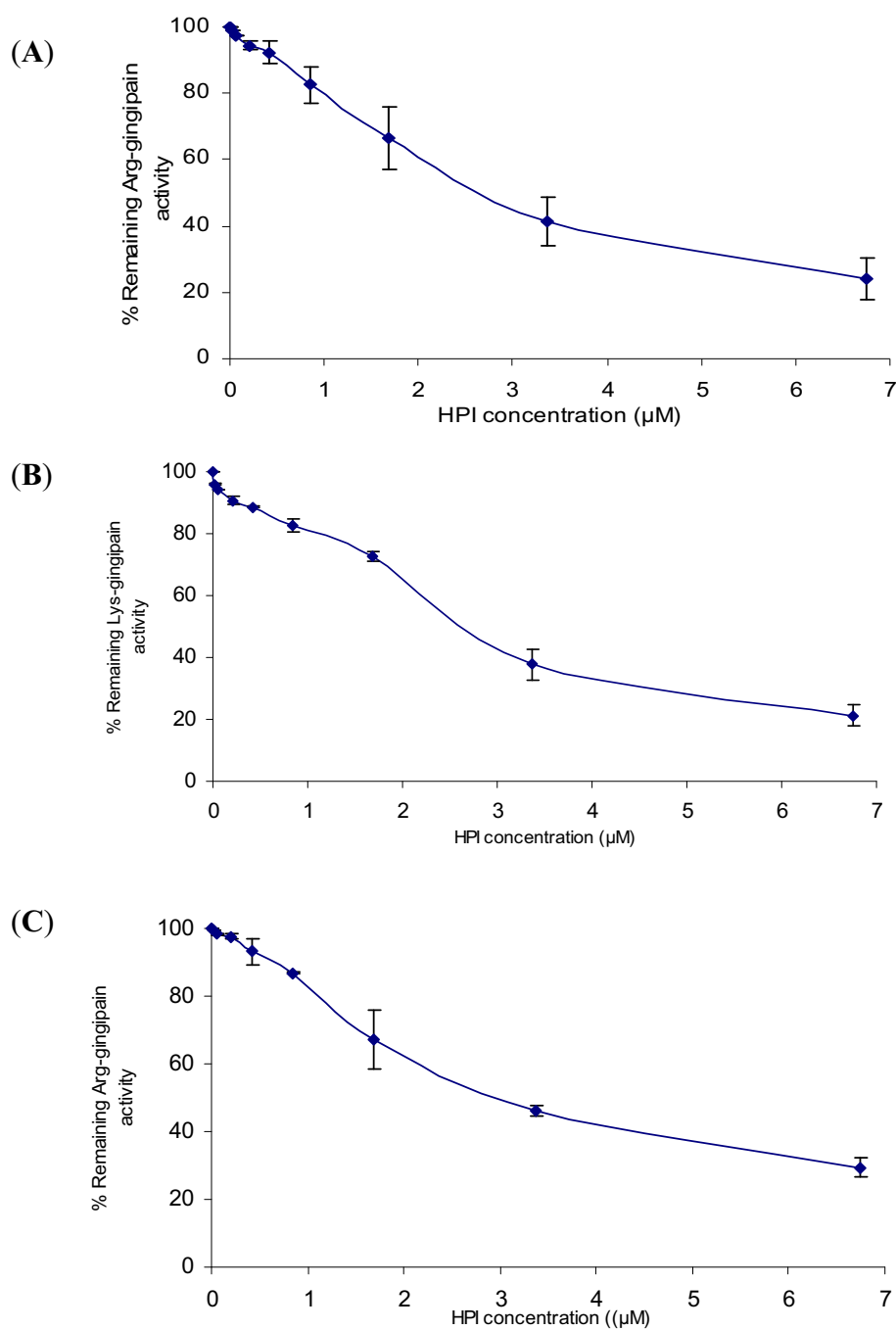
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการสกัด crude protease (gingipain) จากส่วนของน้ำเลี้ยงที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งในสภาพที่เกิดโรคปริทันต์อักเสบ (periodontal disease) gingipain จะทำหน้าที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อเหงือก โดยนำน้ำเลี้ยงไปตกตะกอนด้วย acetone ที่ความเข้มข้น 60% แล้วนำตะกอนโปรตีนไปวิเคราะห์โดยการทำ SDS-PAGE จะเห็นแถบโปรตีนหลักช่วงที่ตรงกับน้ำหนักโมเลกุลของ gingipain ประมาณ 44 -51 kD (รูปที่ E.6) เมื่อนำ HPI ไปยับยั้ง arg- และ lys-gingipain ใน crude gingipain ที่เตรียมได้ พบว่าสามารถยับยั้งได้ โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งขึ้นตรงกับปริมาณ protease inhibitor (รูปที่ E.7) โดยค่า specific inhibition หรือ IC_{50} ต่อ Arg- และ Lys-gingipain ของเชื้อ *P. gingivalis* 33277 เท่ากับ $1.387 - 2.663 \pm 0.548 \mu\text{M}$ และ $1.279 - 2.458 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ตามลำดับ และโดยค่า IC_{50} ต่อ Arg-gingipain ของเชื้อ *P. gingivalis* W50 เท่ากับ $1.478 - 2.838 \pm 0.37 \mu\text{M}$ แต่ไม่พบค่าแอกติวิตี lys-gingipain ของ *P. gingivalis* W50 (ตารางที่ E.1) จากรายงานผลการวิจัย leupeptin เป็น cysteine proteinase inhibitor ที่ได้จากเชื้อ Actinomycetes สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีนเอสที่จำเพาะกับ arg-gingipain ซึ่งสามารถยับยั้งการสลาย collagen โดย *P. gingivalis* ได้เกือบหมด (ref.....) การที่ HPI สามารถยับยั้ง arg-gingipain ได้ใกล้เคียงกับ leupeptin (ตารางที่ E.2, E.3) แสดงว่า HPI มีศักยภาพสำหรับใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรค

ปรีทันท็อกเสบได้ดีพอๆกับ leupeptin โดยอาจใช้เสริมหรือแทนยาปฏิชีวนะ tetracycline, doxycycline และ chlorhexidine ซึ่งเป็นตัวยาที่ทำหน้าที่ยับยั้ง collagenase activity ของ arg-gingipain ซึ่งยาปฏิชีวนะดังกล่าวมักส่งผลข้างเคียงต่อผู้ใช้ โดยทำให้สีเนื้อฟันหม่น เกิดอาการแสบบริเวณเยื่อช่องปาก หรือ บางครั้งก็ส่งอิทธิพลต่อการแปรเปลี่ยนประสาทรับรสอาหารด้วย นอกจากนี้จะทำให้เชื้อรา *Candida albicans* ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณลิ้น เจริญเติบโตได้รวดเร็วยิ่งขึ้น และทำให้เกิดโรคติดเชื้อ candidiasis ในช่องปาก (oral candidiasis) ซึ่งพบว่าคนไทยมีความชุกของโรคนี้ ร้อยละ 10



รูปที่ E.6 SDS-PAGE ของโปรตีนพบหลังการนำส่วนของน้ำเลี้ยงของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* มาตกตะกอนด้วย acetone ที่ความอิ่มตัว 60%



รูปที่ E.7 กราฟการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Arg และ Lys-gingipain ด้วย HPI
 A-B = การยับยั้งกิจกรรมของ Arg- และ Lys-gingipain ของเชื้อ *P. gingivalis* 33277
 C = การยับยั้งกิจกรรม Arg-gingipain ที่แยกจากเชื้อ *P. gingivalis* w50
 ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) จากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ

ตารางที่ E.2 แสดงค่าการยับยั้งแอกติวิตีที่ร้อยละ 50 ของ arg- และ lys-gingipain โดย HPI

Microorganism	50% Inhibitory concentration (IC ₅₀)	
	BAPNA hydrolysis (arg-gingipain)	Z-lys-PNA hydrolysis (Lys-gingipain)
P.gingivalis ATCC 33277 Crude gingipain + HPI	1.387 – 2.663±0.548 μ M	1.279 – 2.458±0.06 μ M
P.gingivalis W50 Crude gingipain + HPI	1.478 – 2.838±0.37 μ M	*

* no detectable enzyme activity

ตารางที่ E.3 ค่าการยับยั้งที่ร้อยละ 50 ของตัวยับยั้งต่าง ๆ ต่อเอนไซม์ gingipain

Inhibitor	IC ₅₀
p-Chloromercuribenzoic acid	1.52 ±0.375 mM
N-ethylmaleimide	5.59 ±0.296 mM
Iodoacetamide	3.24 ±0.0035 mM
EDTA	1.12 ±0.311 mM
Leupeptin	1.43 ±0.216 μ M
Trypsin inhibitor from soybean	44.75 ±7.53 μ M
HPI	2.912– 5.59 ±0.296 μ M

E.2 การศึกษาคุณสมบัติของ HPI ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ hepatitis B virus (HBV)

เนื่องจากเอนไซม์ protease NS3 เป็น chymotrypsin-like serine protease ที่จำเป็นสำหรับ proliferation หรือ replication cycle ของ HBV และ HPI จากน้ำยางพารามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง chymotrypsin (ตารางที่ E.1 และรูปที่ E.5) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะประเมินฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้ง HBV

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ PLC/PRF/5

สารเลี้ยงประกอบด้วย MEM (EBSS) + 10% FBS + 2mM L-Glutamine + 1% non-essential amino acids ทำการเลี้ยงที่ 37 °C ภายใต้ 5% CO₂

b) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง HBsAg

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง HBsAg: ทำโดยเตรียมเซลล์ PLC/PRF/5 ที่ความหนาแน่น 10⁵ cell/ ml ใน 24 well plate หลุมละ 1 ml บ่ม 37 °C , 24 ชม. , ดูด supernatant ทิ้ง และเติม 1 ml HPI (5.24 mg/ml) ที่ละลายใน 2% MEM โดยมีสัดส่วนการเจือจาง 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1: 320, 1:640, 1:1280, และ 1:2560 ตามลำดับ บ่ม 37 °C , 24 ชม. แล้วนำ supernatant มาวัด OD 450 เพื่อหาปริมาณ HBsAg ที่ลดลง เทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงใน 2% MEM โดยไม่มี HPI

การวิเคราะห์ปริมาณ HBsAg ใช้ชุดทดสอบ Monolisa Ag-HBs Plus ของ Diagnostics Pasteur (France) โดยนำ ELISA plate ที่เคลือบด้วย anti-HBsAg monoclonal antibodies ซึ่งมี 3 ชนิด เติมน้ำละลายตัวอย่างที่ต้องการหา HBsAg ลงในหลุม แล้วบ่มที่ 37° C เพื่อให้เกิดการจับกันระหว่าง HBsAg และ anti-HBsAg ทำการล้าง plate ด้วยน้ำกลั่นทั้งนี้เพื่อขจัดแอนติเจนที่เหลือ เติมน้ำ anti-HBsAg monoclonal antibodies peroxidase conjugate ซึ่งมี 2 ชนิด และต่างจาก 3 ชนิดแรกลงในหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40° C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการล้าง plate ด้วย(Tris/NaCl, pH 7.4) จากนั้นเติมน้ำละลายที่เป็น developer (hydrogen peroxide และ O-phenylenediamine dihydrochloride) ลงไป แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลาไม่เกิน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 2 M หลุมละ 50µl จากนั้นประเมินปริมาณ HBsAg โดยอ่านค่าความเข้มข้นสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น(ค่าO.D.)ในแต่ละหลุมของ ELISA plate ที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับค่า O.D. ที่ได้จาก มาตรฐาน HBsAg ที่ใช้เป็น positive control

c) การทดสอบฤทธิ์ anti-proliferation ของ HPI ที่มีต่อ PLC/PRF/5

การทดสอบฤทธิ์ anti-proliferation ทำโดยการวัดปริมาณ cell proliferation และ cell viability โดยดูการ cleavage ของเกลือ tetrazolium WST-1 เปลี่ยนเป็น formazan (สีดำแดง) โดยอาศัยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ใน viable cells โดย เตรียมเซลล์

PLC/PRF/5 ที่ความหนาแน่น 10^5 cell/ml ใน 96 well plate หลุมละ 100 μ l บ่ม 37 °C , 24 ชม., ดูด supernatant ทิ้ง และเติม 100 μ l HPI ที่ละลายใน 2% MEM โดยมีสัดส่วนการเจือจาง 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1: 320, 1:640, 1:1280, และ 1:2560 ตามลำดับ บ่ม 37 °C , 24 ชม., เติม WST-1 10 μ l ทุกหลุม บ่ม 4 ชม. 37 °C ทำการเขย่า 1 นาที แล้วทำการวัดค่า ดูดกลืนแสงที่ 450 nm

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากผลการวิจัยซึ่งได้นำ HPI กิ่งบริสุทธิ์ ที่เตรียมได้จากการนำ C-serum โดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตนในช่วงความอิ่มตัว 80-95% ไปทดสอบดูฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง HBsAg (ตารางที่ E.3, รูปที่ E.3) จากการวัดหา hepatitis B antigen ด้วยวิธี Monolisa Ag HBs พบว่า HPI สามารถยับยั้งการสร้าง HBsAg ของเซลล์ PLC/PRF/5 โดยค่า IC_{50} คิดเป็น dilution ratio ประมาณ 1:74 หรือ ความเข้มข้น HPI ประมาณ 70 μ g/ml (9.3 μ M) นอกจากนั้นเมื่อนำ HPI ไปทดสอบดูฤทธิ์ anti-proliferation ที่มีต่อ PLC/PRF/5 พบว่า HPI จากน้ำยางมีฤทธิ์ anti-proliferation โดยค่า IC_{50} คิดเป็นสัดส่วนการเจือจาง 1: 36 หรือ ความเข้มข้น 145.36 μ g/ml (19 μ M) (ตารางที่ E.4 , รูปที่ E.4)

ตารางที่ E.3 เปอร์เซนต์การยับยั้งปริมาณการผลิต HBsAg ที่สัดส่วนการเจือจางต่างๆ ของสารละลาย HPI ของเซลล์ PLC/PRF/5

Dilution ratio 1:	Assay			%Inhibition
	No. 1 (OD ₄₅₀)	No.2 (OD ₄₅₀)	Average(OD ₄₅₀)	
2560	3.85	3.859	3.855	3.64
1280	4	3.972	3.986	0.35
640	3.866	4	3.933	1.68
320	3.156	4	3.578	10.55
160	2.807	2.977	2.892	27.70
80	2.203	2.76	2.482	37.96
40	1.4	1.311	1.356	66.11
20	0.869	0.845	0.857	78.58
10	0.778	0.188	0.483	87.93
5	1.295	1.011	1.153	71.18
Control Test	4.00			

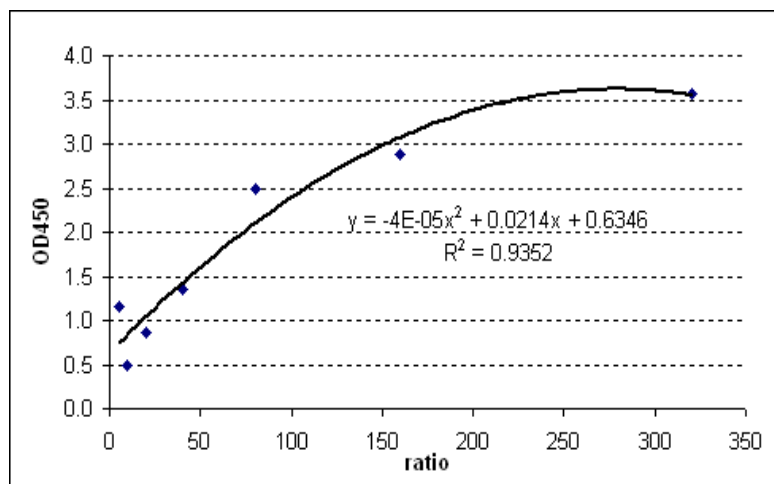
จากความสำเร็จที่สามารถใช้ aspartic protease inhibitor ในการกำจัด HIV ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นในทำนองเดียวกันเราก็จะสามารถใช้ HPI ในการกำจัด HBV ได้เช่นกัน โดยอาจใช้ใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาป้องกันหรือยับยั้งการรุกรานของ HBV ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ HPI ทำลาย HBV ออกจากภาชนะที่สัมผัสกับผู้ป่วย เพื่อป้องกันการติดต่อของโรคได้อีกด้วย

ตารางที่ E. 4 Anti-proliferation activity ต่อเซลล์ PLC/PRF/5 ที่สัดส่วนการเจือจางต่างๆ ของสารละลาย HPI*

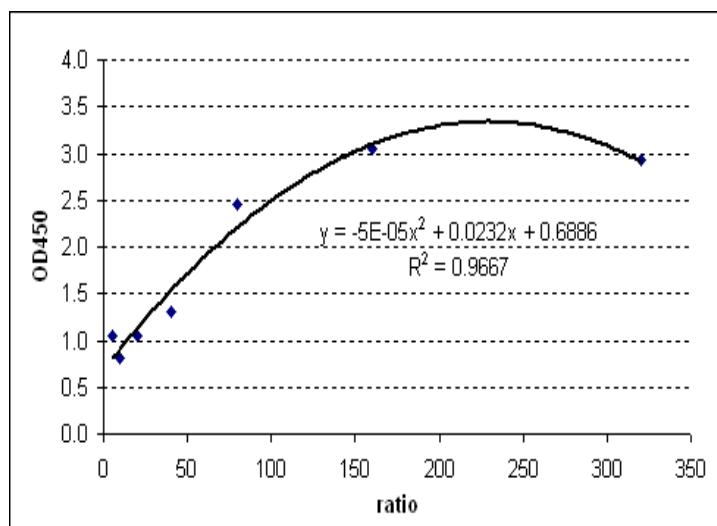
%Proliferation of PLC/PRF/5*

Dilution 1:	%
5	64.358
10	72.500
20	63.733
40	55.454
80	16.096
160	-4.144
320	-0.043
640	-0.788
1280	-6.147
2560	-0.094

dilution	1	2	3	4	ave	sd
5	0.617	0.633	0.677	0.677	0.651	0.031
10	0.496	0.576	0.517	0.517	0.527	0.034
20	0.463	0.478	0.462	0.462	0.466	0.008
40	1.174	1.507	1.616	1.616	1.478	0.209
80	2.107	2.294	2.526	2.526	2.363	0.203
160	2.031	2.427	2.376	2.376	2.303	0.183
320	1.950	2.232	2.281	2.242	2.176	0.152
640	2.294	2.316	2.417	2.325	2.338	0.054
1280	2.157	1.929	2.343	2.438	2.217	0.225
2560	2.118	2.362	2.344	2.316	2.285	0.113
control	2.040					



รูปที่ E.3 Monolisa Ag HBs Assay :กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD450 สัดส่วนการเจือจางสารละลาย HPI



รูปที่ E.4 Anti-proliferation assay: กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD450 สัดส่วนการเจือจางสารละลาย HPI

E.2 การศึกษาคุณสมบัติของ HPI ต่อการเสริมฤทธิ์ hevein ในการยับยั้งแคนดิด้า

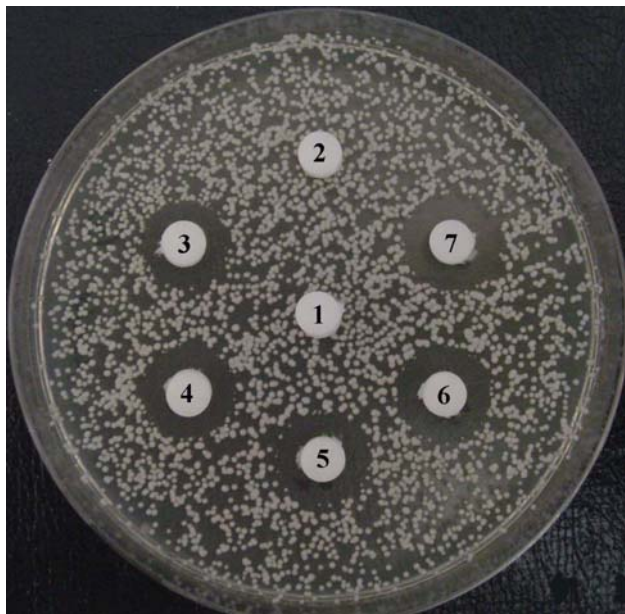
เนื่องจาก HPI ไม่สามารถยับยั้ง aspartic protease (ตารางที่ E.1) ซึ่งเป็น extracellular protease ของแคนดิด้า แต่ HPI สามารถยับยั้ง pronase ซึ่งประกอบไปด้วย proteases หลายชนิดได้แก่ endopeptidases (serine และ metalloproteases), exopeptidases (carboxypeptidase และ aminopeptidase), neutral protease, chymotrypsin, trypsin, carboxypeptidase และ aminopeptidase เนื่องจาก aminopeptidase ก็เป็นหนึ่งใน intracellular protease ของแคนดิด้า โดยเมื่อแคนดิด้าตายลง aminopeptidase ก็จะมีโอกาสย่อยหรือทำลายฤทธิ์ของ hevein ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะประเมินการเสริมฤทธิ์ของ hevein โดย HPI

อุปกรณ์และวิธีการ

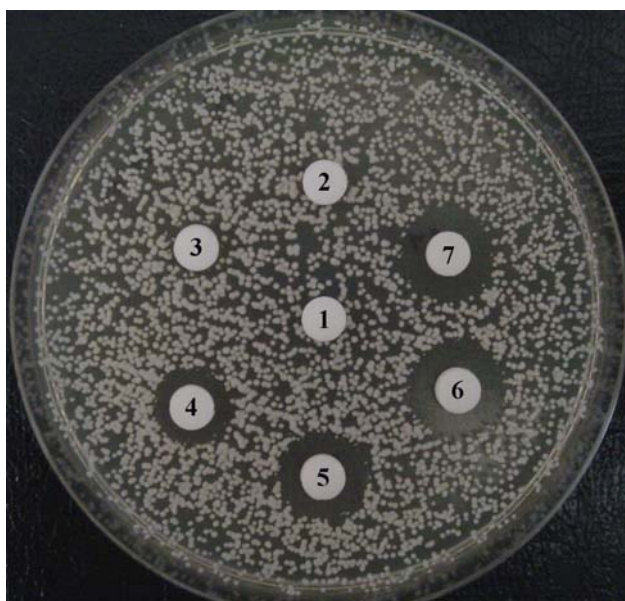
รายละเอียดวิธีการเลี้ยงแคนดิด้าเหมือนในโครงการย่อย 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากผลที่ได้ พบว่า HPI สามารถไปเสริมฤทธิ์ anti-candida ของ hevein (รูปที่ E.5) ดังนั้น HPI อาจทำหน้าที่ยับยั้ง intracellular proteases ของเชื้อแคนดิด้า ช่วยป้องกันไม่ให้ hevein ถูกทำลาย ทำให้ hevein สามารถออกฤทธิ์ได้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ถึงแม้ว่า hevein เป็นสารก่อภูมิแพ้ ซึ่งไม่สามารถประยุกต์ใช้ในการรักษาทางการแพทย์ แต่ข้อมูลที่ได้นี้ทำให้สามารถประยุกต์ใช้ HPI เสริมฤทธิ์ยา anti-candida ประเภทเบปไทด์อื่นๆได้ เช่น histatin



- 1 = Control DW
- 2 = PI 400 μ g + DW
- 3 = Hevein 40 μ g + DW
- 4 = Hevein 40 μ g + PI 100 μ g
- 5 = Hevein 40 μ g + PI 200 μ g
- 6 = Hevein 40 μ g + PI 300 μ g
- 7 = Hevein 40 μ g + PI 400 μ g



- 1 = Control DW
- 2 = PI 300 μ g + DW
- 3 = PI 300 μ g + hevein 10 μ g
- 4 = PI 300 μ g + hevein 20 μ g
- 5 = PI 300 μ g + hevein 30 μ g
- 6 = PI 300 μ g + hevein 40 μ g
- 7 = DW + hevein 40 μ g

รูปที่ E.5 การเสริมฤทธิ์ anti-candida ของ hevein โดย HPI

F. โครงการย่อย 6

การเตรียม สารยับยั้งแคนติต้าและสารยับยั้งโปรตีเอสในปริมาณสูงจากน้ำยางพาราและการทดสอบระดับพรีคลินิก

จากรายงานผลวิจัยในโครงการย่อย 4 (การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต้านเชื้อแคนติต้าจากน้ำยางพารา) ได้พบว่าสารยับยั้งแคนติต้า คือ hevein ซึ่งเป็น latex allergen (Hev b 6) หรือ สารที่ทำให้เกิดการแพ้ จึงไม่มีประโยชน์ที่จะทำการเตรียมในปริมาณสูงเพื่อการทดสอบระดับพรีคลินิก แต่จากรายงานในโครงการย่อยโครงการย่อย 5 (การศึกษาการออกฤทธิ์ของโปรตีนยับยั้งโปรตีเอส ต่อเชื้อก่อโรคและการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์) ได้พบว่าโปรตีนยับยั้งโปรตีเอส จากยางพารา (protease inhibitor, HPI) สามารถออกฤทธิ์ 1) ยับยั้งเอนไซม์ gingipain ที่หลั่งออกมาจากเชื้อ porphyromonas gingivalis เพื่อย่อยสลายเหงือกในโรคปริทันต์หรือเหงือกอักเสบ 2) ยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัส hepatitis B (HBV) การค้นพบนี้มีประโยชน์ที่จะนำ HPI และ 3) เสริมการทำงานของ anti-fungal protein/ peptide โดยป้องกันการถูกทำลายของสารดังกล่าวโดย intracellular proteases ของเชื้อที่ถูกทำลายให้ตายลงจากสาร anti-fungal ดังกล่าว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหากระบวนการเตรียมสารยับยั้งโปรตีเอสจากน้ำยางในปริมาณสูงเพื่อให้เพียงพอสำหรับเพื่อการทดสอบระดับพรีคลินิก

F.1) การเตรียม สารยับยั้งโปรตีเอส (HPI) ในปริมาณสูงจากน้ำยางพารา

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมผงซีรัมแห้งจากน้ำยางสด

นำน้ำยางสดที่กรีดได้ใหม่ๆมาเหนียวน้ำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อนโดยการเติมกรดฟอร์มิก(0.2% ต่อปริมาตร) ลงไปในน้ำยางสด เพื่อให้สภาพความเป็นกรดเหนียวน้ำให้เกิดการจับตัวของก้อนยาง แล้วจึงทำการแยกเอาส่วนของ fresh serum (F-serum) ออกจากก้อนยางโดยการรีดผ่านเครื่องรีดยางแผ่น (รูปที่ F.1) ทำการรวบรวบ F-serum แล้วนำไปกรองผ่าน กรองผ่านเครื่อง microfiltration ขนาด 0.22 ไมครอน เพื่อขจัดเชื้อจุลชีพและแยกอนุภาคยางที่ปนเปื้อนอยู่ใน F-serum ออกไป แล้วทำให้เป็นผงแห้งโดยใช้เครื่อง spray dryer

b) การทำบริสุทธิ์ HPI

นำผงซีรัมแห้งไปละลายน้ำกลั่น แล้วนำไปตกตะกอนด้วย acetone โดยใช้ช่วง % acetone saturation ดังนี้ 0-50, 50-70, 70-80 และ 80-95% ตามลำดับ นำช่วงความเข้มข้นที่ได้ HPI สูงสุดไปใช้เป็น HPI บริสุทธิ์

c) การ assay HPI

แอกติวิตีของ HPI สามารถวัดได้โดยดูจากความสามารถของ PI ในการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ โปรตีเอส เช่น trypsin หรือ gingipain ในการย่อย benzoyl-DL-

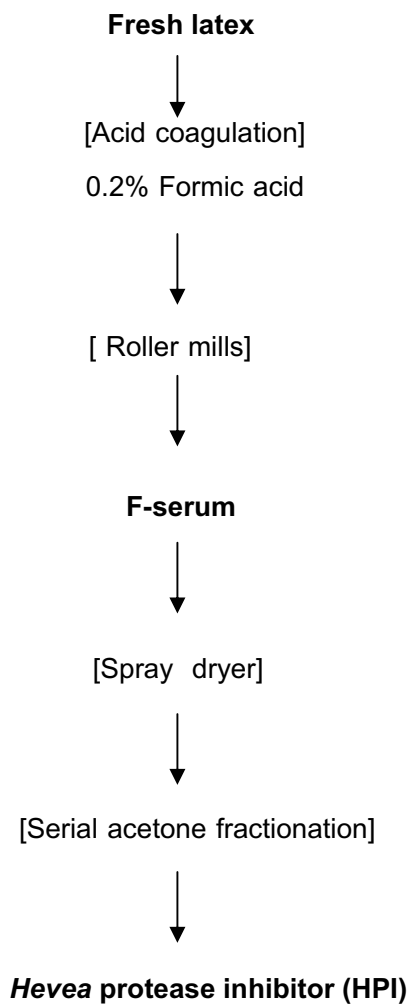
arginine-p-nitroanilide (BAPNA) ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีสี โดยการทำให้ stock solution ที่ประกอบด้วย BAPNA จำนวน 30 mg ซึ่งละลายอยู่ใน dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วไป dilute 100 เท่าด้วย 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ก่อนใช้เป็น substrate solution นำ PI sample ไป preincubate กับ trypsin (ปริมาตร 100 μ l , 0.1 mg/ml ใน 50 mM Tris-HCl pH 7.5)ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที โดยมีปริมาตรรวม 300 μ l หลังจากนั้นเริ่ม incubation ด้วยการเติม BAPNA substrate solution ปริมาตร 500 μ l ที่ 37°C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม acetic acid 30% (v/v) ทำการวัดปริมาณของ p-nitroaniline ที่ถูกสลายออกมาจาก BAPNA ที่ OD 410 nm. โดย 1 unit ของ PI activity จะเท่ากับปริมาณค่า O.D. ที่ 410 nm ที่ลดลง 0.1 หน่วย เมื่อเทียบกับ control ซึ่งมีแต่ trypsin หรือ gingipain อยู่ใน reaction mixture

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

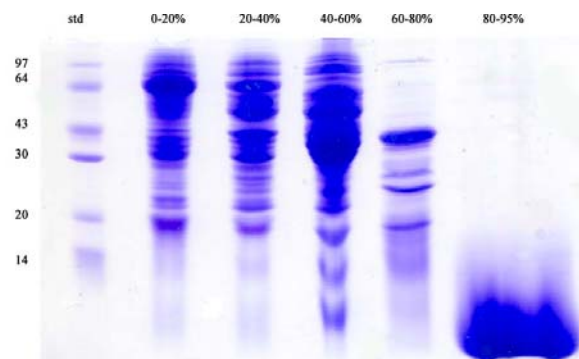
เนื่องจาก HPI เป็นสารที่อยู่ในส่วนของของเหลวใส หรือ ชั้นกลาง C-serum ที่ได้หลังการนำน้ำยางไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge แต่วิธีดังกล่าวไม่สามารถนำมาใช้ในการเตรียม HPI จากน้ำยางสดในปริมาณสูงได้เพราะต้นทุนสูงและเสียเวลามาก ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนมาเป็นลำดับขั้นตอนต่าง ๆ ดังรูปที่ F.1 ซึ่งเริ่มด้วยการสกัดเตรียมซีรัมจากแผ่นยางหลังการเติมกรดลงไปให้น้ำยางเพื่อให้ยางจับตัวเป็นก้อน และทำการแยกส่วนของของเหลวใสออกจากก้อนยางแผ่น โดยการนำไปรีดโดยใช้เครื่องรีดยางแผ่น ของเหลวใสที่ได้ (F-serum) จะมี HPI รวมอยู่กับโปรตีนที่ละลายน้ำได้ที่มีอยู่ในน้ำยางหลายชนิด ได้ปริมาตร F-serum ที่เตรียมได้จากน้ำยาง 50 ลิตร เท่ากับ 28 ลิตร (ตารางที่ F.1) เมื่อนำ F-serum ไปทำให้เป็นผงแห้งโดยผ่านพ่นด้วยเครื่อง spray dryer จะได้ผงแห้ง 750 กรัม ซึ่งสามารถนำผงดังกล่าวไปละลายน้ำกลั่นเพื่อทำการแยกโปรตีนตัวอื่น ๆ ออกจากสารละลาย F-serum โดยวิธีตกตะกอนด้วยอะซิโตน (acetone fractionation) โดยเพิ่มระดับช่วงความเข้มข้นของ acetone ขึ้นเรื่อยๆ โดยโปรตีนที่ไม่ใช่ HPI ส่วนใหญ่จะตกตะกอนช่วงความเข้มข้น acetone ระหว่าง 0-80% และ HPI บริสุทธิ์จะตกตะกอนช่วงความเข้มข้นอะซิโตนระหว่าง 80-95% ดังรูปที่ F.1 จะเห็นแถบโปรตีนของ PI อย่างเด่นชัดและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 7.5 kDa จะเห็นว่า HPI ที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูงและมีการแยกโปรตีนขนาด >60 kDa ปนอยู่เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ PI ที่เตรียมได้จาก C-serum ซึ่งต้องใช้การปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge ซึ่งจะเห็นแถบโปรตีน PI เพียงแถบเดียว (รูปที่ F.2)

ส่วนการหาปริมาณ activity ของ PI ซึ่งดูจากความสามารถของ PI ในการยับยั้ง activity ของ trypsin พบว่าน้ำยาง 50 ลิตร ได้ total activity ของ HPI หลังทำบริสุทธิ์ด้วยการวิธี acetone fractionation ช่วงความเข้มข้น 80-95% ประมาณ 260 TIU (trypsin inhibition unit) ความเข้มข้นของ HPI ในน้ำยางพารามีประมาณ 5.2 mTIU/ml ซึ่งอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นต่ำสุด (7-70 mTIU /ml) ที่ทางการแพทย์ใช้สารละลาย PI (Aprotinin) ที่สกัด

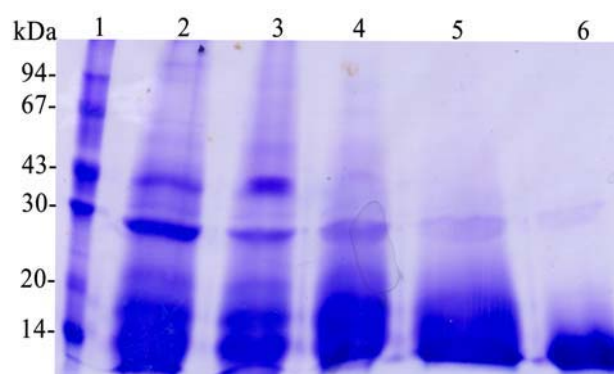
จากปอดวัว สำหรับยับยั้งการทำงานของ thrombin protease ในการป้องกันการสูญเสียเลือดในการผ่าตัดหัวใจคนไข้ (open heart surgery)]



รูปที่ F.1 ขั้นตอนการเตรียมสารยับยั้งโปรตีเอส HPI ในปริมาณสูงจากน้ำยางพารา



รูปที่ F.1 SDS-PAGE ของ PI บริสุทธิ์ ซึ่งได้จากการนำ C-serum ไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนช่วงความเข้มข้นต่างๆ (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-95% ตามที่ได้แบ่งไว้) โดย HPI จะตกตะกอนช่วง 80-95%



รูปที่ F.2 SDS-PAGE ของ HPI บริสุทธิ์ ซึ่งได้จากการนำสารละลายผงแห้ง F-serum (lane 2) ไปตกตะกอนด้วยอะซิโตนช่วงต่างๆ 0-40% (lane 3); 40-60% (lane 4); 60-80% (lane 5); 80-95% (lane 6) ตามลำดับโดย HPI จะตกตะกอนช่วง 80-95%

ตารางที่ F.1 ปริมาณ activity ของ HPI ที่เตรียมได้จากน้ำยางสดตามขั้นตอนในรูป F.1

ครั้งที่	ปริมาตรน้ำยางสด (L)	ปริมาตร F-serum (L)	น้ำหนักผงแห้ง (g)	Total HPI activity (TIU*)
1	28.5	16	260	158
2	7.0	3.5	80	34
3	13	6.5	130	68
รวม	50	26	470	260

*TIU = trypsin inhibitor unit

โดย 1 TIU จะสามารถลด activity ของ trypsin จำนวน 2 units ลงไป 50% ซึ่ง trypsin 1 unit จะย่อย BAPNA ได้ 1 μ mole ต่อนาทีที่ pH 7.8 และอุณหภูมิ 25 °C

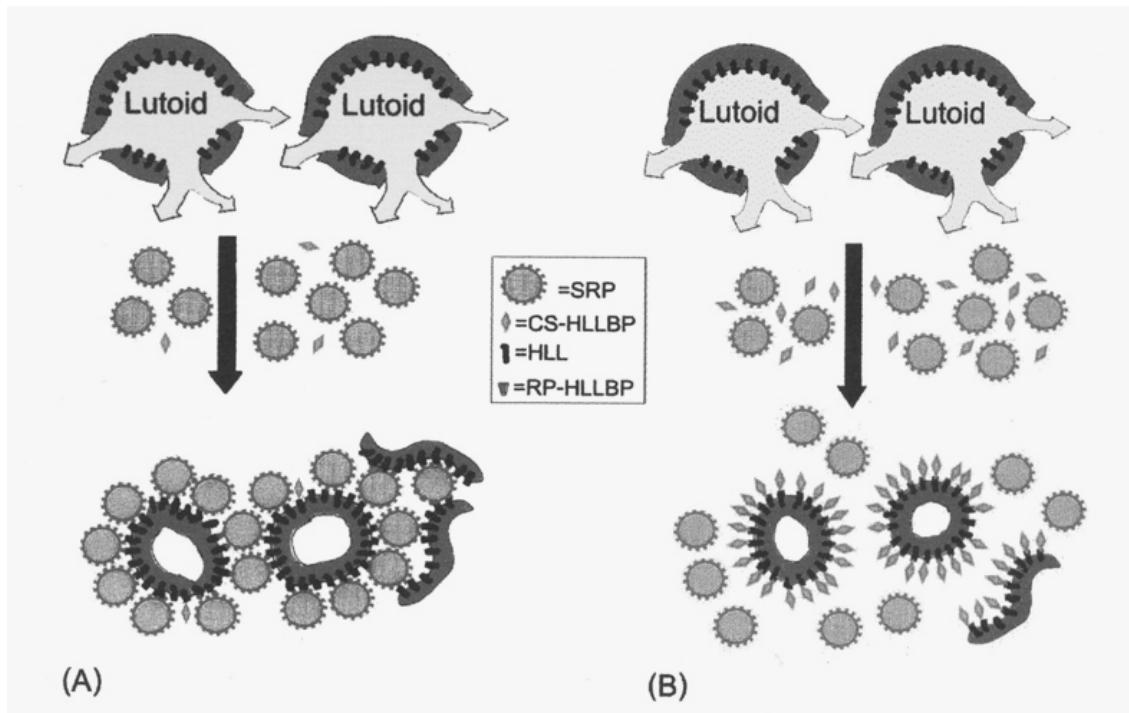
F.2) การทดสอบทางพรีคลินิกของสารยับยั้งโปรตีเอส (HPI)

เนื่องจาก HPI สามารถออกฤทธิ์ เสริมการทำงานของ anti-fungal protein/ peptide โดยป้องกันการถูกทำลายของสารดังกล่าวโดย intracellular proteases ของเชื้อที่ถูกทำลายให้ตายลงจากสาร anti-fungal ดังกล่าว ดังนั้นเราอาจจะใช้ HPI ในรูปสมุนไพรรักษาเสริมฤทธิ์กับยาฆ่าเชื้อราแคนดิดาชนิดที่เป็นเบปไทด์เช่นจำพวก histatin, lactoferrin ได้หาก HPI ไม่มีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อ ผลจากส่งสาร HPI บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ในปริมาณสูง ไปทดสอบทาง skin irritation หรือการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย โดยใช้วิธีทดสอบหมายเลข 404 ของ OECD, Guidelines for Testing of Chemicals (2001) โดยใช้สารละลาย HPI ปริมาตร 0.5 ml ปิดลงบนผิวหนังกระต่ายนาน 4 ชั่วโมงแล้วล้างออก สังเกตความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายติดต่อกัน 3 วัน ปรากฏว่าไม่พบอาการแดงและอาการบวมต่อผิวหนังกระต่าย แต่อย่างใด ดังรายละเอียดในรายงาน ผผ.17/49 รหัส 03-12-48 โดย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) (Appendix 9)

G. โครงการย่อย 7

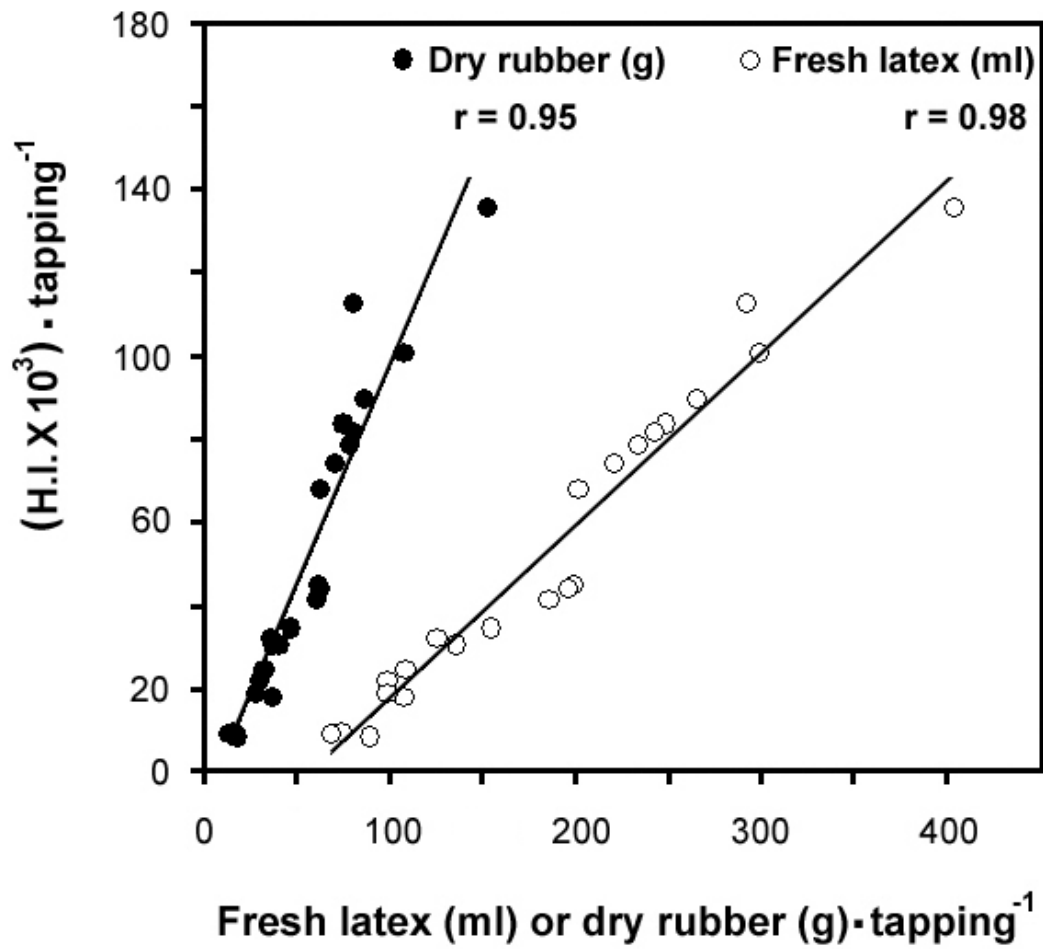
การพัฒนาชุดทดสอบ ELISA เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การไหลของน้ำยาง

โปรตีนที่มีศักยภาพในการใช้เป็นตัวบ่งชี้การไหลของน้ำยางนั้น ได้ค้นพบมาจากการศึกษาวิจัยกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยาง โดยคณะวิจัยได้พบว่าในกระบวนการดังกล่าวมีโปรตีนหลักอยู่ 3 ชนิดที่เกี่ยวข้อง ดังโมเดลในรูปที่ G.1 โดยชนิดที่ 1 เป็นเมมเบรนโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเลคติน (Wititsuwannakul et al, 2008a, Appendix 10) ที่เรียกว่า *Hevea latex lectin* (HLL) ที่ฝังตัวอยู่บริเวณเยื่อเมมเบรนด้านในของอนุภาคลูทอยด์ของน้ำยาง โดยเมื่อลูทอยด์แตกออก เลคตินดังกล่าวก็จะทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกลุ่มกับอนุภาคยางขนาดเล็ก (small rubber particle, SRP) ทั้งนี้ เพราะมันมีความสามารถเกาะจับจำเพาะกับกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนชนิดที่ 2 ที่อยู่บนผิวของอนุภาคยาง (Wititsuwannakul et al, 2008b, Appendix 11.) โดยเรียกไกลโคโปรตีนดังกล่าวว่า HLL binding protein ของอนุภาคยาง (RP-HLLBP) ผลทำให้เกิดการรวมกลุ่มระหว่างเมมเบรนของลูทอยด์กับอนุภาคยาง กลายเป็นก้อนยาง (rubber coagulum) ที่มีขนาดใหญ่พอที่จะก่อให้เกิดการอุดตันของท่อน้ำยาง นอกจากนั้นคณะวิจัยยังพบว่า HLL ยังมีความสามารถเกาะจับจำเพาะกับสารคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนชนิดที่ 3 ซึ่งละลายอยู่ในส่วนของ cytosolic serum (CS) หรือ ซีรั่มน้ำยางพารา (Wititsuwannakul et al, 2008c, Appendix 12) โดยเรียกไกลโคโปรตีนชนิดนี้ว่า CS-HLLBP พร้อมทั้งได้พบว่าปริมาณของน้ำยางที่ได้ต่อครั้งกรีตจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณ CS-HLLBP (รูปที่ G.2) และ CS-HLLBP ทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factor ในกระบวนการเกิด rubber latex coagulation ตามโมเดลใหม่ที่เสนอไว้ (รูปที่ G.1) ดังนั้นโปรตีน CS-HLLBP จึงถูกนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ (biomarker) ศักยภาพในการไหลของน้ำยาง ในการพัฒนาเป็นชุดทดสอบ indirect ELISA เพื่อวัดปริมาณ CS-HLLBP ในน้ำยาง



รูปที่ G.1 Proposed model for rubber latex coagulation: the intrinsic latex lectin (HLL) on the lutoid membrane vs. its insoluble or surface-bound rubber particle ligand (RP-HLLBP) and soluble C-serum binding protein ligand (CS-HLLBP). The bursting of lutoid particles will lead to the exposure of HLL that can bind to either RP-HLLBP on the rubber particles, leading to the formation of a rubber coagulum, as depicted in process A or to the soluble CS-HLLBP, forming no coagulum, as depicted in process B. The coagulation of rubber latex will take place whenever process A exceeds B (i.e. at the distal open-end of the latex vessel upon tapping).

(Wititsuwannakul et al, 2008c, Appendix 12)



รูปที่ G.2 Correlation between rubber yield and CS-HLLBP activity (H.I.) per tapping (n = 22) (Wititsuwannakul et al, 2008c, Appendix 12)

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียม CS-HLLBP บริสุทธิ์

เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CS-HLLBP โดยนำไปฉีดกระต่าย และใช้สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน CS-HLLBP โดยวิธี indirect ELISA วิธีการเตรียมเริ่มจากนำน้ำยางสดมาปั่นให้แยกออกเป็น ส่วนต่างๆโดยเครื่องปั่นความเร็วสูง (ultracentrifuge) ที่ความเร็ว 59,000 g เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นใช้ autopipette ดูดเอาเฉพาะส่วนของ C-serum เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับทำบริสุทธิ์ โปรตีน CS-HLLBP การทำบริสุทธิ์เริ่มจากนำ C-serum ที่รวบรวมได้มาตกโปรตีนด้วยเกลือ ammonium sulfate ที่ระดับความเข้มข้น 70-80% นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH7.4 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้มาตกโปรตีนอีกครั้งหนึ่งด้วย cold acetone ปริมาตร 2 เท่า เก็บตะกอนโดยใช้เครื่องปั่นแล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ใน ครั้งแรกแต่ใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าทั้งนี้เพื่อให้สารละลายมีความเข้มข้นของโปรตีนสูง ขั้นตอนต่อไป ก็จะคัดแยกโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน CS-HLLBP โดยนำสายละลายโปรตีนไปผ่าน คอลัมน์ gel infiltration (Bio-Gel P300) และเก็บรวบรวมเฉพาะ fraction ที่มี activity ของ CS-HLLBP สูงๆ สารละลายโปรตีนหลังจากผ่านคอลัมน์ gel infiltration แล้วจะเหลือโปรตีนไม่กี่ ชนิด วิธีการที่จะได้มาซึ่งโปรตีน CS-HLLBP เพียงชนิดเดียวในขั้นตอนต่อไปสามารถกระทำได้ 2 วิธีคือ วิธีแรก นำสารละลายโปรตีนไปผ่านคอลัมน์ ion-exchange (DEAE-Sephrose) วิธีที่2 ย้ายโปรตีนที่อยู่ในสารละลายให้อยู่บนเมมเบรนแล้วแยกเฉพาะโปรตีน CS-HLLBP ออกจาก เมมเบรน ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีที่2 ซึ่งมีวิธีการโดยสังเขปดังนี้คือ นำสารละลาย โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ gel infiltration ไปแยกแถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE จากนั้นย้ายแถบ โปรตีนที่อยู่ในเจลให้มาอยู่บนเมมเบรน PVDF (immobilon) โดยวิธี electroblotting แล้วตัด แยกเมมเบรนเฉพาะที่เป็นแถบโปรตีนCS-HLLBP สกัดโปรตีน CS-HLLBP ให้หลุดออกจาก เมมเบรนโดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH9.5 ที่มี 1% TritonX-100 เป็นส่วนผสม

b) การเตรียมแอนติบอดี (polyclonal antibody)

ในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน CS-HLLBP ใช้กระต่ายจำนวน 5 ตัว การ ฉีดกระต่ายแต่ละตัวในครั้งแรกใช้โปรตีน CS-HLLBP ปริมาณ 200 µg ที่อยู่ใน phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากับ complete Freuds'adjuvant ปริมาตร 0.5 ml ฉีดที่กลางหลังและต้นคอตามคำแนะนำของ Dunbar และ Schwoebel (5) เพื่อให้ กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่ดีขึ้น ฉีดเพิ่มอีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้โปรตีน CS-HLLBP ปริมาณ 100 µg ที่อยู่ใน phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากับ incomplete Freuds'adjuvant ปริมาตร 0.5 ml เมื่อกระต่ายสร้างแอนติบอดีแล้ว เจาะเลือดจากกระต่ายมา แยกเก็บเฉพาะส่วนของซีรัม ซีรัมที่ได้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

d) การเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณ CS-HLLBP โดยวิธี indirect ELISA กับ วิธี hemagglutination inhibition หรือการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บผลผลิตต้นยางพันธุ์ RRIM 600 เป็นรายต้น จำนวน 30 ต้น สุ่มตัวอย่างน้ำยางของแต่ละต้นมาปั่นด้วย ultracentrifuge (ความเร็ว 30,000 rpm นาน 30 นาที) ทั้งนี้เพื่อแยกเอาส่วน C-serum ของน้ำยางมาวิเคราะห์หาปริมาณ CS-HLLBP ในการวิเคราะห์โดยใช้วิธี indirect ELISA นำ C-serum มาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) 640 เท่า แล้วนำไปเคลือบในหลุมของ ELISA plate โดยเจือจางกับ coating buffer อีก 10 เท่า จากนั้นปฏิบัติตามขั้นตอนตามที่ได้อ่านมาก่อนหน้านี้ ค่า O.D. ของตัวอย่างที่อ่านได้จะนำไปแปลงเป็นค่าน้ำหนักจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการนำ CS-HLLBP มาเคลือบหลุมที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.31-20 µg/ml สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธียับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เริ่มจากนำ C-serum มาทำ serial dilution (2 เท่า) กับ isotonic buffer ในหลุมของ microtiter plate จากนั้นเติม HLL ที่มีระดับ titer ของ activity เท่ากับ 2² ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที แล้วเติมเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่มีความเข้มข้น 2% ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. แล้วอ่านผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

a) CS-HLLBP บริสุทธิ์ที่เตรียมได้

ในการทำบริสุทธิ์ CS-HLLBP เริ่มจากการนำ C-serum ที่ปั่นแยกได้จากน้ำยางสด ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ cold acetone จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ gel infiltration เก็บเฉพาะสารละลายโปรตีนที่มี activity ของ CS-HLLBP สูง แล้วนำไปแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นถ่ายแถบโปรตีนจาก acrylamide gel ลงบนเมมเบรน immobilon ด้วยวิธี electroblothing เพื่อตัดเอาเฉพาะแถบโปรตีน CS-HLLBP ซึ่งมีขนาด 40 kD มาทำการชะ แล้วนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ด้วย SDS-PAGE ปรากฏว่าได้ CS-HLLBP บริสุทธิ์แถบเดียว (รูปที่ G.3) อนึ่ง โปรตีน CS-HLLBP ที่สกัดได้ในครั้งนี้จะไม่อยู่ในสภาพเดิม (native form) ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างเพื่อแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE อย่างไรก็ตาม โปรตีนในสภาพดังกล่าวสามารถใช้งานในการศึกษาครั้งนี้ได้เนื่องจากมีเป้าหมายเพื่อนำไปใช้ฉีดกระต่าย และเป็นแอนติเจนสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ด้วยวิธี indirect ELISA

b) แอนติบอดี ต่อโปรตีน CS-HLLBP ที่เตรียมได้

การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CS-HLLBP ใช้กระต่ายจำนวน 5 ตัว ทำการฉีดโปรตีน CS-HLLBP 2 ครั้ง เพื่อกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี คือ ฉีดครั้งแรก และหลังจากครั้งแรก 21 วัน เมื่อครบ 30 วันหลังจากฉีดครั้งแรก เก็บเลือดกระต่ายแต่ละตัวมาตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CS-HLLBP โดยใช้วิธี indirect ELISA ผลปรากฏว่า กระต่ายแต่ละตัวสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CS-HLLBP ได้ไม่เท่ากัน (รูปที่ G.4) โดยที่กระต่ายตัวที่ 1 มี titer ต่ำสุด ดังนั้น การฉีดโปรตีน CS-HLLBP ในครั้งต่อไป (40 วันหลังจากฉีดครั้งแรก) ซึ่งเป็นการฉีดเพื่อหวังผลในการเก็บเกี่ยวแอนติบอดี จึงได้ตัดกระต่ายตัวที่ 1 ออกไป ผลจากการเก็บเลือดกระต่ายแต่ละตัว (ตัวที่ 2-5) มาตรวจหาแอนติบอดีเมื่อ 7 และ 14 วันหลังจากฉีดโปรตีน CS-HLLBP ในครั้งสุดท้าย ผลปรากฏว่าซีรัมเลือดกระต่ายตัวที่ 4 มี titer ของแอนติบอดีสูงสุด รองลงมาได้แก่ซีรัมเลือดกระต่ายตัวที่ 3, 2 และ 5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเลือดที่เก็บเมื่อ 7 และ 14 วันหลังจากฉีดครั้งสุดท้าย มี titer โดยเฉลี่ยแล้วไม่แตกต่างกัน แต่ก็มี titer สูงกว่าเลือดที่เก็บทดสอบในครั้งแรกค่อนข้างมาก (รูปที่ G.5) โดยพบว่าความจำเพาะของแอนติบอดีที่มีต่อโปรตีน CS-HLLBP จากการทดสอบโดยใช้วิธี westernblots ปรากฏว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้จากกระต่ายในครั้งนี้มี ความจำเพาะต่อโปรตีน CS-HLLBP ค่อนข้างสูง (รูปที่ G.6)

c) การตรวจวัดปริมาณโปรตีน CS-HLLBP โดยใช้วิธี indirect ELISA

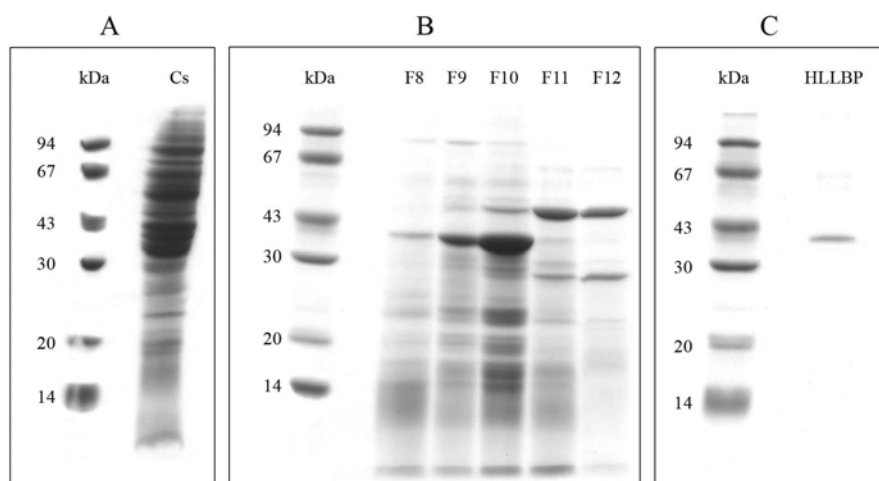
การตรวจวัดปริมาณโปรตีน CS-HLLBP โดยใช้วิธี indirect ELISA ในเบื้องต้นได้ดำเนินการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโปรตีน CS-HLLBP ที่จะนำมาใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

ความเจือจางของ C-serum ที่จะนำมาเคลือบหลุม และปริมาณ IgG ในซีรัมเลือดกระต่ายที่ใช้จับกับโปรตีน CS-HLLBP นอกจากนี้ยังรวมไปถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุม ระยะเวลาที่ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาสีหลังจากเติม developer เป็นต้น

จากการทดลองเคลือบหลุมด้วยโปรตีน CS-HLLBP และโปรตีนจาก C-serum ที่ระดับความเข้มข้นที่ลดลง 2 เท่า (serial dilution) โดยความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 16 $\mu\text{g}/\text{well}$ และความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$ เป็นระยะเวลานาน 1 ชม. ที่ 37°C จากนั้น incubate ด้วยซีรัมเลือดกระต่าย (ตัวที่ 4 เก็บเลือดครั้งที่ 3) ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ 2000, 4000 และ 8000 เท่า ผลจากการวัดปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นหลังจากได้ปฏิบัติครบขั้นตอนตามวิธีของ indirect ELISA ปรากฏว่า การใช้ซีรัมเลือดกระต่ายที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ 4000 เท่า มีความเหมาะสมที่สุดในการสร้างกราฟมาตรฐานและการวัดปริมาณของ CS-HLLBP ที่อยู่ใน C-serum เนื่องจากผลที่ได้อยู่ในช่วงของค่า O.D. ที่ไม่สูงหรือต่ำเกินไป นอกจากนี้ยังพบว่า การเคลือบหลุมด้วยโปรตีนจาก C-serum ที่ระดับความเข้มข้น 8 $\mu\text{g}/\text{well}$ ให้ค่า O.D. สูงสุด ในทุกระดับความเจือจางของซีรัมเลือดกระต่ายที่ใช้ (รูปที่ G.7) โดยอิทธิพลระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุม พบว่าจากการเคลือบหลุมด้วย C-serum ควบคู่กับโปรตีน CS-HLLBP ที่ระดับความเข้มข้นที่ลดลง 2 เท่า (serial dilution) โดยความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 16 $\mu\text{g}/\text{well}$ และความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$ เป็นระยะเวลานานต่างกัน 3 เวลา คือ 1 ชม. (ที่ 37°C) 4 ชม. และ 24 ชม. (ที่ 4°C) จากนั้น incubate ด้วยซีรัมเลือดกระต่าย (ตัวที่ 4 เก็บเลือดครั้งที่ 3) ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ 4000 เท่า ผลจากการวัดปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นหลังจากได้ปฏิบัติครบขั้นตอนตามวิธีของ indirect ELISA ปรากฏว่า ระยะเวลาการเคลือบหลุมที่ยาวนานขึ้นมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่เกาะติดในหลุมมีมากขึ้น (มีค่า O.D. เพิ่มขึ้น) โดยเห็นได้ชัดเจนกับโปรตีน CS-HLLBP แต่ในกรณี C-serum พบว่า การเคลือบหลุมนาน 1 และ 4 ชม. ให้ผลไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า การเคลือบหลุมด้วยโปรตีนจาก C-serum ที่ระดับความเข้มข้น 8 $\mu\text{g}/\text{well}$ ให้ค่า O.D. สูงสุดในทุกระยะเวลาที่ใช้เคลือบหลุม (รูปที่ G.8)

d) ปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ที่ตรวจวัดโดยวิธี indirect ELISA กับ ระดับของ activity ที่ตรวจวัดโดยใช้วิธียับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

จากการนำผลการวิเคราะห์ปริมาณ CS-HLLBP ที่ตรวจวัดในรูปของ g/tapping (สำหรับวิธี indirect ELISA) และ H.I. activity/tapping (สำหรับวิธียับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง) ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับผลผลิตยางแห้งของต้นยาง ปรากฏว่า นอกจากปริมาณ CS-HLLBP ที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีจะมีความสัมพันธ์ในระดับสูงกับผลผลิตยางแล้ว (รูปที่ G.9A และ G.9B) ยังพบว่าปริมาณ CS-HLLBP ที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันในระดับสูงอีกด้วย (รูปที่ G.9C) ดังนั้น การวัด CS-HLLBP สามารถทำได้โดยวิธี indirect ELISA ขึ้นซึ่งจะสะดวกและง่ายกว่า แทนการวัด activity จากการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก

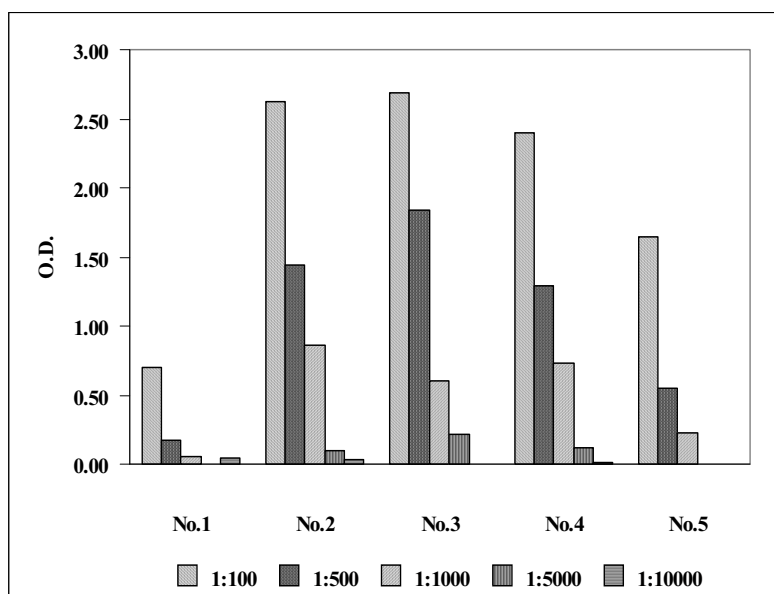


รูปที่ G.3. SDS-PAGE (12% gel) ของโปรตีนจากขั้นตอนต่างๆของการทำบริสุทธิ์ CS-HLLBP โดย lane kDa คือ standard protein marker

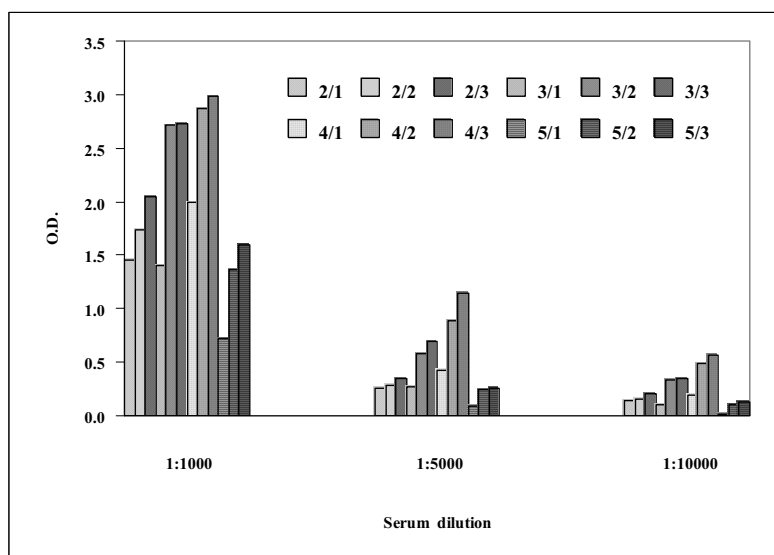
A: lane Cs คือโปรตีนของ C-serum ที่ใช้เพื่อแยก CS-HLLBP บริสุทธิ์

B : lane F8-F10 และ F11-F12 คือโปรตีน fraction ที่มีและไม่มี activity ของ CS-HLLBP ที่ได้หลังการแยกผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P300

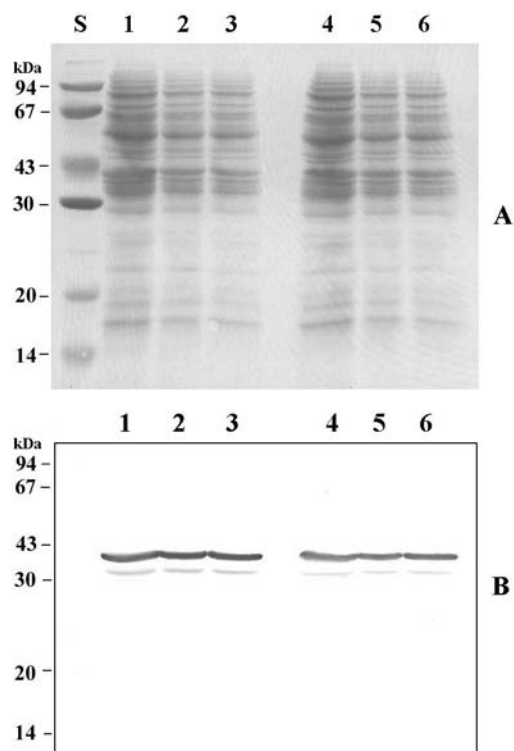
C: lane HLLBP คือ CS-HLLBP บริสุทธิ์ที่แยกตัดจากเมมเบรน PVDF



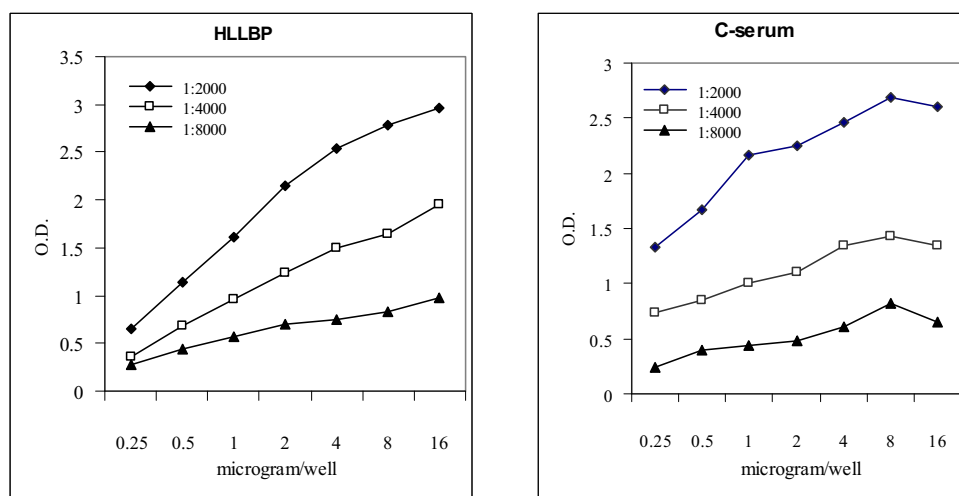
รูปที่ G.4 ไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรัมเลือดกระต่ายตัวที่ 1-5 ที่เก็บทดสอบครั้งแรก (30 วันหลังจากฉีดครั้งแรก) ทดสอบโดยใช้วิธี indirect ELISA (เคลือบหลุมด้วยโปรตีน CS-HLLBP ความเข้มข้น 5 µg/ml)



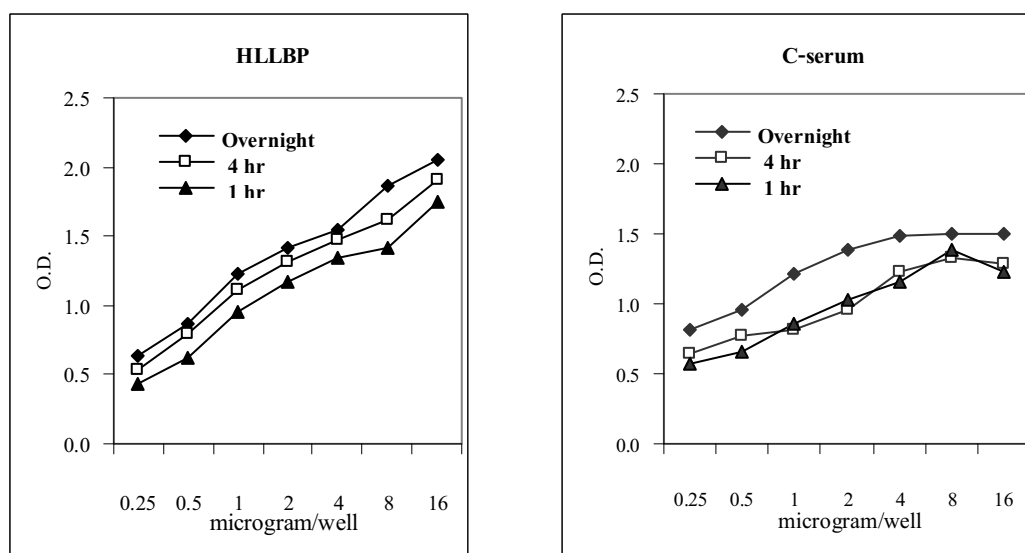
รูปที่ G.5 เปรียบเทียบไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรัมเลือดกระต่ายตัวที่ 2-5 ที่เก็บ 3 ครั้ง (30, 47 และ 52 วันหลังจากฉีดครั้งแรก) ทดสอบโดยใช้วิธี indirect ELISA (เคลือบหลุมด้วยโปรตีน CS-HLLBP ความเข้มข้น 5 µg/ml) ตัวเลขหน้าเครื่องหมาย / หมายถึงตัวกระต่าย ส่วนตัวเลขหลังเครื่องหมาย / หมายถึงครั้งที่เก็บเลือดกระต่าย



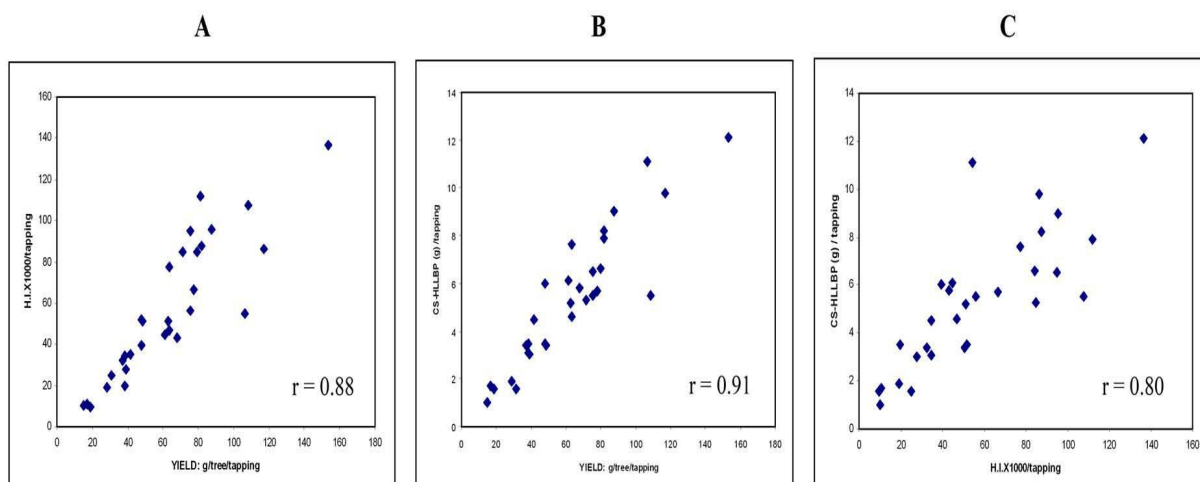
รูปที่ G.6 ความจำเพาะของแอนติบอดี ที่ผลิตได้จากกระต่ายตัวที่ 4 ต่อโปรตีน CS-HLLBP ใน C-serum วิเคราะห์โดยการทำ Western blot โดย (A) นำโปรตีนจาก C-serum มา run SDS-PAGE โดยใช้ ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40 μ g (lane 1 และ 4), 20 μ g (lane 2 และ 5) และ 10 μ g (lane 3 และ 6) จากนั้น (B) ย้ายโปรตีนที่อยู่ใน gel ลงบน nitrocellulose membrane ไป incubate ต่อด้วยซีรัมกระต่ายที่เจือจาง 2 ระดับ คือ 1:500 (B, lane 1-3) และ 1:1000 (B, lane 4-6) ตามด้วย Anti-rabbit IgG ที่มีเอนไซม์ peroxidase เชื่อมติด ตรวจสอบการจับระหว่างโปรตีน HLLBP กับ IgG โดยดูปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นหลังจากเติม substrate solution ที่มี diaminobenzidine (DAB) เป็นส่วนผสม



รูปที่ G.7. การตอบสนองของแอนติบอดี ต่อโปรตีน CS-HLLBP (HLLBP) บริสุทธิ์ และที่อยู่ใน C-serum ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใน indirect ELISA



รูปที่ G.8. ผลของระยะเวลาการเคลือบหลุมด้วยโปรตีน CS-HLLBP (A) และโปรตีนจาก C-serum (B) ใน indirect ELISA โดยใช้ซีรัมของเลือดกระต่ายตัวที่ 4 (เก็บครั้งที่ 3) เจือจางด้วย buffer 4000 เท่า



รูปที่ G.9. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตยางแห้ง (กรัม/ต้น/ครั้งกรีด) ของต้นยางจำนวน 30 ต้นกับปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ที่ตรวจวัดโดยวิธี hemagglutination inhibition (A) และ indirect ELISA (B) และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ที่ตรวจวัดโดยวิธีทั้งสอง (C)

References:

- Wititsuwannakul, R., Pasitkul, P., Kanokwiroon, K., Wititsuwannakul, D. (2008a) A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. *Phytochemistry* 69, 339-347.
- Wititsuwannakul, R., Pasitkul, P., Jewtragoon, P., Wititsuwannakul, D. (2008b) *Hevea* latex lectin binding protein in C-serum as an anticoagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation. *Phytochemistry* 69, 656-662.
- Wititsuwannakul, R., Rukseeree, K., Kanokwiroon, K., Wititsuwannakul, D. (2008c) A rubber particle protein specific for *Hevea* lectin binding involved in latex coagulation. *Phytochemistry* 69, 1111-1118.

Hevea latex lectin binding protein in C-serum as an anti-latex coagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation [☆]

Rapepun Wititsuwannakul ^{a,*}, Piyaporn Pasitkul ^b, Pattavuth Jewtragoon ^c,
Dhirayos Wititsuwannakul ^d

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla 90000, Thailand

^c Songkhla Rubber Research Center, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

^d Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Received 3 August 2006; received in revised form 17 May 2007

Available online 5 November 2007

Abstract

A distinct protein specifically recognized by its strong interaction with *Hevea* latex lectin (HLL) was detected in the aqueous C-serum fraction of centrifuged fresh latex. This C-serum lectin binding protein (CS-HLLBP) exhibited strong inhibition of HLL-induced hemagglutination. The CS-HLLBP was purified to homogeneity by a protocol that included ammonium sulfate fractionation, size exclusion and ion exchange chromatography. The purified CS-HLLBP had a specific HI titer of 0.23 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Its M_r s analyzed by SDS–PAGE was *ca.* 40 kDa and that by gel filtration was *ca.* 204 kDa. It has a *pI* value of 4.7, an optimum activity between pH 6 and 10 and was heat stable up to 50 °C. The HI activity of CS-HLLBP was abolished upon treatment with chitinase. The CS-HLLBP inhibited HLL-induced rubber particle aggregation in a dose dependent manner. A highly positive correlation between CS-HLLBP activity and rubber yield per tapping was found. The correlations for fresh latex ($r = 0.98$, $P < 0.01$) and dry rubber ($r = 0.95$, $P < 0.01$) were both highly significant. This indicated that the CS-HLLBP might be used as a reliable marker for the mass screening of young seedlings to identify and select clones with potential to be superior producers of rubber. A latex anti-coagulating role of the CS-HLLBP is proposed. The findings described in this 3 paper series have been used to propose a new model of rubber latex coagulation that logically describes roles for the newly characterized latex lectin and the two lectin binding proteins.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; Euphorbiaceae; Rubber latex; C-serum; Lectin; Lectin binding protein; α -Globulin; Latex flow; Anti-coagulating factor; Latex coagulation

1. Introduction

The C-serum fraction of centrifuged fresh latex represents the aqueous phase of the laticiferous cytoplasmic contents, and can be considered to be the metabolically active

fraction of the latex cytosol. Glycolytic enzymes (d'Auzac and Jacob, 1969) and other common cytosolic enzymes, including those of the isoprenoid pathway (Wititsuwannakul et al., 1990; Suvachitanont and Wititsuwannakul, 1995; Koyama et al., 1996) have been detected in the C-serum. These findings have indicated that the C-serum is active in a number of different metabolic processes. An active involvement of the C-serum in rubber biosynthesis has been noted (Tangpakdee et al., 1997), as has the importance of a heat stable calcium binding protein (calmodulin) in regulating these different interrelated

[☆] Part 3 in the series 'Proteins specifically involved in *Hevea* rubber particle aggregation and latex coagulation'.

* Corresponding author. Tel.: +66 74 219 065; fax: +66 74 446 656.

E-mail address: rapepun.w@psu.ac.th (R. Wititsuwannakul).

URL: <http://wrapepun@yahoo.com> (R. Wititsuwannakul).

metabolic processes. A purified calmodulin from C-serum was clearly shown to activate HMG-CoA reductase in the bottom (lutoid) or membrane fraction (Wititsuwannakul et al., 1990). The composition of the latex cytosol C-serum has been reviewed (d'Auzac and Jacob, 1989; Wititsuwannakul and Wititsuwannakul, 2001). The presence of many high molecular weight compounds, low-molecular weight organic solutes and mineral elements has been well documented. The high molecular weight compounds in C-serum are mainly proteins and nucleic acids. The distribution of proteins in whole latex is approximately 20% in the rubber phase, 20% in the bottom fraction, and 60% in the C-serum (Archer and Sekhar, 1955; Archer et al., 1963; Wititsuwannakul and Wititsuwannakul, 2001). Gel electrophoresis analysis of C-serum (Tata and Edwin, 1970) has indicated a large number of different proteins at varying concentrations. One C-serum protein that is present at a highest level is α -globulin. The α -globulin has a pI of 4.55, the same as that of latex. Due to its ease of adsorption onto rubber particles there has been a suggestion that it could play a key role in contributing to the latex and rubber particles' colloidal stability (Archer et al., 1963; Archer and Cockbain, 1955).

In this paper, the C-serum is shown to contain another *Hevea* latex lectin (HLL) binding protein with properties in many way similar to those of the previously isolated surface-bound protein on rubber particles (Wititsuwannakul et al., paper #2 in this series). This study demonstrates that this protein has an anti-coagulating role that is important physiologically for maintaining the colloidal stability by preventing the coagulation of the latex. A new model for rubber latex coagulation is presented, based on the balanced interactions between the HLL and the two binding proteins that are dependent on the stoichiometric ratios for the extent and selectivity of the dynamic variable real time interactions.

2. Results and discussion

In the preceding part of our studies on the HLL, the glycoprotein located on the small rubber particle (RP) surface was specifically recognized by and interacted with the HLL also previously characterized (Wititsuwannakul et al., 2007, papers #2 in this series). In this report, a different HLL binding protein was identified in the C-serum fraction of centrifuged fresh latex. This new C-serum HLL binding protein had unique properties, characterized in this report, in addition to it being a soluble protein located in the C-serum.

2.1. Purification of the soluble HLL binding protein in the latex C-serum

The protein purified from the latex C-serum bound strongly to HLL and strongly inhibited HLL-mediated hemagglutination. The amount of lectin binding protein

and its specific activity was monitored by the level of HI titres in the assays. Purification of the C-serum HLL binding protein (CS-HLLBP) was achieved by a protocol employing fractionation with ammonium sulfate, gel filtration (Bio-gel P-300) and ion exchange (DEAE-Sephacel) chromatography (see Table 1). The first protein peak eluted from the Bio-gel had a high HI titre but only a small amount of protein (Fig. 1). Fractionation on DEAE-Sephacel produced a symmetrical protein peak after elution with buffer A plus NaCl, that coincided exactly with the only fraction with a high HI titre (Fig. 2). The purified protein produced a single band upon SDS-PAGE analysis (Fig. 3), with an M_r of ca 40 kDa. This protein also appeared as a major band in the 70–85% ammonium sulfate fraction and was the major band from the Biogel fraction with the high HI activity (Fig. 3). The native form of the HI active protein had an M_r of ca 204 kDa as determined by gel filtration. This indicated that it was a multimeric form of the 40 kDa protein subunits. This property is similar to that of the RP-HLLBP previously identified and characterized (Wititsuwannakul et al., paper #2 in this series) but the subunits and their multimeric form have different M_r values and other properties are different.

Table 1
Purification protocol of CS-HLLBP

Step	HI titre ^a (titre)	Specific HI titre ^b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Yield (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	7.68×10^3	3.20	100
Bio Gel P-300	3.20×10^3	0.48	42
DEAE-Sephacel	2.56×10^3	0.23	33

^a Hemagglutination inhibition (HI) titre is defined as the reciprocal of the lowest dilution that gives detectable inhibition of agglutination of the rabbit erythrocytes.

^b Minimal concentration of CS-HLLBP required for detectable HI.

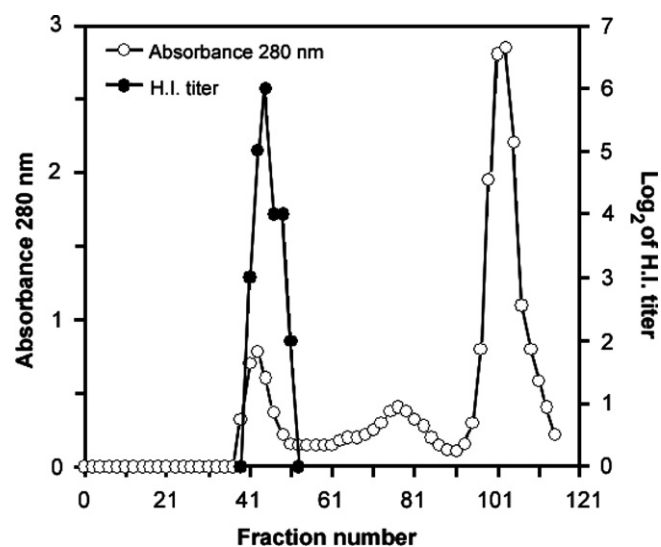


Fig. 1. Chromatographic profile of crude CS-HLLBP on a Bio-gel P-300 column obtained after (NH₄)₂SO₄ fractionation.

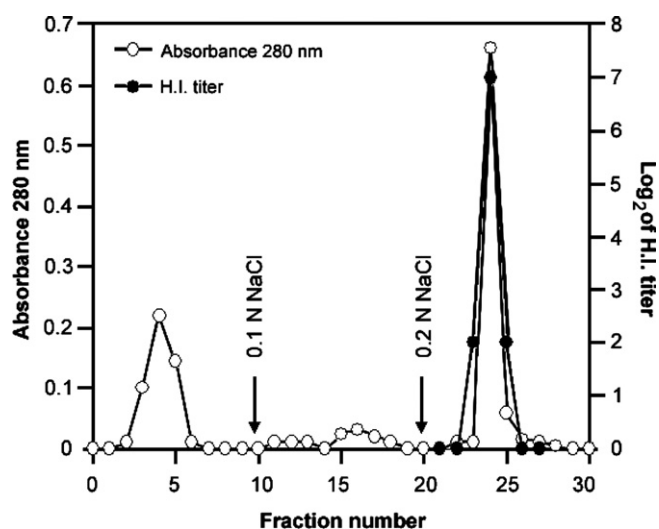


Fig. 2. Chromatographic profile of pooled active fractions of CS-HLLBP from the BioGel P-300 column on a DEAE-Sephacel column. The column was eluted by the stepwise increase of NaCl as indicated.

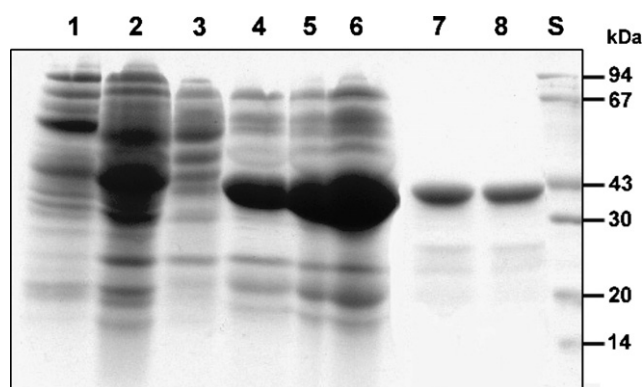


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the purified CS-HLLBP. Lane S: standard proteins; lane 1: C-serum proteins in 40–75%, lane 2: 70–85%, lane 3: 0–40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pellet fractions; Lane 4–6: pooled peak fractions from BioGel P-300 column with 50, 75 and 100 μg protein, respectively; Lanes 7 and 8: purified CS-HLLBP (20 μg , each) from eluted peak fraction on DEAE-Sephacel column.

2.2. Characterization and properties of the C-serum-HLL binding protein

The purified CS-HLLBP is an acidic protein with pI value of *ca* 4.7 similar to that reported for α -globulin (Archer et al., 1963). SDS-PAGE analyses (Fig. 3) showed that it was the most abundant C-serum protein. Archer et al. (1963) had previously identified α -globulin as the most abundant C-serum protein. The native protein was heat stable up to 50 °C as monitored by its remaining HI titres between 4 and 90 °C. Above 50 °C, the remaining HI titre was reduced by 50% up to 80 °C. These results indicate that above 50 °C a partial dissociation of the native multimeric form occurred. It is not known if the remaining titre of 50% activity is associated with more heat stable 40-kDa monomers or with partially associated forms of CS-HLLBP.

Table 2

Effect of glycosidase treatments on HI activity of CS-HLLBP

Treatment	HI activity (% control)
1. CS-HLLBP ^a (Control)	100
2. As 1 + Galactosidase (50 U)	100
3. As 1 + Glucosidase (5 U)	100
4. As 1 + Chitinase (0.125 U)	25

^a The amount of CS-HLLBP was 40 μg in a total assay volume of 100 μl .

The CS-HLLBP native form retained only 50% HI titres below pH 6 but from pH 6 to 10 retained maximum titres. This result indicates that a pH of 6 or greater was required for the formation of the active form, perhaps the multimer, while at pH values closer to its pI of 4.7 the ionized states of the protein did not allow for the production of the active form of the CS-HLLBP. This effect may also be related to the thermal effects as discussed earlier.

Treatment of the CS-HLLBP with various glycosidases followed by testing in the HI assay showed that the chitinase enzyme was the only one that resulted in the loss of the binding interaction (Table 2). This is a similar response to that of the RP-HLLBP previously observed and reported (Wititsuwannakul et al., paper #2 in this series). The specific HI titre for CS-HLLBP was 0.23 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, as determined by the inhibition of HLL induced hemagglutination. This is 6-fold higher than the value of 1.37 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, previously reported for RP-HLLBP (Wititsuwannakul et al., paper #2 in this series). Hence, the binding affinity of HLL for the soluble CS-HLLBP was much greater (at least or about 6-fold higher affinity) than that of the bound RP-HLLBP on the small RP. This might explain the colloidal stability of the latex under normal conditions, in that the CS-HLLBP prevents the HLL on the lutoid membrane (if rupture) from interacting with the RP-HLLBP by virtue of its higher affinity and therefore stronger competitive capacity. In addition, a strong and highly specific interaction between HLL and the 40-kDa CS-HLLBP was revealed on SDS-PAGE of the washed pellet obtained after a precipitin reaction (Fig. 4). This precipitin reaction is similar to that commonly employed in an immuno-precipitin assay to demonstrate a highly specific strong interaction, such as antibody/antigen interaction, that produces a precipitate. In this case, the 40-kDa protein reacting specifically with HLL.

2.3. CS-HLLBP as a key factor for preventing latex coagulation

A possible role for CS-HLLBP was further tested using a similar rationale to that used for demonstrating the possibility that RP-HLLBP was the RP ligand that reacted with the HLL to promote aggregation of RP (Wititsuwannakul et al., paper #2 in this series). The assay used was therefore the same as that developed previously to demonstrate RP-HLLBP inhibition of HLL induced RP aggregation. Again preincubation of HLL with

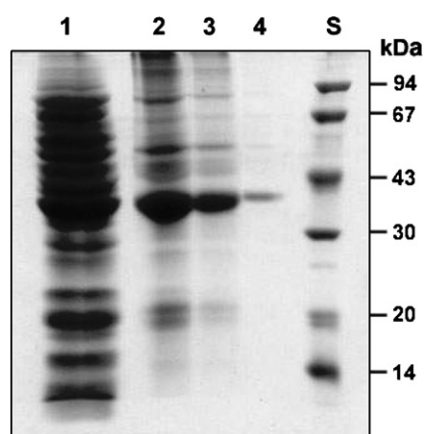


Fig. 4. SDS-PAGE of protein pellet obtained after the precipitin reaction. Lane 1: C-serum protein in the 60–80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pellet fraction; lanes 2–4: the serially diluted fraction of washed protein pellet obtained after the precipitin reaction; lane S: standard protein marker.

CS-HLLBP, before being used in the RP aggregation assay, abolished HLL induced RP aggregation in a dose dependent manner (Fig. 5). Under the *in vivo* conditions within the latex vessel, it is hence feasible for the HLL on the lutoid membrane debris to simultaneously link with both the HLLBP in the CS and the HLLBP on the RP via the shared common HLL binding sites. The adsorbed CS-HLLBP, having a higher binding affinity, will prevent direct interactions between the RP-HLLBP and HLL and contribute to the colloidal stability of the rubber particles and prevent latex coagulation. The proposed latex colloidal stability function of CS-HLLBP is similar to that earlier suggested for the C-serum α -globulin (Archer et al., 1963).

2.4. CS-HLLBP levels and their possible uses as rubber yield markers

The very strong inhibition by CS-HLLBP on rubber particles aggregation and hence the latex coagulation as discussed above indicates the possibility that this soluble lectin binding protein could play a key role in prolonging

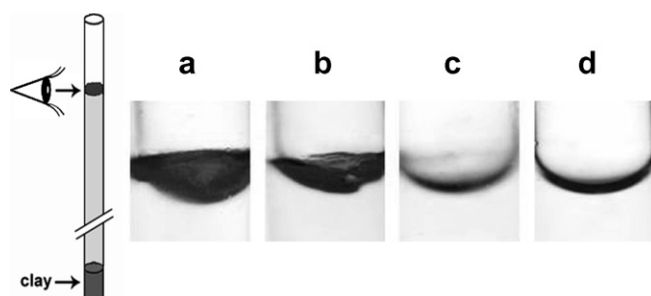


Fig. 5. Inhibitory effect of CS-HLLBP on HLL-induced rubber particle aggregation. The HLL (5 μg) was preincubated with either assay buffer only (a) or buffer solution containing 16.5 (b), 65 (c) or 130 (d) μg of CS-HLLBP before being employed in the rubber particle aggregation assay as described in methods.

the latex flow time. A possible correlation between the CS-HLLBP level and the latex yield was thus investigated. The accumulated results obtained demonstrated highly significant positive correlation between the CS-HLLBP activity levels (in term of HI titres) for the fresh latex ($r = 0.98$, $P < 0.01$) and the dry rubber yield per tapping ($r = 0.95$, $P < 0.01$) (Fig. 6). These values are significantly higher and more reliable than were our earlier reports on the correlation between latex NAD(P)H quinone reductase [NAD(P)H-QR] activity and rubber yield per tapping (Chareonthipakorn et al., 2002). The NAD(P)H-QR reaction was suggested to support the integrity of the lutoids in the electron transfer process and consequent antioxidant activity for removing free radicals. This activity is very different from that of the CS-HLLBP that contributes to latex stabilization by preventing HLL from interacting with RP-HLLBP through its competitive binding. The CS-HLLBP can play a direct role as an anti-latex coagulating factor by preventing the formation of the rubber coagulum required for plugging of the latex vessels or impeding latex flow. Hence, the CS-HLLBP activity levels are likely to serve as a better marker than that proposed earlier for the NAD(P)H-QR in predicting the yield potential for selected superior rubber producing clones.

2.5. Proposal of a new model for latex coagulation

The physiological functions of HLL in mediating rubber latex coagulation and the sequence of events have been convincingly demonstrated in this series of three related reports. RP-HLLBP bound to the RP surface acts as the ligand for HLL to cause aggregation while the soluble CS-HLLBP acts as an anti-coagulating factor that competes for HLL, prevents aggregation and so maintains

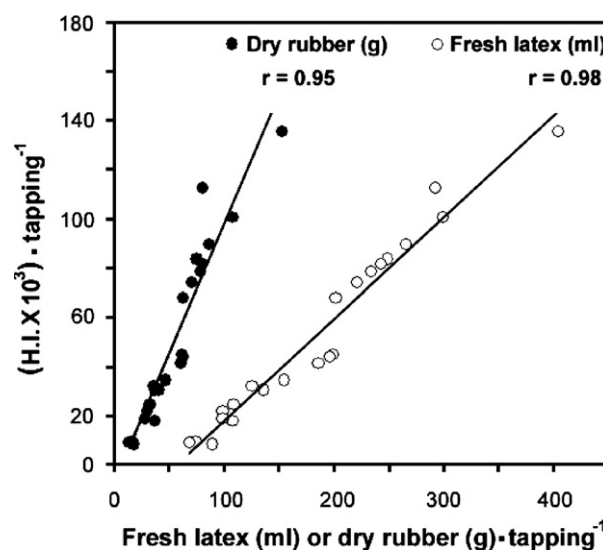


Fig. 6. Correlation between rubber yield and CS-HLLBP activity (HI) per tapping ($n = 22$).

the colloidal stability of the latex. The two specific binding proteins therefore have a dynamic competitive interaction with HLL and their proposed specific function have been incorporated into a new model for latex coagulation (Fig. 7). This model supports the different functions and compartmentalization of the cell constituents and allow for a normal controlled and balanced outcome. Since the coagulating and anti-coagulating factors are differently localized, RP-HLLBP bound to the rubber particles and the soluble CS-HLLBP present in the C-serum, their distinct locales and compartments allow for differential interactions with the HLL. These differential interactions are of a dynamic nature with respect to the spatial and stoichiometric ratio aspects. The new model developed from our finding indicated that the formation of the rubber coagulum, required for latex vessel plugging, is dependent mainly on the interactions between HLL and RP-HLLBP but not those between HLL and CS-HLLBP. For a successful rubber coagulum to form, the number of exposed HLL binding sites should exceed those to be occupied by the CS-HLLBP. Therefore, the higher the number of the remaining exposed HLL binding sites, the better the chance of forming a rubber coagulum.

The mechanism of latex coagulation as proposed in our new model is quite different from the one previously proposed by [Gidrol et al. \(1994\)](#). According to the former model, hevein and chitinase, both localized within the same intra-lutoid compartment, were suggested to play two opposite major roles in the latex coagulation process. The hevein was shown to induce the coagulation of latex by bridging together the rubber particles, in a lectin-like manner, via interacting with the glycosylated 22 kD protein of the rubber particles. Chitinase, on the other hand, was sug-

gested to help prevent latex coagulation by releasing GlcNAc moieties from the 22 kD receptor to block the hevein binding site ([Gidrol et al., 1994](#)). The positive effect of chitinase on stabilizing the latex did not fit well with our finding since the HI activities of both coagulating (RP-HLLBP) and anti-coagulating factors (CS-HLLBP) were sensitive to chitinase treatment. However, it may be possible for hevein to play a supportive role by working in parallel with the coagulating factor (RP-HLLBP). This is due to its ability to induce formation of rubber particle aggregates by becoming more accessible to HLL recognition in the rubber coagulum. Moreover, hevein may help to induce formation of a larger rubber coagulum complex by sandwiching between rubber particles attached on different rubber coagulum surfaces. Hence, the partial positive effect of chitinase on latex stabilization may possibly operate through its indirect intervention to diminish the supportive activity of hevein in the formation of the rubber coagulum.

Our proposed model agrees well with previously reported parameters involved in latex vessel plugging, that include the important roles of lutoids in latex vessels plugging ([Southorn and Edwin, 1968](#); [Southorn and Yip, 1969](#); [Southorn, 1968](#); [Milford et al., 1969](#); [Paardekooper, 1989](#)). Vessel end plugging occurs when the factors that promote rubber coagulum formation out-compete the factors that inhibit coagulum formation. The high correlation between the lutoid bursting index and the intensity or levels of the latex vessel plugging ([Yeang and Paranjothy, 1982](#)) has been well documented. The inverse correlation between the lutoid bursting index and rubber yield ([Southorn and Yip, 1969](#)) has also been well documented where a higher lutoid bursting index resulted in a sequentially lower yield. Moreover, this proposed intrinsic latex coagulation process, at the tapping or severed ends of the latex vessels, may be one of the primary initial biochemical events that contributes to the complex process of wound healing occurring at the injured tapping site of the bark tissue. The latex coagulation will help limit the flow and thus prevent the excessive loss of stored resources to minimize any sequential harmful effects. The rubber and latex components could be considered as stores of carbon and reserves of other nutrients required for *in vivo* turnover and carbon redistribution during periods of metabolic adaptation. The control of latex coagulation could assist with the need for metabolic adaptability that allows for readjustment of responses to changes that occur from time to time. For example, net control of latex coagulation will allow for a balanced physiological response from the rubber trees in response to tapping.

Any model must identify the correct physiological state and how it is achieved for each of the components that are ultimately required for the process of latex coagulation and plugging of the vessel ends. Therefore, a thorough understanding of the factors involved in the rubber particle aggregation and sequential latex coagulation is of the utmost importance for developing a conceivable mechanism.

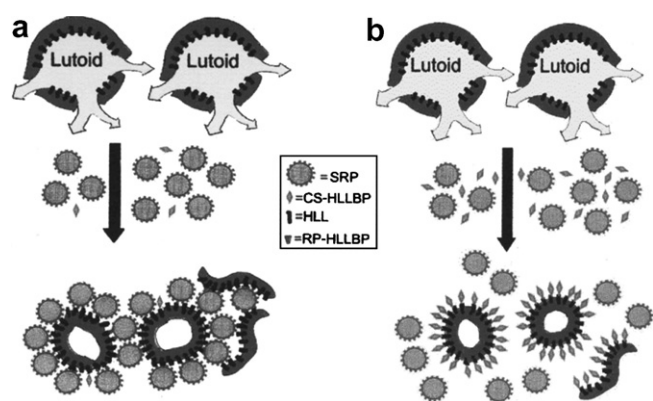


Fig. 7. Proposed model for rubber latex coagulation: the intrinsic latex lectin (HLL) on the lutoid membrane vs. its insoluble or surface-bound rubber particle ligand (RP-HLLBP) and soluble C-serum binding protein ligand (CS-HLLBP). The bursting of lutoid particles will lead to the exposure of HLL that can bind to either RP-HLLBP on the rubber particles, leading to the formation of a rubber coagulum, as depicted in process A or to the soluble CS-HLLBP, forming no coagulum, as depicted in process B. The coagulation of rubber latex will take place whenever process A exceeds B (i.e. at the distal open-end of the latex vessel upon tapping).

2.6. Concluding remarks

The new findings described in this 3 paper series on the identification and characteristics of a latex lectin HLL and two different binding proteins, together with previously reported data, have been used to propose a new model (Fig. 7) that we believe provides a better more logical explanation of the latex coagulation process than does any previous model.

3. Experimental

3.1. Chemicals

DEAE-Sephacel, glycoproteins and chitinase were from Sigma. Bio-gel P-300 from Bio-rad. All other chemicals were of reagent grade.

3.2. Hemagglutination inhibition (HI) assay

The activity of CS-HLLBP was measured by its ability to inhibit hemagglutination induced by HLL. Each CS-HLLBP sample (25 μ l) was 2-fold serially diluted with hemagglutination buffer, containing 0.9% NaCl in 50 mM Tris–HCl buffer, in a microtiter U plate. This was followed by addition of HLL solution (25 μ l) having a hemagglutination titre of 4 U, the solution then mixed and incubated at room temperature for 20 min before addition of 50 μ l of a 2% (v/v) rabbit erythrocyte suspension into each well. Hemagglutination was recorded after incubation for 1 h at room temperature. The minimum concentration of inhibitors that completely inhibited hemagglutination activity induced by HLL was calculated. The inhibition activity was expressed in terms of the hemagglutination inhibition (HI) unit or titre.

3.3. Purification of CS-HLLBP

The C-serum (60 ml) obtained from ultracentrifuged latex as earlier described (Wititsuwannakul et al., 2007) was fractionated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The protein pellet obtained from 60% to 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation was recovered by centrifugation at 15,000 g for 20 min and dialyzed against 50 mM Tris–HCl, pH 7.4 (buffer A). The crude CS-HLLBP concentrate (3 ml) was loaded on to a Bio-Gel P 300 column (1.8×80 cm), previously equilibrated with buffer A and eluted with the same buffer at a flow rate of 12 ml/h. Fractions (3 ml) were collected and assayed for HI activity and the peak fractions were pooled, concentrated and further purified on a DEAE-Sephacel column (1.8×8 ml), previously equilibrated with buffer A at a flow rate of 15 ml/h. The column was washed with buffer A until the absorbance at 280 nm was below 0.01. The column was then stepwise eluted with buffer A containing 0.1 and 0.2 M NaCl, respectively. The active fractions con-

taining high HI activity were pooled, desalted, concentrated and used for further characterization studies.

3.4. Effect of glycosidases on HI activity of CS-HLLBP

An aliquot containing 50 μ l of CS-HLLBP (40 μ g) was incubated with 50 μ l of glycosidase enzymes (galactosidase, 30 U; glucosidase, 30 U; neuraminidase, 0.15 U and chitinase 0.15 or as indicated) for 30 min at room temperature. After the incubation, the HI activity of CS-HLLBP was determined in each reaction mixture as described in Section 3.2.

3.5. Effect of CS-HLLBP on HLL-induced rubber particle aggregation

A solution (15 μ l) containing HLL (5 μ g), isolated and purified as earlier described (Wititsuwannakul et al., 2007), was incubated with 15 μ l of various amounts, from 16.5 to 130 μ g of the RP-HLLBP. Incubation without the CS-HLLBP served as the control. After incubation for 30 min, the rubber particle aggregation assay was performed by adding 30 μ l of rubber particle suspension to the mixture. The rubber aggregate formed was stained, separated and observed as earlier described (Wititsuwannakul et al., 2007).

3.6. Precipitin reaction

The protein pellet from the 60–80% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation was dissolved, and dialyzed against buffer A to give a C-serum protein solution (CSP) of 0.52 mg/ml. CSP solution (50 μ l), obtained after being serially diluted by 2-fold increments, was added into a precipitin reaction mixture containing 26 μ g of HLL in a total volume of 250 μ l. After incubation for 1 h at 37 °C, the reaction mixture was kept for 48 h at 4 °C. The precipitate formed was separated by centrifugation (15,000 g, 30 min) and washed with cold PBS. It was then dissolved in 0.5 M NaOH, subjected to SDS–PAGE and visualized after Coomassie Brilliant blue staining (So and Goldstein, 1967).

3.7. Effect of pH and temperature

The effect of temperature on the HI activity of CS-HLLBP was determined by incubating aliquots of CS-HLLBP sample at various pH values (for 1 h) or temp. (for 30 min) as indicated. The mixtures were adjusted back to pH 7.4 or 4 °C and assayed for HI activity.

3.8. Polyacrylamide gel isoelectric focusing

Isoelectric focusing was performed on 5% polyacrylamide gel with 2% Biolyte 3/10 ampholytes in the Bio-Rad minigel IEF apparatus (Model 111 Mini IEF Cell). The potential difference was increased stepwise according to the manufacturer's instructions.

3.9. Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE was performed either in the presence or absence of SDS by the method of Laemmli (1970).

3.10. Protein determination

Protein concentration was determined by method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a standard.

3.11. Correlations between levels of HI activity of CS-HLLBP and the amounts of fresh latex and dry rubber obtained per tapping

Twenty-two rubber trees giving high, medium, and low levels of rubber yield per tapping were used for the correlation study. The fresh latex from each tree was separately collected after tapping into an ice-chilled container and the total volume yield per tapping was measured. The amount of dry rubber, obtained from the oven-drying of fresh latex material at 65 °C to constant weight, was used for determination of dry rubber yield per tapping. The fresh latex was fractionated by centrifugation (49,000 g, 4 °C, 45 min) into a top rubber layer, a middle aqueous latex cytosol (C-serum), and a bottom (lutoid) fraction. The C-serum was isolated and directly used for determination of HI activity due to the presence of CS-HLLBP and expressed as total HI activity per tapping. Correlation curves between levels of HI activity of CS-HLLBP and dry rubber and fresh latex yield per tapping were constructed.

Acknowledgements

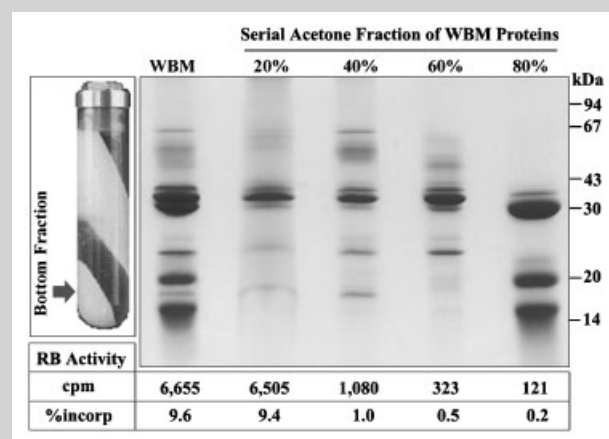
This work was supported by grants from the Thailand Research Fund. The authors thank Dr. Brian Hodgson for his critical reading of the manuscript and Dr. Atiya Rattanapittayaporn for her assistance in the graphical work.

References

- Archer, B.L., Barnard, G., Cockbain, E.G.C., Dickenson, P.B., McMullen, A.I., 1963. Structure, composition and biochemistry of *Hevea* latex. In: Bateman (Ed.), Chemistry and Physics of rubber-like substances. McLaren and Sons, London, pp. 41–72.
- Archer, B.L., Cockbain, E.G., 1955. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex 2. Isolation of the α -globulin of fresh latex serum. *Biochem. J.* 61, 508–512.
- Archer, B.L., Sekhar, B.C., 1955. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex 1. Protein constituents of fresh latex serum. *Biochem. J.* 61, 503–508.
- Chareonthipakorn, N., Witisuwanakul, D., Golan-Goldhrish, A., Witisuwanakul, R., 2002. Purification and characterization of NAD(P)H quinine reductase from the latex of *Hevea brasiliensis* MuLL.-Arg. (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 61, 123–128.
- d'Auzac, J., Jacob, J.-L., 1969. Regulation of glycolysis in latex of *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 21, 417–444.
- d'Auzac, J., Jacob, J.-L., 1989. The composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm. In: d'Auzac, J., Jacob, J.-L., Chrestin, H. (Eds.), Physiology of Rubber Tree Latex. CRC Press, Florida, pp. 59–96.
- Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H.-L., Kush, A., 1994. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) is involved in the coagulation of latex. *J. Biol. Chem.* 269, 9278–9283.
- Koyama, T., Witisuwanakul, D., Asawatreratanakul, K., Witisuwanakul, R., Ohya, N., Tanaka, Y., Ogura, K., 1996. Isopentenyl diphosphate isomerase in rubber latex. *Phytochemistry* 43, 769–772.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Milford, G.F.J., Paardekooper, E.C., Ho, C.Y., 1969. Latex vessel plugging, its importance to yield and clonal behaviour. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 2, 274–280.
- Paardekooper, E.C., 1989. Exploitation of rubber tree. In: Webster, C.C., Baulkwill, W.J. (Eds.), Rubber. Longman, Essex, pp. 319–414.
- So, L.L., Goldstein, I.J., 1967. Protein-carbohydrate interaction IV. Application of the quantitative precipitin method to polysaccharide concanavalin A interaction. *J. Biol. Chem.* 242, 1617–1622.
- Southorn, W.A., Edwin, E.E., 1968. Latex flow studies. II Influence of lutoids on the stability and flow of *Hevea* latex. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 20, 187–200.
- Southorn, W.A., Yip, E., 1969. Latex flow studies. III Electrostatic considerations in the colloidal stability of fresh *Hevea* latex. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 20, 201–215.
- Southorn, W.A., 1968. Latex flow study. I. Electron microscopy of *Hevea brasiliensis* stability and flow of *Hevea* latex. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 20, 176–186.
- Suvachitanont, W., Witisuwanakul, R., 1995. 3-Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A synthase in *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 40, 757–761.
- Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T., Witisuwanakul, R., Witisuwanakul, D., 1997. Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyl transferase activities in bottom fraction and C-serum from *Hevea* latex. *Phytochemistry* 45, 261–267.
- Tata, S.J., Edwin, E.E., 1970. *Hevea* latex enzymes detected by zymogram technique after starch gel electrophoresis. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 23, 1–12.
- Witisuwanakul, R., Witisuwanakul, D., Dumkong, S., 1990. *Hevea* calmodulin: regulation of the activity of latex 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase. *Phytochemistry* 29, 1755–1758.
- Witisuwanakul, D., Witisuwanakul, R., 2001. Biochemistry of Natural Rubber and Structure of Latex. In: Steinbuchel, A. (Ed.), Biopolymers, vol. 2. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 151–202.
- Witisuwanakul, R., Pasitikul, P., Kanokwiroon, K., Witisuwanakul, D., 2007. A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. *Phytochemistry*, doi:10.1016/j.phytochem.2007.08.019.
- Witisuwanakul, R., Rukseree, K., Witisuwanakul, D., submitted for publication. A rubber particle protein specific for *Hevea* latex lectin binding involved in latex coagulation (Part 2 in the series 'Proteins specifically involved in *Hevea* rubber particle aggregation and latex coagulation') *Phytochemistry*.
- Yeang, H.Y., Paranjothy, K., 1982. Initial physiological changes in *Hevea* latex flow characteristics associated with intensive tapping. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 30, 31–36.

Summary: Centrifugation of fresh *Hevea* rubber latex yields three distinct fractions. The sediment bottom fraction (BF) content of membrane-bound organelles is ca. 20 vol.-% of latex. Prolonged storage or delayed use of fresh latex will result in disintegration and loss of the bottom fraction. This is due to the osmotically sensitive BF rupture and its membrane debris being tightly bound to the top rubber particles (RP) phase. The BF membrane was found to be highly active for rubber biosynthesis (RB), in contrast to previous reports that describe RB only occurring on the RP surface. It was clearly shown that washed BF membrane (WBM) was much more active than fresh RP for RB activity. WBM was highly activated by SDS for RB in a biphasic manner, but SDS strongly inhibited the RP. Probably WBM micelle formation resulted in a highly increased active surface area for RB. C₅₅-PP (UPP) was a very active allylic for WBM in RB function, but inactive for RP. Serial acetone extraction of WBM proteins showed a distinct profile of the fractions with different RB activity. WBM isolated proteins suspended in 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) with an RB activity equal to that of intact WBM was with the 20% acetone protein fraction. The 60 and 80% fractions were inactive. Combining the 20 with 80% fractions showed a complete inhibition of RB activity.

Complete RB loss was also found when WBM was mixed with the 80% fraction, indicating that WBM has both an enzyme system and a factor for regulation of the RB activity in a well controlled metabolic function for the latex RB process.



Involvement of *Hevea* Latex Organelle Membrane Proteins in the Rubber Biosynthesis Activity and Regulatory Function

Dhirayos Wititsuwaannakul,^{*1} Atiya Rattanapittayaporn,² Tanetoshi Koyama,³ Rapepun Wititsuwaannakul²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand
Fax: 662-248-0375; E-mail: scdwt@mahidol.ac.th

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkla 90112, Thailand

³Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials (IMRAM), Tohoku University, Sendai 980, Japan

Received: October 31, 2003; Accepted: November 27, 2003; DOI: 10.1002/mabi.200300080

Keywords: enzymes; *Hevea* latex; membranes; micelles; rubber biosynthesis

Introduction

Rubbers in the latex from various plants^[1] are polyisoprenoids of high molecular weight hydrocarbon polymers consisting almost entirely of the five-carbon isoprene (C₅H₈) units. The polyisoprene rubber is the major component of latex synthesized by specially differentiated cells of the plants. They are synthesized by a series of enzyme-catalyzed polymerizations^[2] of the isoprene units to various different degrees, resulting in a wide range of molecular weight (MW). The rubbers of high MW are produced in the

latex of about 300 genera of Angiosperms. Among them, *Hevea brasiliensis* (Brazilian rubber trees) is the best rubber producer, and commercially cultivated for the natural rubber production used industrially for various products. *Hevea* latex contains rubber particles that are accumulated in specialized cells known as laticifers. The double bonds in *Hevea* rubber are in the *cis* configuration as *cis*-1,4-polyisoprene, with a wide range of molecular size distribution. In addition to rubber particles, two other specialized particles (lutoids and Frey-Wyssling particles) are also present as major constituents of the *Hevea* latex. The presence

of these two major particulate components provides the unique characteristic to the *Hevea* latex properties. The structure of *Hevea* latex and its detailed biochemistry has recently been thoroughly and extensively reviewed.^[3]

Fresh *Hevea* latex can simply be fractionated by centrifugation into three fractions as the top rubber layer, middle aqueous C serum, and the sediment bottom fraction (BF) of membrane-bound organelles. The BF content is quite considerable, constituting about 20 vol.-%^[3] of the fresh latex as compared to an average of ca. 30% of the rubber phase. The BF is composed almost entirely of membrane-bound organelles, the lutoids and Frey-Wyssling particles. The fresh latex is thus a colloidal mixture of these different particles, together with the cell soluble substances in an aqueous suspension. Lutoids were first described by Homans et al.^[4] as membrane-bound vacuoles, with the single layer membrane rich in phosphatidic acids,^[5] thus rendering them as negatively charged vesicles. The lutoids contents (called B-serum) are proteins, enzymes and a wide range of metabolites, considered as a type of phytolysosomes.^[6] Frey-Wyssling particles are double layer membrane organelles containing lipid globules, membrane vesicles, and β -carotene.^[7,8] The high carotenoid content suggested it might contain enzymes for the isoprenoids synthesis pathway.^[7] So far, only few studies were performed that might suggest the related metabolic roles of these particles in isoprenoids and rubber biosynthesis (RB) pathways.^[7,9] HMG-CoA reductase (HMGR), presumably one of the rate-limiting enzymes in the RB pathway,^[10] was purified from the washed BF membrane.^[9] It was shown to be under control by calmodulin,^[11] the Ca^{2+} binding heat stable protein in the C-serum, as the activator of this HMGR enzyme.

Hevea latex has been shown to be active^[2,12] in the synthesis of rubber for quite some time. The study on rubber biosynthesis (RB) process is of much interest as it appeared in several reviews.^[13–17] Details or understanding of the RB process is still ambiguous and a clear evidence has not yet been convincingly presented. Most of studies focused mainly on the surface of rubber particles (RP) and was always reviewed^[13–18] as the only prerequisite site required for synthesis of rubber molecules. This might seem a paradox to address the question on how and where the original RP was formed if the new rubber has to be synthesized on its preexisting surface. In the layman term, one might say this is the question of chicken and egg that has long been overlooked or ignored. The true RB initiation sites other than the RP surface with active rubber formation need to be sought out. It's therefore still an open question as to the actual specific site for synthesis of new rubbers that will eventually aggregate to form the RP. If one considers the complex nature of *Hevea* latex and its myriad compositions, it might be possible that the RB can take place at certain specific site other than the RP surface. This has been earlier postulated,^[7,19] but has received little attention nor careful

investigations were carried out to substantiate this suggestion. A study under the condition that it is free of rubber particles should be attempted because it would serve as an ideal system to solve this query. *Hevea* latex is regarded as the living cytoplasm in which the rubber particles, the non-rubber particles, and other cell components are dispersed in an aqueous phase of the cytosol. Of particular interest are the membrane-bound non-rubber particles in the latex that may have active role in the RB process. Recently, we have shown that the surface of these particles was quite active in the synthesis of new rubber molecules.^[20,21] The results might thus suggest that the actual RB site could be localized on these particles membrane other than the RP surface. As stated in our most recent report,^[21] this was in contrast with the previous numerous studies, in which the RP surface was implicated as the one and only prerequisite site for the in vitro RB process.^[12,18,22] Our different results^[20,21] could suggest that there might be more than one site for RB activities in the latex. However, it is still doubtful and needs clarification considering our reports on other RB related enzymes.^[20,23,24] Isopentenyl diphosphate isomerase (IPPI) in the *Hevea* latex was clearly detected and characterized for the first time by our group.^[23] We also detected the high IPPI and prenyl transferase (PT) activities in the BF particles and their properties thoroughly characterized.^[23,24] Consequently, we clearly showed highly active rubber formation by fresh BF particles.^[20] The presence of high IPPI, PT and rubber transferase (RT) activities in the same BF particles were also determined.^[24] A kinetic study on ^{14}C -IPP incorporation into the rubber and the product analyses showed new appearance of the low molecular weight rubber molecules.^[20] These results suggested quite likely the synthesis of new rubber molecules being initiated and formed by these particles enzymes. The results also pointed out the function of the BF particles surface or membrane in carrying out the rubber synthesis in this study.

Subsequently, further careful studies on RB activities of the membrane^[21] from the BF particles were carried out and detailed properties were characterized. Extensively washed BF particles (WBP) and the derived washed BF membrane (WBM) on RB activities were compared. It was clearly shown that the RB activity was located on the isolated membrane. Parameters affecting the membrane functions were investigated on the RB process. Effect of detergents and heat treatments of the WBM before being subjected to the optimum RB assays conditions were characterized in details.^[21] The RB stimulation results thus suggested a possible increase of active surface area by formation of micelle caused by these parameters. The active membrane RB assays clearly indicated that the synthesis of new rubber could effectively occur with no requirement of the RP prerequisite site.

In this report, we have further characterized the RB activity of the washed BF membrane (WBM). We show that the RP rapidly isolated from the freshly tapped latex

contains only two proteins with very low or no RB activity, and the delayed use of fresh latex can lead to rupture and disappearance of the BF particles. The RP thus obtained has higher and different protein content, along with increased RB activity. Most importantly, we can demonstrate that the isolated proteins and enzymes from the WBM can carry out the rubber synthesis when suspended with 2% sodium dodecyl sulfate (SDS). Thus, the postulation of micelles as the cause for the enhanced RB activity, as earlier reported,^[21] is strongly supported by the results in this study. Even more interesting are experiments on mixing or reconstitution of WBM fractionated proteins, because they provide a good indication for the RB control mechanism by the proteins present or localized in the membrane.

Experimental Part

Materials

Isopentenyl diphosphate (IPP, 1 mg · ml⁻¹), sodium dodecyl sulfate (SDS) and analytical chemicals used in this RB study were mainly obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). [¹⁴C] Isopentenyl diphosphate (¹⁴C-IPP, 54 mCi mol⁻¹) was from Amersham Biosciences. Undecaprenyl diphosphate (UPP), uniformly labeled (¹⁴C-UPP) and UPP synthase (UPS) were generously provided by Dr. Koyama (Tohoku University, Japan). They were also prepared by us according to Koyama's published procedure,^[25] using the UPS enzyme with the same quality and purity as provided. Other chemicals, reagents and solvents used were all of analytical grade.

Collection of Fresh Latex for Immediate Centrifugation

Fresh latex used in this study was obtained from regularly tapped rubber trees (clone RRIM 600) at the adjoining Songkla Rubber Research Center, Thailand. These trees were tapped in a half-spiral with V-shape knife by stripping the bark (2–3 mm thick) to make cuts across the latex vessels. All preparations for fresh latex fractionation were made ready beforehand prior to the latex collection. The latex was collected in ice-chilled beakers and was immediately subjected to centrifugation within less than 10 min from the tapping collection time. As such, the fractionated fresh latex was almost similar to the in situ latex with minimum rupture or loss of the BF particles.

Preparation of Washed Bottom Fraction Particles (WBP)

The freshly tapped latex was immediately fractionated by centrifugation without delay to obtain the three distinct fractions as described^[9,21] with maximum sediment BF and minimum RP associated or contaminated protein. They were routinely monitored and checked to ascertain the consistency of samples before the assays. Intact BF particles were prepared as reported,^[21] with a slight modification. The collected BF was washed five times by careful suspension in 50 × 10⁻³ M Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.9% NaCl (w/v) so that the intact WBP was obtained, with no small RP present. All

operations were carried out at 0–5 °C. The intact WBP as prepared was kept in an ice-bath. An aliquot was immediately used for the preparation of BF membrane for the RB assays. All operations were carried out at 0–5 °C.

Preparation of Washed Bottom Fraction Membrane (WBM)

Washed BF membrane (WBM) was prepared from the intact WBP as described.^[21] The cleaned WBP pellet was suspended in 3 volumes of distilled water and stirred for hypotonic lysis of WBP. The membrane was prepared as a clean sediment fraction by high speed centrifugation and repeated three times after each washing to obtain WBM cleansed of any contamination. All operations were carried out at 0–5 °C for membrane integrity and stability. The washings were carried out under the same method as that used for the WBP preparation and kept in the ice-bath until used.

Serial Acetone Fractionation of WBM Proteins

The WBM was subjected to serial acetone dissolution and precipitation of proteins at the ranges of 0–20, 20–40, 40–60 and 60–80% saturation as described.^[26] The acetone-precipitated protein from each step was collected by centrifugation at 10 000 × g and dried up under N₂ gas as powdered protein and stored at –20 °C until use for the assay. The protein concentration was determined by Bradford assay.^[27]

Preparation of Washed Rubber Particles (WRP)

Rubber particles were prepared from the centrifuged zone 2 rubber as described^[19] by repeated washing three times with 5 volumes of 50 × 10⁻³ M Tris-HCl buffer (pH 7.4) to obtain the WRP for assays. All operations were carried out at 0–5 °C. The prepared WRP was kept cool in an icebox until used. The rubber quantity was determined by measuring the absorbance at 280 nm. The rubber content was calculated as described by Light and Dennis:^[28] (0.04 ± 0.002 mg of rubber)/A₂₈₀.

Rubber Biosynthesis (RB) Assays and Incubation Conditions

The incubation mixture, in a final volume of 300 µl, contained designated amounts of samples (WBP, WBM, WRP, or acetone extracted WBM protein) in Tris-HCl buffer, pH 7.7, as indicated in the captions for Figure and Table. The 50 × 10⁻³ M Tris-HCl buffer (pH 7.7) for the RB assays was included reagents (30 × 10⁻³ M KF, 5 × 10⁻³ M MgCl₂, 1 × 10⁻² M DTT) and 40 × 10⁻⁶ M [¹⁴C] IPP (2.5 ci · mol), unless otherwise indicated. For the assays using C₅₅PP (UPP) as allylic acceptor for the RB activity, the ¹⁴C uniformly labeled product of UPPS (¹⁴C-UPP at 245 000 dpm) was used together with 40 × 10⁻⁶ M unlabeled IPP substrate. All the RB incubation mixtures were carried out at 37 °C for 6 h, unless indicated otherwise. After 37 °C optimum incubations, the reaction was chill-stopped by placing the incubation tubes in an icebox and was immediately processed for the ¹⁴C-labeled rubber extraction and the RB activity determinations.

Rubber Extraction and RB Activity Determination

The labeled rubber product was extracted by precipitation of the rubber out from the incubation mixtures. Right after the reaction was stopped, 1.2 ml cold ethanol were added into the incubation mixtures and immediately separated by centrifugation at $5000 \times g$ for 10 min. The WRP prepared as described was added as the carrier to every incubation tube before the precipitation step by the addition of cold ethanol. This step was taken to assure quantitative recovery of the labeled rubber product. This was considered necessary because only a little amount of product was formed which might not be completely self-aggregated in order to sediment out after ethanol addition and centrifugation. The WRP addition as carrier was without any effect on the RB activity of the samples and greatly improved the quantitative product recovery. The rubber pellets were extracted and purified repeatedly 3 times using 1 ml of a mixture of toluene and hexane (1:1, v/v). The solvent mixture was evaporated at room temperature in the fume hood to a small volume. The extracted soluble rubber was then further purified by precipitation twice with 1.2 ml cold acetone as described previously.^[7,8] The amount of radioactivity in the purified rubber was determined for the RB activity by determining the ^{14}C -labeled rubber with liquid scintillation counter.^[20,21]

Results and Discussion

The results presented in this paper are extended detailed analyses of our recent report^[21] on the active RB function of the washed BF membrane (WBM). Several criteria are considered for the experiments designed to ascertain and convincingly show that the RB activity can actually occur without the presence of the RP surface which is not required. This will help lending more and stronger support on our earlier reported results.^[20,21] To clarify the still remaining ambiguity, some trivial, long overlooked aspect with important implications is carefully documented in experiments reported herein.

Osmotic Sensitivity of the Fractionated Latex Bottom Fraction Particles

The BF membrane-bound particles are quite abundant, comprising around 20% or more of the latex volume. They are sensitive to osmotic change and some might rupture during the flow of latex from tapping.^[29,30] Addition of 0.7% ammonia or the buffered glycerol as latex preservative led to a complete loss of the BF as recently shown by Yeang et al.^[31] However, the stability of intact fresh latex as fractionated immediately after tapping has never been carefully monitored and documented.

Our study on the time course of the fresh latex fractions shown in Figure 1 indicated that the sediment BF was quite unstable if not quickly separated from other fractions. Centrifugation of fresh latex right after tapping showed that BF of high contents sediment as intact particles (tube A,

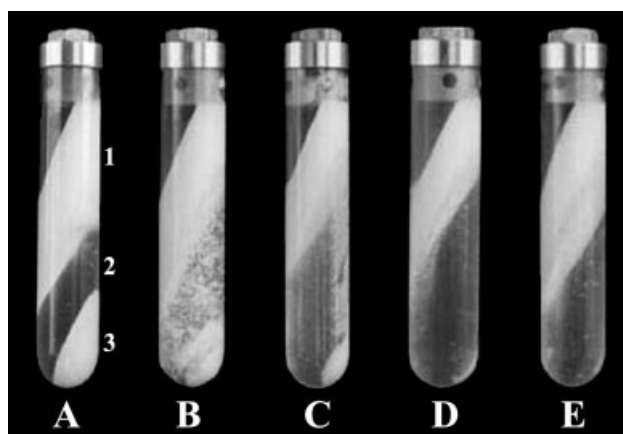


Figure 1. Fractionation by centrifugation of fresh *Hevea* latex. A: Freshly tapped latex (0 time); B: after standing at room temperature for 45 min; C: 60 min; D: 90 min; E: 120 min. (1: rubber phase; 2: C-serum; 3: bottom fraction).

time 0). After standing for 45 min at room temperature, the isolated intact BF started bursting (tube B, 45 min), and releasing B-serum content together with membrane debris into the clear aqueous C-serum as a turbid phase. After 1 hr (tube C), the C-serum became clearer as the membrane debris started binding onto the rubber phase, while C-serum was mixed with the released B-serum. After 1.5–2.0 h, (tube D, E) only two fractions remained as rubber and mixed C-serum phases, while the BF diminished. The membrane debris from disrupted BF was associated with the RP as puffy rubber phase (tube E). This could probably be a hydrophobic interaction with high binding affinity to the RP.

The study was repeated several times on different fresh latex samples with no added preservative. The average bursting time of the isolated BF was around 40–50 min.

The results thus clearly showed that prolonged storage or delayed use of fresh latex will yield only two fractions due to loss of the ruptured BF organelles. Therefore, a standard procedure was adopted for our experiments: to use only the RP and BF as obtained from tube A in Figure 1 for all the RB assays, if not indicated otherwise. The next study was carried out to see how the difference on RP proteins could be observed.

Comparison of the RP Proteins Under Different Conditions

Analyses on the RP associated proteins of different RP samples were carried out in this study. This is to discern protein patterns comparing the RP rapidly separated from the freshly tapped latex and BF diminished RP samples (Figure 1, tube A and E) and the preserved latex RP commonly used in RB study by others.^[13–18] The

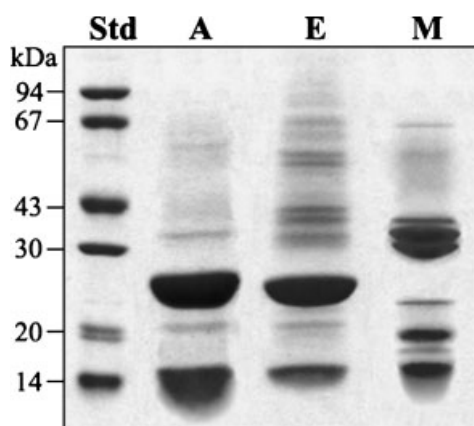


Figure 2. SDS-PAGE analyses of proteins extracted from different fractions of latex. A: Proteins from RP of freshly tapped latex (Figure 1, tube A); E: proteins from RP of the delayed use latex (Figure 1, tube E); C: proteins from WBM prepared from freshly tapped latex (Figure 1, tube A); Std: standard molecular weight proteins.

SDS-PAGE results revealed quite different protein patterns (Figure 2). The fresh RP (lane A of tube A) showed mainly two major proteins of 14 and 24 kDa with a few very faint protein bands. These two major proteins might be considered as intrinsic proteins of the RP. On the other hand, the RP from tube E showed several other prominent protein bands in addition to the two intrinsic ones (lane E). Comparison of the two samples (the RP from tube A and tube E) clearly suggested that the extra protein bands (lane E) were likely from the tightly bound BF membrane, even though both were extensively washed before protein analyses. The protein pattern (lane E) was similar to the result of the preserved latex RP protein profile as previously shown.^[32]

Examination of the additional bands revealed similar and common to some proteins extractable from the BF membrane (lane M). The results thus suggested that these RP extra proteins, probably derived from BF membrane fragments might help contribute RB activity to the RP. The preserved RP commonly used, as reviewed in the RB study^[13,18] might thus be attributed to the proteins or enzymes from the BF membrane. This observation might be used to distinguish the intrinsic RB activity of the RP, if ever its designated function, from RB activity of the washed BF membrane (WBM), as we have recently reported.^[21] A comparison between the fresh RP and WBM on the relative RB activity would certainly be critical to support this postulation and to an understanding of the actual biological function of the RP in *Hevea* latex.

RB Activity of Fresh RP and Washed BF Membrane (WBM)

In order to clarify the actual or exact RB site in the latex, RB activity of the isolated fresh RP and the washed BF mem-

brane (WBM) were carefully compared. Preceding results showed that the RP extra proteins were difficult to remove or wash out, be it intrinsic or BF membrane proteins. This might probably be a factor responsible for RB activity commonly observed with the preserved washed rubber particles (WRP) in those reports.^[12–14,18] Considering the high binding affinity, it is presumed that the burst BF membrane once associated with the RP, will act like a part of the RP component itself. So the isolated freshly tapped RP was used for all experiments to minimize this possibility and was compared to the BF membrane on RB activity. Results in Figure 3 clearly showed a big difference in RB function of the two specimens.

It was found that the RB activity of the isolated fresh RP was very low compared to the high RB activity of the WBM under the same assay conditions. The RB activity of the WBM was about 6.5 up to 7.8 fold higher than RP obtained from different samples of two separated experiments. The results were done in triplicate and quite convincingly indicated that the WBM did indeed possess the enzyme system for rubber formation. On the contrary, the fresh WRP as prepared (tube A, Figure 1) for this experiment had very low or no RB activity at all. This might be in contrast to the past reports and reviews that WRP was the site of rubber synthesis.^[13,18] It can be explained on the different degrees of contamination on the WRP with BF membrane which was then overlooked. Only quite recently we have presented the convincing evidence that the RB site is actually located on the BF membrane.^[20,21]

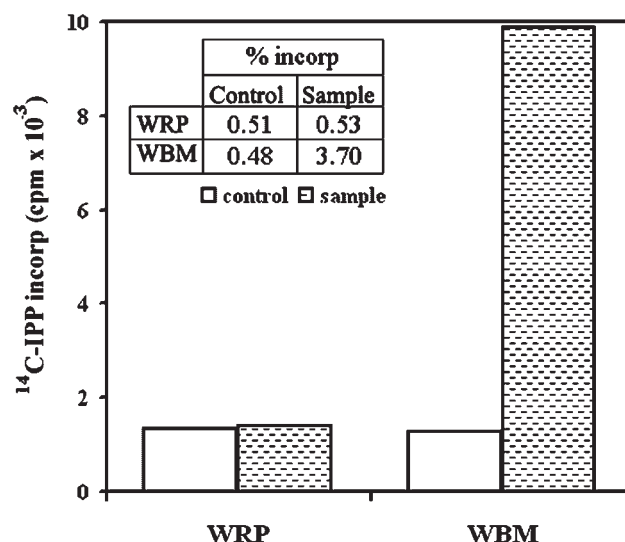


Figure 3. RB activity of WRP and WBM were shown as ^{14}C -IPP incorporation into rubber molecules. Each tube of incubation mixtures contained WRP or WBM (approx. 30 mg dry weight) and $20 \times 10^{-6} \text{ M}$ $[1-^{14}\text{C}] \text{ IPP}$ ($20 \text{ Ci} \cdot \text{mol}^{-1}$). All other conditions were followed as in Experimental Part. $20 \times 10^{-3} \text{ M}$ EDTA was added in the incubations used as controls. Inserted Table: Showing the percent incorporation of ^{14}C -IPP into the rubber.

Formation of Rubber Using UPP as Allylic Isoprene Units Acceptor

We have previously shown that the fresh BF particles possess both the IPPI and PT activities active in rubber synthesis.^[20,24] This was also found with BF membrane^[21] and as shown in the preceding results. A previous study showed that WRP could use the low MW allylic diphosphate for rubber synthesis with IPP,^[18] but WRP could not use UPP (C₅₅-UPP) to form the rubber.^[33] Recently, it was suggested that UPP is possibly elongated by IPP to form dolichols and eventually rubber molecules.^[17] Dolichols were quite abundant in *Hevea* tissues and latex and extensively characterized.^[34]

Experiments were carried out to test this postulation by incubation C¹⁴-UPP as the allylic acceptor for IPP substrate. Both the fresh RP and WBM were assayed under the same condition to test and compare RB activities. The results were quite stunning in terms of the different magnitude of RB activities (Figure 4) between the fresh WRP and WBM. The WRP showed very low or no RB activity, but the WBM was very active in the rubber formation from UPP. This was in agreement with a previous report that WRP was not active for rubber synthesis when incubated with UPP and C¹⁴-IPP substrate.^[33] It was noted that WRP had a higher incorporation ratio with C¹⁴-UPP than with C¹⁴-IPP incubation as shown in Figure 3. This might due to some minor proteins on the fresh WRP (Figure 2) with activity for UPP condensation and because the C¹⁴-UPP used in the assay was uniformly labeled.^[25] The formation of UPP by UPP synthase in *M. luteus* has been extensively

characterized.^[25] Recently it was suggested that UPP could also be a precursor in *Hevea* latex to form rubber.^[17]

The results in Figure 4 thus clearly show that WBM possess the enzyme system of a wide range for rubber synthesis, be it small allylic acceptors (GPP, FPP, GGPP) or a larger one like UPP in this study. In an earlier study, it was shown that the whole latex is active for rubber synthesis when incubated with UPP and C¹⁴-IPP,^[33] but was with no activity with WRP. This strongly supported our results with the WBM activity. The whole latex RB activity with UPP^[33] might likely be attributed to the BF membrane part and was in good agreement with our assays with the isolated WBM.

The difference between fresh WRP and WBM in their capability to catalyze the synthesis of rubber was thus very clear in this study. The active RB function of WBM indicated that it contains the membrane-associated enzyme system carrying out rubber synthesis. The enzyme system was absent in the fresh WRP, unless contaminated, as speculated. The finding thus strongly supported our report on rubber formation by fresh BF particles^[20] and a more recent study on the RB activity of WBM that did not require the presence of rubber particles.^[21] The kinetic of WBM enzymes for RB catalysis was thus studied in details.

Comparison of the Kinetics of the RB Catalytic Rate between WBF and WBM

The RB activity between the intact washed BF particles (WBP) and the derived membrane (WBM) was compared for the catalytic rate. This was a further study on the RB functions of the two as we previously reported,^[20,21] but not yet analyzed for the kinetic difference. The assays were to determine the saturation time point on rubber synthesis. The results showed a large difference in their kinetics (Figure 5) for RB activity. It took WBP 12 h to reach maximum activity, but only 2 h for WBM. This indicated that the WBM was six times more active than WBP. The results pointed out two important aspects: 1) that the BF membrane was fully equipped with all necessary enzymes to complete carrying out the RB function and 2) that the B-serum did not play an active role in the RB catalysis. The fast kinetic of the WBM could be attributed to the formation of small vesicles with a highly increased active surface area. The enzyme would be more accessible to the substrates as earlier described.^[35,36] This was in spite of a certain loss from washing the membrane derived from an equal amount of WBP as used in the study. WBM was then used in the further study of the membrane-bound enzyme properties.

We have earlier shown that the RB activity of WBM could be activated by the anionic detergent SDS^[21] but not by any other groups. It was not clear then how SDS could bring about this RB activation. It was commonly observed in WRP study that several detergents, but not SDS,

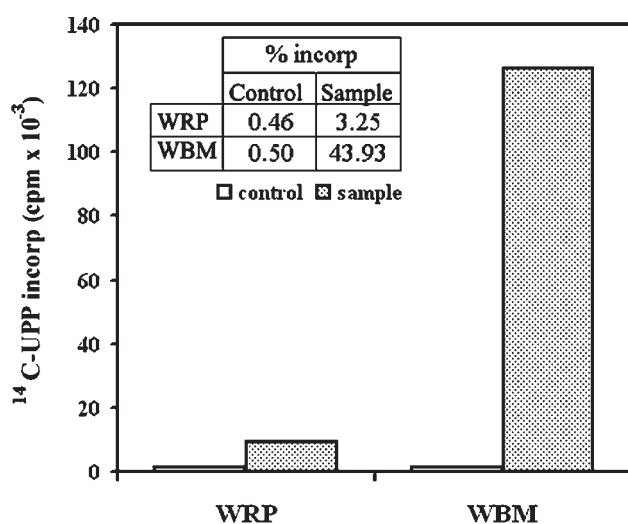


Figure 4. ¹⁴C-labeled rubber formed by the activity of WRP and WBM using ¹⁴C-UPP as an allylic substrate. Each tube of incubation mixture contained WRP or WBM (approx. 30 mg dry weight). The incubation condition was done according to Experimental part. 20×10^{-3} M EDTA was added in the incubations used as controls. Inserted table: Showing the percent incorporation of ¹⁴C-IPP into the rubber.

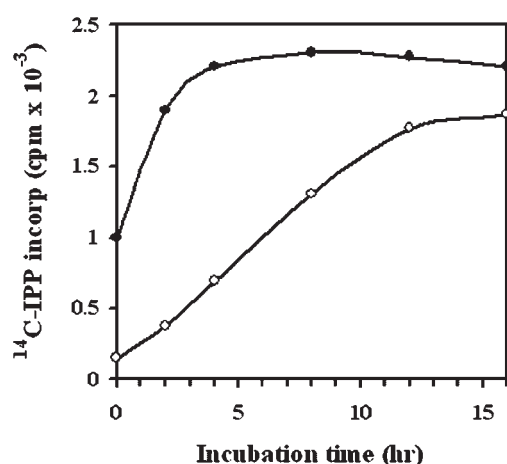


Figure 5. Kinetic of RB catalytic rate between WBP (○) and WBM (●). Each incubation contained WBP (approx. 20 mg dried weight) or WBM which was prepared from the same amount of WBP. The incubation assay condition was carried out as detailed in Experimental part.

could stimulate its RB activity.^[18] The BF membrane lipids was found with high content of phosphatitic acids and thus displayed a highly negative charged character.^[5] It was tempting to assume that SDS might have a mimic effect on the charged environment of the membrane. In addition, protein denaturation by SDS must also be considered. Examination on this unexpected surprising result revealed that the SDS effect was of biphasic character (Figure 6), being inhibitory at low level but then stimulating at higher concentration. This is in contrast to the WRP study that showed SDS to be a strong RB inhibitor.^[37] Activation by high [SDS] was quite pronounced in term of the magnitude on the RB, a three fold increase was seen at 0.150 M SDS.

It is remarkable that the increase in rubber synthesis displayed a dose response curve even at [SDS] above 0.15 M. A possible reason for this SDS biphasic effect might be the formation of micelles at high [SDS], thereby considerably increasing the active surface area^[35] for RB enzymes catalysis. The critical micelle concentration (CMC) of SDS is at 8.2×10^{-3} M, so a low [SDS] will cause denaturation of the enzymes, resulting in a decreased RB activity. At higher [SDS] the micelle will start forming together with the dissolved membrane as a mixed micelle^[36] with the incorporated RB enzymes. An EM study would contribute to a better understanding of this micelle phenomenon. It would be interesting to investigate if WBM extractable proteins are still active either alone or with micelle for the RB activity.

Protein Profile of Acetone-Fractionated WBM Proteins

Several procedures for membrane protein extraction are available^[35] and were tried. Among them the acetone

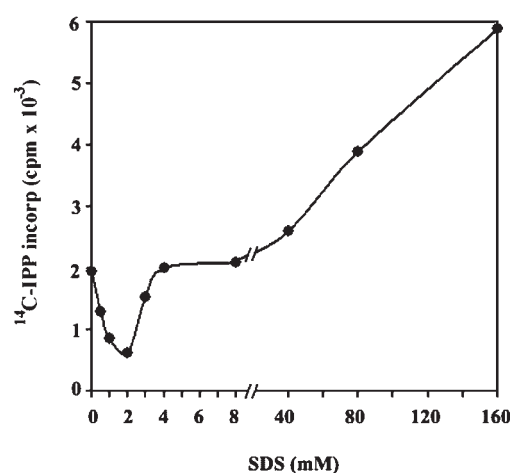


Figure 6. Biphasic nature of SDS activation on WBM enzymes. The RB activity of WBM at each SDS concentration was shown as the number of ¹⁴C-IDP incorporation into the rubber. The WBM (approx. 40 mg dried weight) was mixed with the SDS before subjected to the standard incubation condition as described in Experimental part.

method was found to be most satisfactory and suitable to be employed. The advantage of using acetone is to dissolve the soluble membrane while the released proteins are precipitated in the same treatment steps. Serial extraction of WBM proteins with acetone ranging from 20–80 vol.-% was devised in this study. The results showed that the membrane protein could be fractionated into different fractions by the acetone ranges as employed. A protein profile of distinct patterns by SDS-PAGE (Figure 7) was obtained, although overlap of some common proteins did occur. Most of the acetone-precipitated proteins were in the 40 and 80% (lane B, D) acetone ranges while moderate amounts were in the 20 and 60% (lane A, C) ranges. These fractions were then examined for possible RB activity.

RB Activity Detection of Acetone-Fractionated WBM Proteins

The protein fractions were dissolved with assay buffer for the standard incubation of RB activity. However, no RB activity could be detected in any fractions. It seemed that they might be inactive once separated from the native membrane, or that the protein composition was perturbed and different from the arrangement or topology as existing in the intact membrane. It could also be due to the absence of hydrophobic condition for them to be active. As was suggested from preceding results that high [SDS] could activate the RB activity assays, SDS was then added to the aqueous suspension of the inactive protein fractions. It was quite astonishing that the activity for rubber synthesis was thus restored by the SDS addition as shown in Table 1 for the RB levels.

Different amounts of SDS were attempted, and 2% SDS was found to be optimum for RB activity assays. Results for

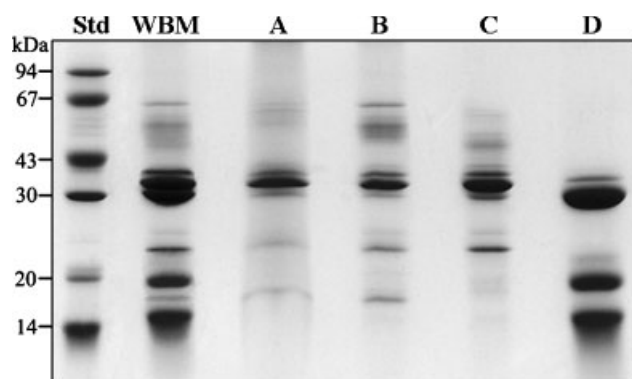


Figure 7. SDS-PAGE analyses of proteins profile from WBM proteins. WBM: proteins from WBM. The serial of acetone extract precipitated WBM proteins are shown in lane A–D. A: precipitated proteins at 0–20% acetone saturation; B: 20–40%; C: 40–60%; D: 60–80%; Std: standard molecular weight proteins.

each fraction (Table 1) showed that the maximum activity was in the 20% acetone protein fraction, whereas other fractions were much lower or without any RB activity. The RB activity was almost exclusively located in the 20% acetone fraction, which was almost equal or the same as WBM from which the protein was extracted. Repeated experiments with different preparations of samples consistently showed similar results, and thus helped to confirm the results obtained.

One explanation for this could be the formation of micelles. At 2% SDS ($8 \times \text{CMC}$), a lot of micelles with highly increased active surface area as compared to WBM could be formed with the incorporated enzymes. This might be accounted for the high RB activity even with lesser enzyme in the fraction. Although the membrane protein was distributed into fractions, it could be compensated by the highly increased active surface area for the micelle RB

Table 1. RB activity of the serial acetone fractionated proteins. The ranges of acetone percentage used were 20, 40, 60, and 80% (A, B, C, D fraction). The precipitated protein mixture in each incubation tube was prepared from the same WBM (approx. 40 mg dried weight) in the serial acetone fractionation. To all incubations were added 2% SDS (w/v) before being subjected to the standard incubation condition as detailed in the Experimental Part.

Sample	^{14}C -IPP incorp.	% incorp. ^{a)}
	cpm	
WBM (control)	6 655	9.6
A (20% acetone)	6 505	9.4
B (40% acetone)	1 080	1.0
C (60% acetone)	323	0.5
D (80% acetone)	121	0.2

^{a)} The data represent the average of three determinations.

catalysis. Increased activity of the isolated enzyme by hydrophobic condition or micelle was previously shown for polyisoprene synthesis in the other system.^[36] Another likely reason could be the possible separation of a certain inhibitory factor from this 20% protein fraction. An enzyme kinetic study was needed to substantiate the results. An experiment on remixing of the fractions could give support to the results and a rationale for the given explanation.

Enzyme Kinetics of the RB Active Protein Fraction

The preceding results suggested that the SDS micelles with the incorporated enzymes might be serving as a micro-reactor for rubber synthesis. To characterize the active rubber synthesis of this protein fraction, a kinetic study on the enzyme concentrations was carried out. The results showed that the RB activity was catalyzed by enzyme in this fraction, not by nonspecific trapping (Figure 8). Corresponding increases were seen with the enzymes in a dose dependent manner. A linear relationship was still observed at high enzyme levels with saturated IPP substrate. It was clearly indicated that the enzyme was still highly active even when the [SDS] above CMC replaced the native or natural membrane condition. The results suggested that it is possible to synthesize natural rubber *ex vivo* by a protein extract from BF membrane if proper or optimum conditions are provided to support or stabilize the isolated enzyme activity.

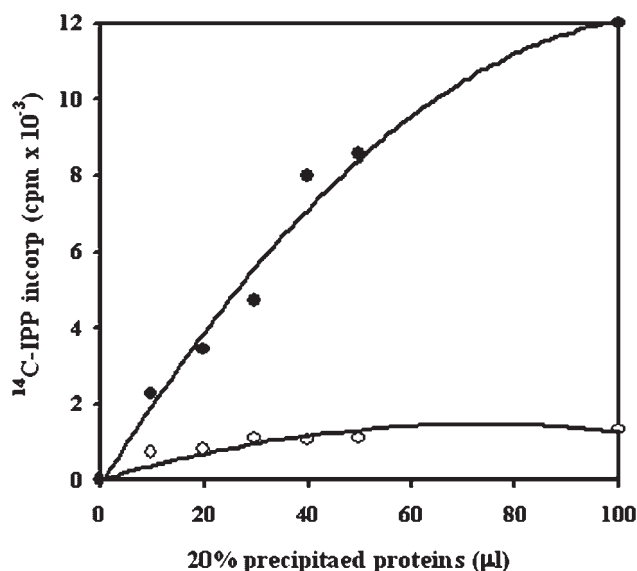


Figure 8. The activity of 0–20% acetone precipitated protein from WBM (●, $1.7 \text{ mg protein ml}^{-1}$). 2% SDS (w/v) was mixed with the samples before subjected to the standard incubation condition as described in Experimental part. Control (○) was carried out with the same condition as sample but with $20 \times 10^{-3} \text{ M EDTA}$ added in the incubation assay.

RB Activity of the Combined or Reconstituted Protein Fractions

As was discussed in the preceding results that fractionation of BF membrane proteins might lead to separation of certain inhibitory factor from the fraction that showed high RB activity (20% acetone protein, fraction A), it would be interesting to validate this assumption. The designed experiments were carried out by mixing the highly active fraction (fraction A) with other low or inactive RB fractions (fraction B, C, D), and the effect was followed. The combining was a reconstituted assay to see if changes in RB activity were affected by the additions. When the active 20% acetone fraction (A) was mixed with any of the other fractions (B, C, D), some changes or effect on the RB activity were observed. WBM and the mixed WBM activity would be serving as controls to verify the changes as occurring in the combining isolated fractions. These results of several RB incubation assays were summarized in Table 2 as the average values of three duplicate determinations.

When the active fraction A was mixed with fraction B, an increased RB activity was observed. This indicated that the slight activity in fraction B (shown in Table 1) was an overlap or spilled over from A and thus had an additive effect in the combined assay.

It might also be that fraction B contained an activator for RB activity as the total activity was a bit higher than the addition of the two isolated activities. Combining fractions A and C or A and D showed an opposite effect: the RB activity in fraction A was inhibited by both C and D fractions. The most pronounced effect was seen with D as fractions' A activity was totally diminished. Complete inhibition exerted by fraction D indicated that the inhibitor protein is present in this fraction upon acetone separation of the proteins from BF membrane. When the intact WBM was mixed with this fraction D, again the same complete inhibi-

tion of RB activity was also observed similar to that seen with the RB active fraction A (Table 2). This might lend a strong support to the result seen in the 20% acetone protein fraction A that showed quite unusual high RB activity. It was expected to have lower activity due to the redistribution of enzymes upon fractionation by the acetone. It is not known whether the active fraction A also contains an activator of the RB enzymes and hence the unusual high RB activity. Combining or reconstitution experiment was a common practice when studying the interaction of different fractions as previously reported for WRP activation by C-serum addition^[38] or activation of HMGR on BF membrane by C-serum calmodulin.^[11] It certainly needs further study as shown recently^[39] and more reconstitution assays are in progress.

The two inhibitory results for both WBM and the isolated active protein fraction was a strong evidence that the RB activity of the BF membrane was tightly controlled in a well regulated manner. The results from both were complementary and supporting one another in the control mechanism that certainly exists in the membrane enzyme system. It was something not totally unexpected from these results considering the fact that most if not all the biochemical processes need to have well regulated control mechanisms, for metabolic balance and a coordinated process of the overall metabolic pathways integration and balanced cell functions.

This is indeed a totally new finding and quite an exciting result of the BF particles function in the latex. It thus strongly suggested that the RB enzyme in the membrane is not only capable of catalysis for rubber synthesis, but it also contains a controlling element in regulatory mechanism for the rubber synthesis and the biogenesis control. This original preliminary finding on the control process of rubber synthesis needs a careful examination with well designed experiments to verify in detail the regulatory mechanism that pertains to the BF membrane for the control synthesis of new rubber molecules. Therefore, this certainly warrants a more detailed study and further refined investigation to gain a better understanding of the BF membrane functions in their active roles for rubber synthesis and the control mechanism in the *Hevea* latex.

Conclusion

Rubber synthesis was unequivocally demonstrated to occur on the bottom fraction (BF) particles surface or the washed bottom fraction membrane (WBM). The rubber biosynthesis (RB) activity of WBM was much higher than the rubber particles (RP) surface. Generally, RP was considered to be the only RB site. Our results suggested that the RB activity observed with the washed rubber particles (WRP) surface might be due to the associated membrane fragments from rupture of the BF particles. The WBM was highly

Table 2. Reconstitution experiments on RB activity of acetone fractionated proteins. Acetone ranges were as in Table 1 (fraction A was mixed with each of the other fractions). The protein fraction in each incubation tube was prepared from the same WBM in serial acetone fractionation. WBM used in this study was approx. 40 mg dried weight. All incubations were mixed with 2% SDS (w/v) before being subjected to the standard incubation condition as described in the Experimental Part. Intact WBM and WBM + D were also tested for comparison with the isolated protein fractions.

Sample	¹⁴ C-IPP incorp.	% incorp. ^{a)}
	cpm	
WBM (control)	6 915	10
A (control)	6 750	9.8
A + B	8 580	12.4
A + C	990	1.4
A + D	866	1.3
WBM + D	467	0.7

^{a)} The data represent the average of three determinations.

active with C₅₅ (UPP) as an allylic acceptor for the isopentenyl diphosphate isomerase (IPP) in rubber synthesis, but was inactive for the WRP. SDS was a strong RB activator for WBM, probably due to micelle formation, thereby highly increasing the active surface area, resulting in a high RB activity with WBM. The SDS effect was of biphasic manner: inhibition at low SDS concentrations, but activation at high ones.

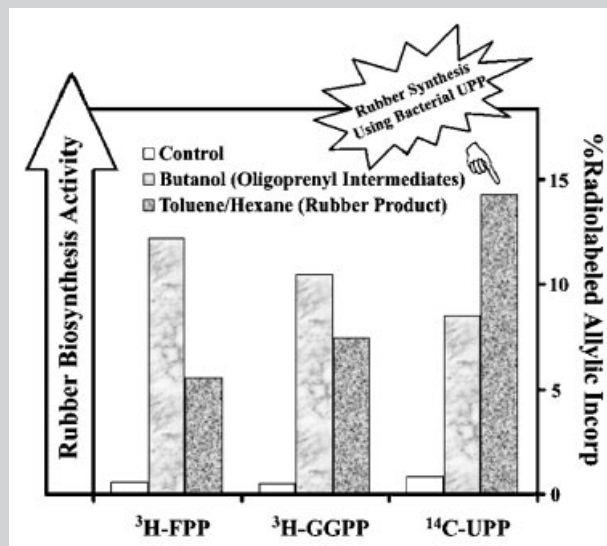
Serial acetone extraction of WBM proteins showed that isolated fractions still have RB activity under appropriate conditions. An RB regulatory protein was also detected in this study.

Acknowledgement: This work was supported by *Thailand Research Fund (TRF)* and in part by BIOTEC of the *National Science and Technology Development Agency*.

- [1] R. A. Backhaus, *Israel J. Bot.* **1985**, 34, 283.
- [2] F. Lynen, *Pure Appl. Chem.* **1967**, 14, 137.
- [3] D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, in: "Biopolymers, Vol. 2, Polyisoprenoids", T. Koyama, A. Steinbuchel, Eds., WILEY-VCH, Weinheim 2001, chapter 6, p. 151.
- [4] L. N. S. Homans, J. W. Van Dalfsen, G. E. Van Gils, *Nature* **1948**, 161, 177.
- [5] J. Dupont, F. Moreau, C. Lance, J. L. Jacob, *Phytochemistry* **1976**, 15, 1215.
- [6] S. Pujarniscle, *Physiol. Veg.* **1968**, 6, 27.
- [7] P. B. Dickenson, *J. Rubber Res. Inst. Malaya* **1969**, 21, 543.
- [8] J. B. Gomez, S. J. Hamzah, *Natl. Rubber Res.* **1989**, 4, 75.
- [9] R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, P. Suwanmanee, *Phytochemistry* **1990**, 25, 1401.
- [10] C. R. Benedict, in: "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Volume 2", J. W. Porter, S. L. Spurgeon, Eds., John Wiley & Sons, New York 1983, p. 355.
- [11] R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, S. Dumkong, *Phytochemistry* **1990**, 29, 1755.
- [12] B. L. Archer, B. G. Audley, E. G. Cockbain, G. P. McSweeney, *Biochem. J.* **1963**, 89, 565.
- [13] B. L. Archer, B. G. Audley, *Bot. J. Linnean Soc.* **1987**, 94, 309.
- [14] R. G. O. Kekwick, in: "Physiology of Rubber Tree Latex", J. d'Auzac, J. L. Jacob, H. Chrestin, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL 1989, p. 145.
- [15] A. Kush, *Plant Physiol. Biochem.* **1994**, 32, 761.
- [16] Y. Tanaka, A. H. Eng, N. Ohya, N. Nishiyama, J. Tangpakdee, S. Kawahara, R. Wititsuwannakul, *Phytochemistry* **1996**, 41, 1501.
- [17] N. Ohya, T. Koyama, in: "Biopolymers: Vol. 2, Polyisoprenoids", T. Koyama, A. Steinbuchel, Eds., WILEY-VCH, Weinheim 2001, chapter 4, p. 73.
- [18] B. G. Audley, B. L. Archer, in: "Natural Rubber Science and Technology", A. D. Roberts, Ed., Oxford University Press, Oxford 1988, chapter 2, p. 35.
- [19] G. F. J. Moir, *Nature* **1959**, 84, 1626.
- [20] J. Tangpakdee, Y. Tanaka, K. Okura, T. Koyama, R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, *Phytochemistry* **1997**, 45, 269.
- [21] D. Wititsuwannakul, A. Rattanapittayaporn, R. Wititsuwannakul, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 87, 90.
- [22] B. L. Archer, B. G. Audley, F. L. Bealing, *Plast. Rubber Int.* **1982**, 7, 109.
- [23] T. Koyama, D. Wititsuwannakul, K. Asawatreratanakul, R. Wititsuwannakul, N. Ohya, Y. Tanaka, K. Okura, *Phytochemistry* **1996**, 43, 769.
- [24] J. Tangpakdee, Y. Tanaka, K. Okura, T. Koyama, R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, *Phytochemistry* **1997**, 45, 261–267.
- [25] N. Shimizu, T. Koyama, K. Ogura, *J. Biol. Chem.* **1999**, 273, 19476.
- [26] R. K. Scopes, in "Protein purification principles and practice", 3rd edition, Narosa Publishing House, New Delhi 1994, p. 346.
- [27] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248.
- [28] D. R. Light, M. S. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 18589.
- [29] J. B. Gomez, W. A. Southorn, *J. Rubber Res. Inst. Malaya* **1969**, 21, 513.
- [30] S. W. Pakianathan, G. F. J. Milford, *J. Rubber Res. Inst. Malaya* **1973**, 23, 391.
- [31] H. Y. Yeang, S. A. M. Arif, F. Yusof, E. Sunderasan, *Methods* **2002**, 27, 32.
- [32] H. Hasma, *J. Natl. Rubber Res.* **1987**, 2, 129.
- [33] D. R. Light, R. A. Lazarus, M. S. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 18598.
- [34] S. Tayeyama, R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, H. Sagami, K. Ogura, *Phytochemistry* **1999**, 51, 11.
- [35] P. R. Cullis, M. J. Hope, in: "Biochemistry of Lipids and Membranes", D. E. Vance, J. E. Vance, Eds., Benjamin/Cummings, Menlo Park 1985, p. 25.
- [36] T. Baba, C. M. Allen, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 200, 474.
- [37] M. S. Dennis, D. R. Light, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 18608.
- [38] D. R. Light, M. S. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 18589.
- [39] Y. Kharel, T. Koyama, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 111.

Summary: Washed bottom fraction (BF) membrane-bound particles of centrifuged fresh *Hevea* latex were found to be very active in rubber biosynthesis (RB). The washed BF membrane (WBM) showed higher RB activity and is strongly stimulated by anionic surfactants – more by DOC than SDS. WBM enzymes system can synthesize rubber either with allylic isoprenes (higher RB) or without (lower RB). Washed rubber particles (WRP), used generally in RB assays, had very low RB activity compared to the much higher activity observed for WBM. Bacterial undecaprenyl diphosphate (C_{55} -UPP) was very active allylic initiator for rubber synthesis by WBM. Comparisons of allylic UPP with the shorter ones (C_{15} -FPP, C_{20} -GGPP) showed that UPP was the most effective. WBM activity orders were $UPP \gg GGPP > FPP$. The DOC activated WBM synthesized less polyprenyl intermediates (butanol extractable) but more final rubber product (toluene/hexane extract), different than FPP and GGPP. WBM enzymes were highly versatile in using diverse different allylics, but UPP was most preferable. WRP was found a little active for UPP with DOC, but still much lower than WBM. Rubber product analysis by RP-TLC with acetone/hexane solvent system showed that WBM was mostly rubber, but WRP was mainly the intermediates. Quantitative analysis showed that WBM labeled rubber was confined to the origin spot, different than WRP as mainly labeled intermediates. It

was thus confirmed that the WBM plays the key role in RB functions, and not WRP as mostly reported. WBM served as the actual rubber synthesis site, and bacterial UPP was very good RB initiator.



Significant Role of Bacterial Undecaprenyl Diphosphate (C_{55} -UPP) for Rubber Synthesis by *Hevea* Latex Enzymes

Atiya Rattanapittayaporn,¹ Dhirayos Wititsuwannakul,^{*2} Rapepun Wititsuwannakul¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkla 90112, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand
Fax: 662-248-0375; E-mail: scdwt@mahidol.ac.th

Received: July 4, 2004; Accepted: August 24, 2004; DOI: 10.1002/mabi.200400096

Keywords: bacterial UPP; *Hevea* latex enzymes; membranes; rubber biosynthesis; surfactants

Introduction

It has been demonstrated and reported for quite some time that the *Hevea* latex was active^[1,2] in the synthesis of rubber molecules. Study on rubber biosynthesis (RB) process is of much interest and has appeared in several reviews.^[3–7] The most extensive and up to date review covering most aspects of the *Hevea* latex structure and biochemistry^[8] appeared recently with full details, discussions and the perspective outlooks. Decent understanding of the RB process is still ambiguous and the clear evidence has yet to be convincingly presented.

Most studies focused mainly on rubber particles (RP) surface and always reviewed^[3–7,9] as the only prerequisite site required for rubber synthesis. This might seem puzzling, an obvious paradox, on how the RP was originated. If the new rubber has to be synthesized on its surface, the question remains of the origin of RP. In layman term, one might say this is the question of chicken and egg that has long been overlooked or ignored. The actual RB initiation sites other than the RP surface with active rubber formation need to be sought out. It is therefore still an open question as to the actual specific site for synthesis of rubbers

molecules that will eventually aggregate to form the RP. If one considers the complex nature of *Hevea* latex and its myriad compositions, it might possibly be that RB can take place at specific sites other than the RP surface. This is an active area of our research.

The rubbers in latex from various plants^[10] are polyisoprenes of high molecular weight hydrocarbon polymers consisting of the five-carbon isoprene (C_5H_8) units. Rubber is major component of latex formed by special differentiated cells of plants. Synthesis is by series of enzyme polymerization^[11] of isoprene units to various degrees, resulting in a wide range of MW. The high MW rubbers are produced in the latex of about 300 genera of Angiosperms. *Hevea brasiliensis* (Brazilian rubber trees) is the best rubber producer, and commercially cultivated for natural rubber production used industrially for various products. *Hevea* latex is accumulated in specialized cells called laticifers. Double bonds in *Hevea* rubber are in *cis* configuration as *cis*-1,4-polyisoprene, with a wide range of MW distribution. In addition to rubber particles, two other specialized particles (lutoids and Frey-Wyssling) are also present as major part of *Hevea* latex. Presence of the two particulate components provides unique characteristic to *Hevea* latex properties. *Hevea* latex biochemistry was thoroughly reviewed recently.^[8]

Fresh *Hevea* latex can be fractionated into three fractions by centrifugation, the top rubber phase, aqueous C serum and bottom fraction (BF) of membrane-bound organelles. BF content is quite considerable, constituting about 20% by volume^[8] compared to ca. 30% of the rubber phase. The BF is composed of membrane-bound organelles, lutoids and Frey-Wyssling particles. Fresh latex is a colloidal mixture of three different particles with cell soluble substances in an aqueous suspension. Lutoids first described by Homans et al.^[11] as single layer membrane-bound vacuoles, found rich in phosphatidic acids,^[12,13] rendering them negatively charged vesicles. Lutoids contents (B-serum) are proteins, enzymes and a wide range of metabolites, considered as a type of phytolysosomes.^[13] Frey-Wyssling are double layer membrane organelles with lipid globules, membrane vesicles and β -carotene.^[14,15] The high carotenoid content suggested it probably contain enzymes for isoprenoids synthesis pathway.^[14] So far, few studies were made to suggest the related metabolic roles of BF particles in the isoprenoids and/or RB pathways.^[14,16] HMG-CoA reductase (HMGR), one of the rate-limiting enzymes in RB pathway,^[17,18] was purified from the washed BF membrane.^[16] It was shown to be under control by calmodulin,^[19] heat stable Ca^{2+} binding protein in C-serum, as HMGR activator.

It was commonly believed that RP surface was RB active, as extensively characterized and reported in a series of four consecutive papers with lot of extensive details.^[20–23] However, RB activity at certain membrane site is more likely with good rationale reconciling on the origin of RP. This was earlier postulated,^[14,24] but received little atten-

tion and no investigation was carried out to substantiate it. Study conditions, free of preexisting rubber particles, will serve as an ideal system to solve this query. *Hevea* latex is regarded as the living cytoplasm in which the rubber particles, the non-rubber particles and other cell components are dispersed in an aqueous phase of cytosol. Of particular interest is the membrane-bound non-rubber particle in the latex that may have active role in the RB function. Recently, we have shown that the surface of these particles was quite active in the synthesis of new rubber.^[25,26] The results might suggest that actual RB site may be localized on these particles membrane rather than the RP surface, as stated in our recent reports,^[26,27] in contrast to previous numerous studies which implicated RP surface as the only prerequisite site for the *in vitro* RB process.^[2,9,28] Our different results^[25–27] could suggest that there might be more than one site for RB activity in the latex. However, it is still doubtful and needs clarification considering our BF reports on RB related enzymes.^[25,29,30] IPP isomerase (IPPI) in the *Hevea* latex was first directly detected and characterized^[29] by us. IPPI and prenyltransferase (PT) high activities detected on BF were characterized^[29,30] for their properties. The highly active rubber formation by fresh BF particles^[25] was clearly shown. Kinetic study on RB activity and products analyses showed new appearance of the low MW rubber.^[25] The results suggested the synthesis of new rubber being initiated and formed by these particles enzymes. Further careful studies on RB activity of the membrane^[26] from the BF particles were carried out with detailed properties characterized. Extensive washed BF membrane (WBM) showed high RB activity, clearly indicating that the RB activity was located on the isolated membrane. The RB stimulation of WBM by surfactant is probably resulting from the increased active surface area of RB active mixed micelles. In a recent report,^[27] the delayed use of fresh latex led to rupture of BF particles and membrane debris bound to the WRP was shown. This may be the case for those using the preserved WRP with RB activity^[3–7,9] as resulted from the bound debris. The most noticeable result was the serial acetone extracted WBM proteins being still RB active.^[27] Recently, two *Hevea* latex genes^[31,32] were successfully cloned with high activity. One was dominant PT enzymes in latex, GGPP synthase, rubber transferase was also cloned (termed HRT) that was RB active with WBM, strongly support WBM role.

It was quite intriguing that an exquisite idea proposed recently on microbes might be capable of producing rubber.^[33] This coincides with our ongoing research on rubber synthesis from bacterial undecaprenyl diphosphate (C_{55} -UPP). Among family microbial prenyltransferases, UPP synthase (UPS)^[34,35] has been most extensively studied. It was purified and characterized from several bacteria (*S. newington*,^[36] *B. subtilis*,^[34] *E. coli*,^[37,38] *L. plantarum*,^[39–43] and *M. luteus*^[44,45]). UPP is required as a

lipid carrier of glycosyl residues in synthesis of bacterial cell wall. For this RB study, we employ ¹⁴C-UPP prepared as described in the literature^[46] and provided to us for using as allylic initiator of rubber synthesis by WBM.

In this report we will describe the significant role of UPP in RB process. Comparisons with other shorter allylics (C₁₅-FPP, C₂₀-GGPP) on the RB levels and efficiency are also reported. Surfactant DOC effect was tested and compared to SDS on RB activation.^[26,27] Comparisons of WBM and WRP activities with UPP are also made. In addition product analyses, qualitative and quantitative on the rubbers formed with UPP are extensively presented here.

Experimental Part

Materials

Isopentenyl diphosphate (IPP), farnesyl diphosphate (FPP), sodium dodecyl sulfate (SDS), deoxycholic acid (DOC) and organic solvents are all of analytical grade. Other analytical chemicals and reagents used in this study were mainly purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). [1-¹⁴C] Isopentenyl diphosphate (¹⁴C-IPP, 54 mCi mmol⁻¹) was from Amersham Biosciences. [1-³H] Farnesyl diphosphate (³H-FPP, 20 Ci mmol⁻¹), [1-³H] Geranylgeranyl diphosphate (³H-GGPP, 20 Ci mmol⁻¹) were from American Radiolabelled Chemicals Inc. Uniformly labeled undecaprenyl diphosphate (¹⁴C-UPP) and the UPP synthase (UPS) were generously provided by Prof. Dr. Koyama (Tohoku University, Japan). They were also prepared by us according to the published procedure^[46] using the UPS enzyme with the same quality and purity as provided.

Collection of Fresh Latex for Centrifugation

Fresh latex used in this study was obtained from regularly tapped rubber trees (clone RRIM 600) at the adjoining Songkla Rubber Research Center, Thailand. These trees were tapped in a half-spiral with V-shape knife by stripping the bark (2–3 mm thick) to make cuts across the latex vessels. All preparations for fresh latex fractionation were made ready beforehand, prior to the latex collection. The latex was collected in ice-chilled containers and was immediately subjected to centrifugation within less than 10 min from the tapping collection time.

Preparation of Washed Bottom Fraction Membrane (WBM)

The freshly tapped latex was immediately fractionated by centrifugation to obtain the three distinct fractions as described^[16,26,27] with maximum sediment bottom fraction (BF) and minimum rubber particle (RP) associated or contaminated protein. The collected BF was washed five times by careful suspension in 50 × 10⁻³ M Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.9% NaCl (w/v) so that the intact washed bottom fraction particle (WBP) was obtained with no accompanied small RP. The washed BF membrane (WBM) was then prepared from the intact WBP as described.^[26,27] The cleaned WBP pellet was suspended in 3 volumes of distilled water and stirred for hypo-

tonic lysis of WBP. All contaminants were then eliminated from the membrane by three times repeated washing. All operations were carried out at 0–5 °C for membrane integrity and stability. The WBM was kept in the ice-bath until use.

Preparation of Washed Rubber Particles (WRP)

Rubber particles was prepared from the centrifuged zone 2 rubber as described^[24] by three repeated washing with 5 volumes of 50 × 10⁻³ M Tris-HCl buffer (pH 7.4) to obtain the WRP for assays. All operations were carried out at 0–5 °C. The prepared WRP was kept cool in icebox until use. The rubber quantity was determined by measuring the absorbance at 280 nm. The rubber content was calculated as described by Light and Dennis.^[20]

Rubber Biosynthesis (RB) Assays and Incubation Conditions

The incubation mixture contained designated amount of samples (WBM or WRP) in Tris-HCl buffer, pH 7.7. The 50 × 10⁻³ M Tris-HCl buffer (pH 7.7) for the RB assays included reagents (30 × 10⁻³ M KF, 5 × 10⁻³ M MgCl₂, 10 × 10⁻³ M DTT). The substrate unlabeled IPP (or ¹⁴C-IPP) and allylic initiators (³H-FPP, ³H-GGPP or ¹⁴C-UPP) were added as indicated in the figure and table captions. 20 × 10⁻³ M EDTA was added in the incubation uses as control as mentioned in figure captions. All the RB incubation mixtures were carried out at 30 °C for 2 h. After 30 °C optimum incubations, the reaction was chill stopped by placing the incubation tubes in an icebox and was immediately processed for the radiolabeled products extraction and product analysis.

Two-Steps Differential Solvents Extractions of Radiolabeled Products

Right after the reaction was stopped, 300 µl saturated NaCl solution was added and mixed thoroughly. The mixture was then treated (three times) with 500 µl H₂O saturated 1-butanol. The radioactivity in 1-butanol phase was subjected to a liquid scintillation counter to estimate the amount of radiolabeled polyprenyl intermediate. The aqueous layer (with membrane at the interphase) left after 1-butanol extraction was again treated (three times) with 500 µl of toluene/hexane (1:1, v/v). The amount of radioactivity in toluene/hexane phase was determined for the RB activity by measure the ¹⁴C-labeled rubber with liquid scintillation counter. The product analysis of 1-butanol and toluene/hexane extracts were then performed on RP-TLC as described below.

Product Analysis by Using Reverse Phase Thin Layer Chromatography (RP-TLC)

The radiolabeled products from the incubation mixtures extracted in 1-butanol and toluene/hexane were hydrolyzed to the corresponding alcohols with potato acid phosphatase.^[47] The products were subjected to RP-TLC plate (LKC-18, Merck) using acetone/hexane (19:1, v/v) as the solvent system.^[48] The RP-TLC plates were then exposed overnight on a Fuji film BAS-III imaging plate at room temperature. The

distributions of radiolabeled products were visualized with bioimage analyzer (Fuji BAS 1000 Mac). The sizes of the radiolabeled products were determined comparing with the authentic standard alcohols that were run along with the samples and visualized with iodine vapor.

Results and Discussion

The results presented in this report are further investigations with more refined and well designed experiments to delineate the results we previously reported.^[27] This is for a better understanding of the RB process and activity of the latex WBM. The results and observations are logically interpreted for rationale explanation of the possible underlying RB mechanism. New methodology and experimental procedures are employed for a more detailed study on the active role of WBM in synthesis of new rubber molecules. Different allylic isoprene pyrophosphate initiators for the rubber synthesis activity were tested and compared for their suitability and efficiency, especially the bacterial C₅₅-isoprene UPP. Surfactant study was also including DOC effect on RB activity as an extended study comparing to the SDS. Differential solvent extractions were employed for the separation of polyisoprene intermediates and the rubber product. In addition, separation of the products by RP-TLC was characterized on both qualitative and quantitative evaluations. The results obtained in this study strongly substantiated our earlier findings^[25,26] and are extensively discussed as presented in this report.

Comparison of WRP and WBM in Rubber Synthesis Activity Using IPP Alone or with UPP as Allylic Initiator

Fractionation of fresh *Hevea* latex by high speed centrifugation resulted in three distinct fractions as top rubber phase, middle aqueous C-serum, and the sediment bottom fraction (BF) particles of membrane-bound organelles. The BF content of fresh latex is quite considerable, constituting about 20% by volume^[8] as compared to an average of ca. 30% of the rubber phase. We have recently shown that the cleanly washed surface of these particles was quite active in the synthesis of new rubber molecules.^[25,26] This is in contrast to the numerous previous studies in which the washed rubber particles (WRP) surface was implicated as the one and only prerequisite site for the *in vitro* RB process.^[2,9,28] That there might be more than one site for RB activities in the latex is still doubtful and needs clarification considering our BF particles reports on RB related enzymes.^[25,29,30] The washed BF membrane (WBM) was unequivocally demonstrated to be highly active in the RB process when incubated with IPP alone as shown in our recent report.^[27]

The result presented in Figure 1 is an attempt to clarify the roles of WRP and WBM in RB activities. Two sets of RB incubations for WRP and WBM were carried out in the presence of 2% SDS under the same conditions, as we have previously shown the SDS on RB activation of WBM.^[26,27] The RB incubations assays were either with ¹⁴C-IPP alone (Figure 1, A) or ¹⁴C-UPP and IPP (Figure 1, B) for both WRP and WBM to monitor the levels of new rubber formation. This is to compare the RB activities with and without allylic isoprene and to assess the UPP function in the RB process. Besides this, the experiment is also aimed at the possible use of bacterial derived oligoprenyl UPP for the *in vitro* rubber synthesis by the *Hevea* enzymes.

It was quite clear that the allylic UPP was very effective to initiate or activate the new rubber synthesis as shown with the maximum RB activity for WBM (Figure 1, B2). All the assays with their specific controls are by the presence of 20×10^{-3} M EDTA that can completely inhibit RB activity. The overall results (Figure 1-A, 1-B) clearly indicated that the WBM was very active using microbial UPP in the synthesis of new rubber by WBM and only slightly by WRP. In the assays with ¹⁴C-IPP alone (Figure 1-A), WBM was quite active as compared to the WRP activity (A2, A1) with more than 4 folds activity over the very low or no WRP activity. The results are in good agreement with our earlier reports^[26,27] that WBM was RB active with IPP. Addition of allylic UPP to RB incubations (Figure 1-B) was even more

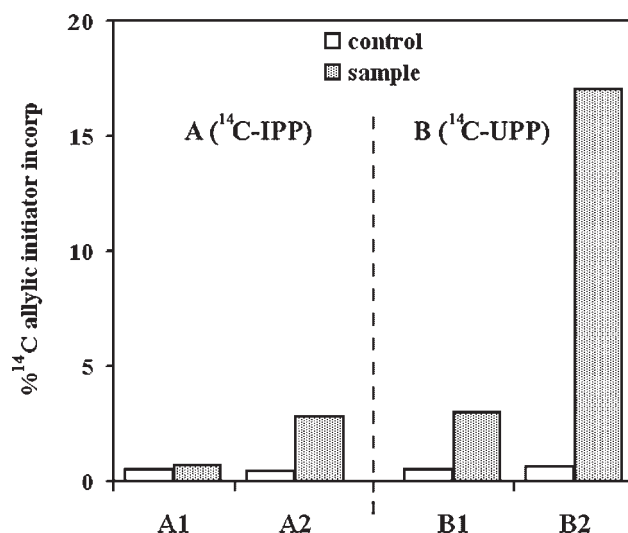


Figure 1. RB activity of WRP (1) and WBM (2) in the incubations with ¹⁴C-IPP (A) or ¹⁴C-UPP (B) as allylic initiators. The activity was shown as percent of the ¹⁴C-allylic initiators incorporation into rubber molecules. Each tube of incubation mixture (300 µl) contained WRP or WBM (approx. 30 mg dry weight) in 50×10^{-3} M Tris-HCl buffer (pH 7.7), 2% SDS (w/v), 30×10^{-3} M KF, 5×10^{-3} M MgCl₂, 10×10^{-3} M DTT and 40×10^{-6} M ¹⁴C-IPP (5 ci mol⁻¹). In the case of using ¹⁴C-UPP, unlabeled IPP (60×10^{-6} M) was added together with the ¹⁴C labeled bacterial UPP (245,000 cpm). 20×10^{-3} M EDTA was added in the incubations used as controls.

striking as evidenced by the very much more increase of WBM activity and only moderately by WRP (B2, B1). WBM activity was about 6 folds higher than that of WRP with UPP. The WRP result was in contrast to previous report that UPP could not be used for RB by WRP^[21] and that the RB activity inhibited by SDS.^[22] It was thus clear that UPP was very suitable for RB process.

Comparison of WRP activities showed that addition of allylic UPP resulted in about 4 folds increases over that with IPP alone (B1, A1). Numerous earlier WRP study with short allylic isoprenes (GPP, FPP, GGPP) reported the active RB function of WRP.^[2,9,28] However, those studies were carried out with WRP prepared from the preserved latex that was quite different from our WRP immediately fractionated from the freshly tapped latex with minimum contamination by bound rupture BF membrane debris as we recently demonstrated^[26,27] with very low RB activity. RB activity of the WBM with UPP was more than 6 folds higher than that with IPP alone (B2, A2). In fact, the WBM activity with IPP alone was already quite high (A2) about equal to WRP activity with UPP (B1), but was even much higher upon addition of UPP to the WBM assay (B2). These results clearly indicated that UPP is more favorable by the WBM enzymes in using allylic UPP as isoprene initiator for new rubber formation.

From these results it would be very interesting to further examine and characterize the WBM activity using allylic UPP as prenyl initiator for the rubber synthesis. Products of the WBM activities could also be further characterized by employing more refined two-steps differential solvent extractions. This will help in differentiating and separation of oligoprenyl intermediates from the final rubber product to ascertain rubber purity. Besides, the anionic surfactant activation on RB activity of WBM should also further be characterized. Aside from SDS, DOC is also commonly used as anionic surfactant in most biochemical and enzyme study and should be tested on the WBM activities.

Effect of Anionic Surfactants on RB Activities of WBM

As stated in preceding results, WBM was highly capable of using microbial allylic UPP in new rubber synthesis and was activated by SDS as was shown for the RB activity with IPP.^[26,27] Since the goal of this study is to clarify and characterize the utilization of UPP by WBM and try to understand the role of UPP influencing WBM activities, so the followed experiments will focus on this longer chain isoprene. This will also be compared to other short chain allylics in subsequent assays. Comparison results of the anionic surfactants effect on WBM activities, deoxycholic acid (DOC) and SDS, will be presented. In addition, two-steps differential solvent extractions will also be used for products analyses of WBM activities with UPP. The differential solvents are water-saturated butanol that we have previously used in dolichols or polyprenols^[49] assays and

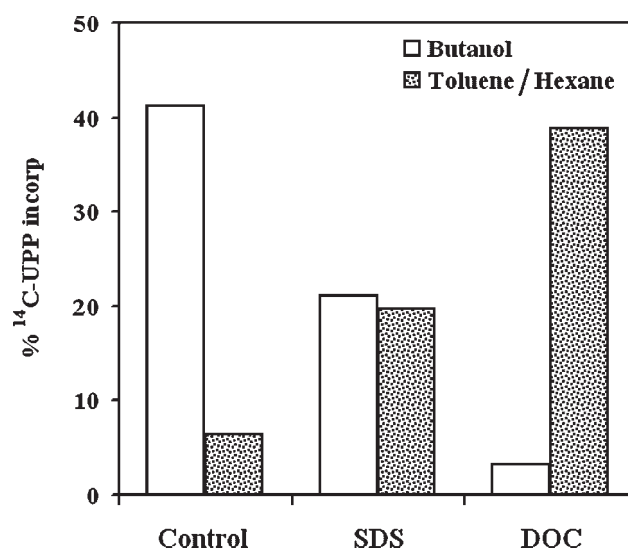


Figure 2. Effect of anionic surfactants (SDS and DOC above critical micelle concentrations) on RB activity of WBM enzymes. The results were shown as percent ¹⁴C-UPP incorporation into polyprenyl intermediates that were extracted by 1-butanol. The RB activity for rubber products were shown as percent ¹⁴C-UPP incorporation into rubber which was detected from toluene/hexane (1:1, v/v) extract. The incubation mixture (200 μ l) contained WBM (approx. 20 mg dry weight) in 50×10^{-3} M Tris-HCl (pH 7.7), 30×10^{-3} M KF, 5×10^{-3} M MgCl₂, 10×10^{-3} M DTT, 60×10^{-6} M unlabeled IPP, ¹⁴C-UPP (100 900 cpm) and the surfactants (SDS or DOC). No detergent was added in the control condition.

toluene/hexane routinely used in rubber extraction and purification.^[25–27]

Figure 2 results showed the different effects of SDS and DOC on RB activity of the WBM incubated with ¹⁴C-UPP and IPP. Upon completion of RB incubation assays, the products mixture was first extracted with butanol and the remaining mixtures were then subjected to toluene/hexane extraction for the final rubber products as detailed in the experimental part. Butanol extraction of the RB reactions was included as added step in the procedures before the determination of rubber by toluene/hexane extract as routinely carried out in our assays^[25–27] for the RB activity. The extracted products in butanol fractions are for the purpose of detection for oligo- and polyisoprenyl intermediates prior to the final rubber product. To our knowledge, no other investigators performed or included this added butanol step in their rubber synthesis assays. The accuracy of those RB studies with WRP^[2,9,20–22,28,50] is therefore debatable and will be shown and discussed later on the TLC analyses of the products results.

As shown in Figure 2, the RB activation by DOC on WBM activity was more pronounced than that of SDS effects. The RB stimulation by DOC was twice that of SDS as compared on the toluene/hexane extracted rubber products between the two surfactants. However, the butanol extractable intermediate products showed opposite results

to the rubber products. The polyprenyl intermediates was much higher with SDS activation than that with DOC. The lower polyprenyl or moderate chain length polyisoprene intermediates with DOC was actually converted and shown up as the final rubber products. On the other hand, the RB incubations with SDS showed almost equal products in the butanol and toluene/hexane extractions. This indicated that SDS activated more for the polyprenyl intermediates formation than the rubber formation as was seen with DOC. The higher level of polyisoprene intermediates suggested that it was accumulated or lower rubber conversion rate with SDS and hence resulted in the lower level of new rubber formation. The control without any surfactant showed that most of the ^{14}C -UPP was in the butanol phase, but the WBM was still moderately active with substantial rubber formation. This was in good agreement with preceding results (Figure 1) that showed UPP as highly suitable for the RB activity of WBM.

The overall calculated results are summarized in Table 1 and show the distributions of the ^{14}C -UPP labeled products. The butanol extraction with SDS yielded almost 7 folds higher products than that in the toluene/hexane extract. On the contrary, the rubber product with DOC in the toluene/hexane extract was twice higher than that with SDS.

The results clearly indicated that the DOC activation was twice faster converting or turning the intermediates into the final rubber products. However, the total combined ^{14}C -UPP converted into products, in both solvent extractions, was similar or almost the same for both SDS and DOC activations which was amounted to total 41–42% total incorporations. Comparison of butanol extraction of RB incubations with SDS and DOC and the toluene/hexane RB extracts of both surfactants showed somewhat discrepancy in the ratios, which was a bit puzzling. However, this can be explained by the fact that butanol extractions were also included the unreacted ^{14}C -UPP in addition to the intermediates products, and the discrepancy ratios can thus be resolved.

Examination of the results in Figure 2 and Table 1 pointed out that lower intermediates with DOC was the result of

rapid conversion into the final rubber product, while the higher intermediates with SDS was probably due to the slow turnover of these into the new rubber formation. Results summarized in Table 1 indicated that the total ^{14}C -UPP converted into products showed the same total ^{14}C -UPP utilization by the WBM either with SDS or DOC, but the difference was only the rate of intermediates converted into the final rubber products. It could thus be noted that the SDS effect was more active in polyprenyl intermediates formation, but less active for the rubber formation than the DOC effect, even though both stimulated the WBM activity. The differences could thus be said on quantitative rather than qualitative effects concerning the final rubber formation steps. As for DOC effect, it was more active and rapid converting intermediates into the final rubber product, so the much lower accumulation than seen with SDS. Since DOC was shown highly stimulating, the WBM activity in synthesis of the new rubber from UPP, it would be quite interesting to compare UPP with the shorter chain allylic isoprenes (FPP and GGPP) commonly used by others in the RB study with WRP.^[2,9,20–22,28,50]

The Effect of Different Allylic Isoprenyl Initiators on the Rubber Synthesis Efficiency by WBM Enzymes

The highly significant WBM activities with ^{14}C -UPP allylic initiator and the DOC activation in preceding results (Figure 1, 2) indicated the preference of WBM enzymes for UPP in the synthesis of new rubber molecules. The results so far revealed quite a strong selective degree of WBM for using UPP initiator in the RB process. In order to assess and differentiate the preferential degrees of WBM for other allylics, some apt investigations were set up to compare the different allylic isoprenes for RB activities. Experiments were carried out using the different labeled allylic isoprenes with excess IPP substrate to monitor the levels of new rubber synthesis from these labeled allylics. Amounts of the final rubber products separated were evaluated by differential solvent extractions as used in Figure 2. The results compiled from these experiments using the different radiospecificity labeled allylic isoprenes were normalized by calculation as percent incorporation into the new rubbers formed out of the total added in the RB assays. The results being presented were compiled from several experiments with different WBM preparations and times to account for the seasonal variations being commonly observed, but were still with consistent trends. These results were then normalized by performing all assays with the same WBM preparations at the same time for accuracy and with high degree of confidence. The explanations on results need be lengthy with several discussion aspects for a clearer understanding with minimum ambiguity.

Results in Figure 3 showed the different labeled allylic isoprenes (C_{15} -FPP, C_{20} -GGPP and C_{55} -UPP) used in the study of new rubber formation by WBM in RB incubations

Table 1. RB activity of WBM in the presence of anionic surfactants shown as percent of ^{14}C -UPP corporation into radiolabeled products extracted by 1-butanol and toluene/hexane solvent system (1:1, v/v).

samples	^{14}C -UPP incorporation ^{a)}		
	%		
	Butanol	Toluene/Hexane	Total
Control	41.22	6.54	47.76
SDS	21.26	19.88	41.14
DOC	3.23	39.21	42.44

^{a)} The data represent the average of three determinations.

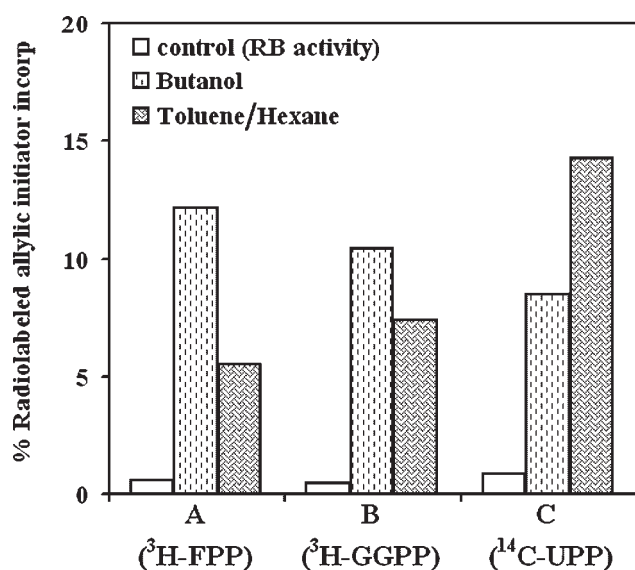


Figure 3. Enzyme activity of WBM shown in percent radiolabeled allylic initiators incorporation into polyisoprene intermediates in 1-butanol extract and rubber products in toluene/hexane (1:1, v/v) extract. The incubation mixture (200 μ l) contained WBM (approx. 20 mg dry weight) in 50×10^{-3} M Tris-HCl (pH 7.7), 30×10^{-3} M KF, 5×10^{-3} M MgCl₂, 10×10^{-3} M DTT, 40×10^{-3} M DOC, 60×10^{-6} M IPP and radiolabeled allylic initiators [12.5×10^{-6} M ³H-FPP (7 ci mol⁻¹), 12.5×10^{-6} M ³H-GGPP (7 ci mol⁻¹) and 100 900 cpm ¹⁴C-UPP as prepared]. 20×10^{-3} M EDTA was added in the incubations used as controls.

under the same optimum conditions with DOC. The products formation, from these radiotracer allylic isoprenes, was analyzed both in the butanol extracts and toluene/hexane extracts for the new rubbers. They showed quite distinct and different results profiles for both solvents extractions. Comparisons of the toluene/hexane extracts showed UPP with the maximum activity, but FPP was with the maximum activity for the butanol extracts. The results (Figure 3, C) showed that UPP was the most active for rubber synthesis with highest percent incorporation as compared to other allylic isoprenes.

The other two allylics (FPP and GGPP) were about only half (GGPP) or less (FPP) as compared to UPP on the rubber synthesis activity (Figure 3, B, A, C). On the contrary, the butanol extract results showed quite the opposite patterns on products formation from these allylic isoprenes. As pointed out earlier, the oligo- and polyisoprenyl intermediates were first separated out into the butanol phase prior to the final rubber products extracted by toluene/hexane solvent. The results showed FPP with highest intermediates formation, followed by GGPP and the lowest with UPP. These results might seem somewhat perplexing in term of the differences, but some explanations could possibly be postulated to delineate these observations and are actively sought in undergoing further investigations for the explanations to be reported soon.

It is noteworthy to point out that the results and observations shown in Figure 3 were somewhat similar or analogous to the results observed for SDS and DOC comparisons on WBM assays with UPP (Figure 2). However, the conditions in these assays were on comparisons of different chain length allylic isoprenes effects on efficiency of rubber synthesis by WBM enzymes versus the surfactants effect (Figure 2). The intermediate products were higher with FPP and GGPP than UPP similar to those seen with SDS. On the other hand, the UPP showed twice the total rubber synthesis, with concurrent decreasing of the lower MW polyisoprenyl products in butanol extract. This was similar to the DOC activation of WBM rubber synthesis with the allylic UPP. Conversion rate into the new rubbers formation from FPP and GGPP were much lower than that seen with UPP which showed at least two folds higher in the total final rubber formed.

The effect of allylic chain length on rubber synthesis efficiency of WBM was thus clearly shown by results (Figure 3) in this study. These results on precursor allylics thus suggested that the longer chain was more effective in rubber formation by WBM than the short ones, shown by UPP and GGPP with more rubber formed than FPP. Shorter allylics were more suitable or preferable by WBM to form lower MW products than the rubber end product seen with the UPP. Higher accumulation of the intermediates was thus shown, but was nevertheless still lower than the rubber products from UPP. The chain length observation was also previously studied (C₁₀–C₂₀) with WRP^[9] with only a small difference on RB effect and no clear explanation was given. It should be noted that in that study, chain lengths were almost similar, FPP and GGPP were implicated as the required RB allylic initiators with WRP^[2,9,20–22,28,50] but was never included or extended to the longer allylic like UPP. The very small difference on those allylics chain lengths thus could not provide clear cut results.^[9] It might probably also be due to the intermediates bound onto the WRP and hence the small degrees of RB efficiency^[9] might be considered insignificant and debatable. Ours was the first attempt including both the short allylics commonly believed as the required initiator^[2,9,20–22,28,50] and the longer chain UPP^[27] studies with WBM, which was different from those WRP studies^[3,9] that still need clarification and be verified.

It should be noted that in this study there are two major different aspects than the earlier studies^[2,3,9,18,28] one is the WBM as opposed to the WRP and the other is the use of longer allylic UPP along with the shorter ones. There was only one exception to these studies that used UPP and ¹⁴C-IPP in the RB study of the whole latex.^[21] They found probably new rubber could be formed in the whole latex assay, but did not find nor could show any RB activity with the WRP. These results were still unclear on the different outcomes, and no further study^[21] was attempted to clarify it. Our opinion is most likely the presence of BF membrane

in the whole latex, but the WRP was devoid of active BF membrane and hence no RB activity. This might agree well with our study with WBM that showed significant RB activity, be it the short or longer allylics with only the different RB efficiency. Therefore, the whole latex study^[21] can be reconciled well with our earlier reports^[25–27] and the new findings in this report.

There seems to be a direct or relative correlation between the allylic chain length and the RB efficiency. The longer allylic isoprenes chain sizes resulted in the more or the higher rate of new rubber formation by WBM activities as evidenced in Figure 3 results. Calculations of the combined total percent incorporations in both solvent extracts for all the three allylics revealed some interesting comparison. Even though GGPP was more RB active than FPP but less intermediates accumulation, the total percent incorporations when combined were the same at 17%. The combined total percent incorporation for UPP was at 23% with highest proportion as the rubber product. WBM utilization of the UPP was thus almost ½ fold higher than the other two allylics for the overall WBM activities. The differences of 6% in total incorporation and the 2 folds higher rubber formation pointed out the significant and important roles of UPP in the RB process. If all the 3 allylics were assumed to act as only the initiators, each rubber molecule would have or contain only one unit of each allylic. Therefore they should have similar or about equal percent incorporations in the rubber product when normalized by the calculated percentage of the total labeled allylics of different radio-specificity added to each RB incubation. The difference between FPP and GGPP was very small, within the errors limit, and thus could be reconciled with the assumption. Previous study with short allylics (GPP, FPP and GGPP)^[9] on WRP showed similar or almost equal percent incorporations, albeit insignificant difference, agreed well with our FPP and GGPP results. However, when they were compared to the UPP percent incorporation, a big difference was observed with 2 folds or almost 3 folds higher than GGPP or FPP. This was obviously not the case as assumed and there seems to be something special on the UPP properties, not only on its molecular nature, but might also be its specific recognition or preference by WBM enzymes. These perplexing and interesting results opened up possibilities that might help expanding the research on RB process that is still complex and little understood. They are now under extensive and refined investigation to elucidate the mechanism of RB process and the interactions between UPP and WBM enzymes system.

These results pointed out the selective or preferential degrees of WBM enzymes for the allylics chain length, with more activity for the longer ones. This might be attributed to the WBM enzymes active site affinity or differential recognition for the allylics. More detailed study of WBM enzymes was certainly needed. Recently, we have cloned one of the most active prenyltransferase enzymes in the *Hevea*

latex, GGPP synthase gene,^[31] and the key rubber transferase genes termed HTR-1 and HTR-2^[32] that was RB active with the WBM assays. As for the allylic chain length effect in this study, the WBM activity orders were UPP >> GGPP > FPP for the rubber synthesis. So far, very little is known on WBM enzymes details as we are the first group starting this study to clarify the mystery of how and where molecules of rubber are initiated and eventually aggregated to form the rubber particles (RP). This is in contrast to the common belief and reports^[2,9,20–22,28,50] that the rubber was being synthesized by the RP enzymes. Our common sense certainly would indicate or suggest otherwise that this belief is rather a poor rationale, an obvious paradox, or might be misleading as to how we can explain the origin of the RP as being present in the latex.

It was thus clear that bacterial allylic UPP was highly active and suitable for synthesis the new rubber by the WBM enzymes. This is quite agreeable with the thoughtful and insight opinion recently proposed^[33] on the microbes capable of producing rubber-like polymers. Therefore, more assays were conducted for better understanding to resolve the differences between WRP and WBM on the RB functions. More reliable, accurate, qualitative and quantitative analyses with suitable TLC assays will be presented.

Comparison of WRP and WBM Rubber Synthesis Functions Using Allylic UPP

It was previously shown that the RB activity of WBM could be strongly activated by SDS with ¹⁴C-UPP as allylic initiator together with IPP as elongating substrate for the synthesis of new rubber molecules.^[27] In this study, SDS was compared with another anionic surfactant DOC for the effect on WBM and found with higher RB activation than SDS as shown in Figure 2. DOC was therefore used in further studies on the rubber synthesis effects. As indicated in preceding results on the roles of WRP and WBM in RB functions, the experiments were carried out to compare the RB activities of WRP and WBM using allylic ¹⁴C-UPP for both and in the presence of DOC. The assays are of two purposes, comparing the RB functions of both with UPP and the DOC effects.

The results in Figure 4 showed the differences of RB functions between WRP and WBM with allylic ¹⁴C-UPP, both with and without DOC. It was found that the RB activity of WBM could be highly activated by DOC (Figure 4, B2), but WRP was also slightly activated (Figure 4, A2) even though quite very small comparing to the WBM. Even without DOC, the WBM still showed quite considerable RB activity with UPP and higher than the WRP with DOC (B1 vs. A2), a 2.5 folds difference of 6.5% and 2.7% ¹⁴C-UPP incorporations. But when the WBM without DOC was compared to the WRP without DOC (B1 vs. A1), it was even more considerable for the difference of up to 6.5 folds higher RB activity. The results thus clearly indicated that

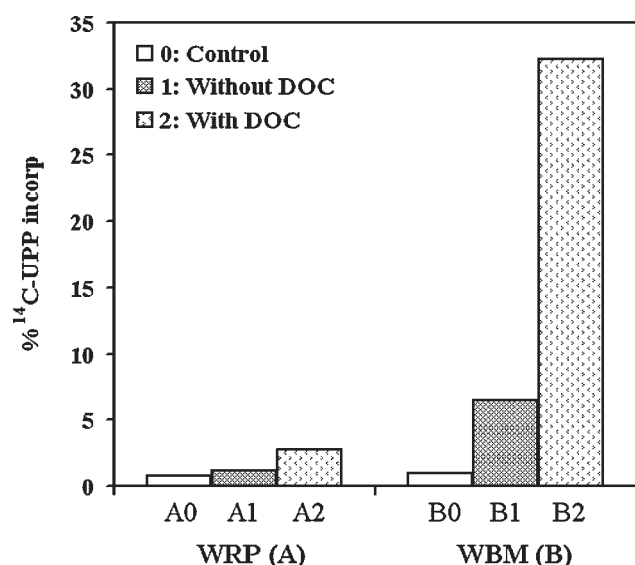


Figure 4. RB activity of WRP (A) and WBM (B) compare between incubation in the absence (1) and presence of DOC (2). The activity was shown in percent ^{14}C -UPP incorporation into rubber which was extracted by toluene/hexane (1:1, v/v). The incubation mixture (500 μL) contained WRP or WBM (approx. 30 mg dry weight) in 50×10^{-3} M Tris-HCl buffer (pH 7.7), 30×10^{-3} M KF, 5×10^{-3} M MgCl_2 , 10×10^{-3} M DTT, 60×10^{-6} M IPP and ^{14}C -UPP (354 000 cpm) with and without 40×10^{-3} M DOC. The control incubations (A0 and B0) were done with 20×10^{-3} M EDTA added.

UPP was highly favorable and preferentially suitable by WBM enzymes utilizing for the rubber synthesis. The DOC activation of WBM activity was very significant and highly substantial, an increase of 5 folds over the already high WBM activity without DOC. The levels of rubber product formation increased from 6% to 32% incorporations of ^{14}C -UPP (B1 vs. B2). With the presence of DOC for both specimens (B2 vs. A2), the WBM activity was almost 12 folds higher than WRP in the rubber synthesis levels. These results and observations strongly substantiate the assumption that allylic UPP derived from bacteria could be highly acceptable for the rubber synthesis by *Hevea* enzymes as was recently speculated and proposed.^[17]

Although the DOC activation of WRP was small comparing to the WBM activity, but the WRP activity as seen was still quite significant. Calculation of the WRP increased activity by DOC revealed a 2.5 folds over that without DOC, from 1.1 to almost 2.8% ^{14}C -UPP incorporations into the rubber formed by WRP activity. In a previous study,^[26] we could not find any RB activity with WRP, and the new rubber formed by WRP could hardly be detected at all. However, in this WRP study with ^{14}C -UPP the RB activity could be significantly detected, which was different from that study with ^{14}C -IPP alone.^[26] This was in contrast to the previous report that no WRP activity could be found for rubber synthesis with allylic UPP and ^{14}C -IPP substrate in RB incubation of WRP assays.^[21] Our results in this study

agree well as compared to the SDS effect on WRP with allylic ^{14}C -UPP as previously reported.^[27] On the contrary, WRP without DOC showed very little or without any significant RB activity, about equal to the control inhibited with 20×10^{-3} M EDTA for the control RB activity assays. The slight activation seen with WRP could possibly be attributed to the bound rupture BF membrane debris^[8] due to shearing force during the flow of latex upon tapping, which is inevitable no matter how fresh the latex from which the WRP is prepared. This tiny little contaminated BF membrane debris could or might thus be activated by DOC as seen in the results. Other plausible reason might arise from the fact that the WRP being used in this study was prepared from the small rubber particles (SRP) in zone 2 of centrifuged fresh latex, that was previously reported to be RB active.^[50] The WRP from SRP as used for assays in this study was with some RB activity but none for WRP prepared from the upper top rubber phase that was mainly the mature RP with only two major associated proteins. When the WRP derived from SRP was characterized, it showed slightly different extractable proteins profile than that seen with mature WRP as we have previously shown in the SDS-PAGE analyses.^[27] This could therefore be accounted for the observed activity with UPP and DOC effect.

Since both WBM and WRP could be detected for RB activities with UPP and were highly significant with DOC activation, it was therefore of interest to assay further for the nature of the products, even though it might seem quite obvious as the toluene/hexane extracted rubber products. Both qualitative and quantitative analyses by appropriate TLC separation assays with suitable solvent systems might yield some useful data and results that might further clarify the roles of UPP in the synthesis of new rubber products both by WBM and WRP activities.

Analyses of Rubber Products from UPP by WBM and WRP Activities

The products from RB incubations assays of both WBM and WRP with UPP would be of great interest to determine the similarity or difference between the two enzymes system for synthesis of the rubber from allylic UPP. Since no attempt for the products analysis was ever made before by investigators^[2,9,20–22,28,50] on rubber produced by WRP activity, this will be the first report made on WBM and WRP with allylic UPP.

Besides, the DOC effects on both incubations assayed with UPP were also compared.

Both qualitative and quantitative aspects are to be determined, they will be discussed separately and then assimilated interpretations made. Qualitative analysis will be done by effective reverse phase TLC that we performed on poly-prenols.^[49] The products as derived from TLC separation assays will then be subjected to quantitative analysis as routinely carried out in our RB studies.^[25–27]

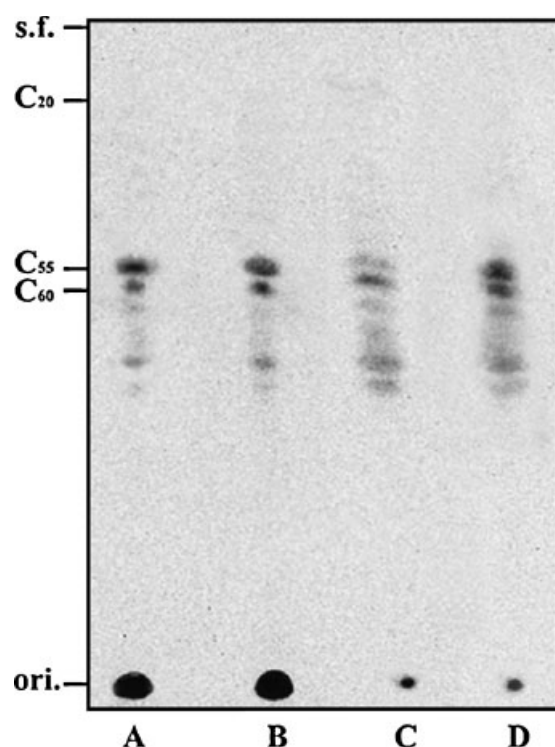


Figure 5. RP-TLC autoradiogram analysis of RB products by WBM and WRP. After product extraction and dephosphorelation as mentioned in Experimental part were performed, the products were separated on RP-TLC plate (LKC-18, Whatman) with a solvent system of acetone/hexane (19:1, v/v). The plate was exposed on image plate and analyzed by a Bio-image analyzer. Lane **A**: products from WBM incubation without DOC, lane **B**: products from WBM incubation with the presence of 40×10^{-3} M DOC, lane **C**: products from WRP incubation without DOC, and lane **D**: products from WRP incubation with the presence of 40×10^{-3} M DOC. On the left shows number of carbon according to authentic standards run along with the samples. **ori.**: origin, **s.f.**: solvent front.

Qualitative analysis of the WBM and WRP with allylic UPP incubation products were shown in Figure 5. The analyzed products were the toluene/hexane extract (Figure 4) on synthesis of the rubber study and the DOC effects. Rubber products from both WBM and WRP activities using UPP together with DOC effects were TLC analyzed for the products separation and identification. Four different samples were TLC assayed for WBM products (A, B) and also WRP products (C, D) without and with DOC. A few solvent systems were tested for separation suitability and the high resolution of the products identification. The solvent system of acetone/hexane (19:1, v/v) for product analyses of the new rubber synthesized from UPP was found to be the most suitable for our analyses as previously employed^[48] for polyisoprenes separation. However, the solvent system of acetone/water (19:1, v/v)^[51] as previously used for the assay of RB products was found unsatisfactory, with only one spot at the origin that might be

analyses defect. With acetone/hexane solvent, both rubber product at the origin and some other polyprenyl intermediates were well separated with high resolution.

The reverse phase TLC pattern of the WBM and WRP products showed the difference with distinct profiles. The differences were seen between WBM and WRP and for the DOC effects also. For the WBM products, most of the labeled products were confined or localized as rubber at the origin (A, B), as revealed by autoradiogram profiles. But for the WRP products, most of the labeled products were as polyprenyl intermediates with very little labeled rubber. The rubber did not move in this solvent system, but removed the intermediates from the origin as we previously demonstrated for the labeled rubber.^[25] The acetone/water solvent showed only rubber spots with no intermediates, hence it was unsuitable for our investigations, as reported.^[51] It was clear that our analyses were reliable and accurate for further quantitative analyses of the purified synthesized rubber with no contaminated products. The results showed clear distinction for WBM and WRP in the RB functions. Past studies always took for granted to implicate the WRP as only RB site,^[2,9,20–22,28,50] which need to be reexamined. The results as shown in Figure 5 clearly indicated that WBM could be assumed or implicated as actual RB site. As to why other products were found with toluene/hexane extract rubber need to be further discussed, which might provide a clearer picture of the RB process.

The anionic surfactant DOC effect also revealed the clear differences for WBM and WRP. As stated earlier, not only the WBM and WRP differences were observed, but differences on the added DOC conditions also be detected. The DOC effect profiles were quite interesting in contrast to the ones without DOC. WBM profiles (A, B) showed higher intermediates intensity without DOC (A), but lower with DOC (B) and hence the more rubber formed (B) as reported (Figure 5) which was in good agreement with TLC intensity patterns. But WRP (C, D) showed the opposite to WBM profiles. WRP without DOC (C) showed low radiotracer intensity for both rubber spot and the intermediates. The WRP with DOC (D), showed the same intensity of rubber spot, but with much higher intermediates intensity. Even though WRP with DOC showed twice (Figure 4) the rubber synthesis level, it could be attributed to the bound radiotracer as detected. Qualitative analysis of WRP and WBM from the TLC separated products would provide a clearer answer to this somewhat unexpected outcome.

The results thus obtained showed the distinct patterns on TLC separation profiles of the toluene/hexane extracted products for WBM and WRP activities, which still need explanation pending further investigation and elucidation. These profiles all have symmetrical rubber spots, different than the smear diffused spot as shown in previous report.^[51] It should be noted that all the samples analyzed were first extracted with water-saturated butanol to remove the unreacted substrates and short to medium chain intermediates.

The butanol extraction step was found effective and suitable to remove these compounds.^[47,48] This was then followed by toluene/hexane solvent dissolution of the rubber products for subsequent TLC analyses as detailed in Methods. As to why many bands other than the rubber products at origin were seen in this TLC separation profiles is still quite puzzling. A few speculations could be proposed to open up more investigations. Polarity index of butanol and partition efficiency for all intermediates from the complex extracting products might be possible. This problem was discussed^[49] in the extraction of polyprenols from the whole latex. One of the most likely cause or reasons could be attributed to the strong association of these intermediates onto the rubber molecules or rubber particles with high affinity, and thus some can neither be separated nor removed by butanol, since the intermediates are still undergoing active enzymatic propagation or elongation of polyprenol hydrocarbon chains with strong hydrophobic interactions and high affinity on the rubber chains. This is also plausible for the allylic UPP exerting quite high affinity toward the WBM hydrophobic enzymes and resulting in the high yield of rubber being formed. In addition, it might also be coupled with strong hydrocarbon rubber chains hydrophobic interactions. It will remain to be proved in more detailed study with well defined and refined experiments. However, quantitative assays of the TLC separated rubber products might be helpful.

Quantitative Analyses of Rubber Synthesis from Allylic UPP

From the TLC separation profiles and autoradiogram results (Figure 5), further extended assay might provide detailed understanding of the RB process. Not only differences of WBM and WRP, but the DOC effects can also be compared to delineate active role of membrane in the rubber synthesis. Quantitative analyses may provide a logical reason and possibly better rationale to explain the results thus obtained as indicated (Figure 5), be it for WBM and WRP or the assay conditions with DOC effects. Results on rubber quantitative

analyses were shown in Table 2 as extended assays of Figure 5 profiles.

The rubber products appeared as the discrete confined spots at origin. Highly purified rubber was separately tested and shown that it retained at origin in the solvent system used in this study. This is to ascertain that the analyzed products are purified rubbers. The origin spots were quantitatively scraped from TLC plate and subjected to further rubber purification as previously described.^[26,27] Quantitative assays (Table 2) of the labeled rubbers revealed a large difference for WBM and WRP. Besides, DOC effects differences on RB activation were also clearly indicated. Incorporation of ¹⁴C-UPP in the newly formed rubbers by WBM activity were substantial and highly significant. It is noted that even though WRP activity was quite low in this study, but the labeled rubber was still significant with allylic ¹⁴C-UPP compared to the ¹⁴C-IPP previously reported with no RB activity of WRP.^[26,27] Quantitative assay results revealed that WBM was very active in rubber synthesis function, but much less for WRP.

Results in Table 2 on quantitative assays of rubber products (Figure 5) was quite similar to the toluene/hexane extract results (Figure 4), but with a bit lower percent incorporation for all rubber products. This was due to higher purity upon removal of the contaminants by developing solvent system. Since the intermediates in TLC profiles were not well confined, so only the rubber products were reported in the Table 2 (A, B, C, D) assay. Calculated percent incorporation of WBM synthesized rubbers were 5.8% without DOC (A) and 30.4% with DOC (B), about 1.5–2% lower than the total extracted, but was closely comparable on the fold differences for both separated assays. WRP calculated extracted rubber results showed only 0.7% (C) and 1.9% (D) ¹⁴C-UPP incorporations for the higher DOC effect. It was lower than the total extracts but was still similar on the difference. The results clearly indicated that the actual RB functions belong to the WBM as previously shown.^[25–27] but not the WRP as commonly reported^[2,9,20–22,28,50] without well defined and accurate analyses. The small insignificant activity as shown for WRP

Table 2. Quantitative analysis of the rubber synthesized by WBM and WRP with ¹⁴C-UPP. The incubation condition was according to Figure 4. The total ¹⁴C-UPP used in each incubation assay was 354 000 cpm.

Samples		¹⁴ C-UPP incorporation ^{a)}			
		Toluene/hexane extract		Origin spot	
		cpm × 10 ³	% incorp	cpm × 10 ³	% incorp
WBM	A: without DOC	23.07	6.52	20.64	5.83
	B: with DOC	114.28	32.28	107.80	30.45
WRP	C: without DOC	4.06	1.15	2.48	0.70
	D: with DOC	9.89	2.79	6.80	1.92

^{a)} The data represent the average of three determinations.

was actually the tiny bound BF membrane debris as we suspected all along and recently set out to prove.^[27] It is very important to note that the TLC separated bands intensity has no positive correlations, whatsoever, to the quantitative results as reported in Table 2. The TLC autoradiogram as seen was very much overexposed to ascertain all non-rubber bands can be detected, no matter how low levels they are. At first glance, our Table 2 data might seem contradict to the TLC intensity, but it is actually and absolutely not. So the data presented are highly valid. They were obtained from the averages of three separated experiments with showed a high degree of reproducibility and good consistency.

From these results it could be deduced and an extrapolating solid statement can be made that the WBM was highly capable of rubber synthesis functions. In contrast, the WRP was not capable as compared to the highly active WBM with very high RB levels. WBM enzymes exhibited also a high degree of capability in utilizing diverse allylic isoprene initiators to synthesize new rubber molecules, be it the short chain (FPP, GGPP) or a medium to long chain isoprenes (UPP) as demonstrated in this report. It thus showed the high versatility of WBM enzymes in rubber synthesis from the diverse different allylic isoprene with distinct and characteristic effective degrees and efficiency.

The overall results (Figure 1–6) as shown clearly revealed that WBM enzymes system was highly capable of forming high MW polyisoprenes up to the rubber molecules. The highly active WBM enzymes system and the versatility in synthesis new rubber molecules from bacterial

isoprene UPP might point the way for engineering microbes to synthesize rubber or the rubber-like polymers as exquisitely discussed and recently opinionated by Steinbüchel.^[33] It is therefore quite tempting to postulate that it may have certain potential degree or at least to construct the interactive combination of the microbe metabolites and plant enzymes to realize the possibility. The findings in this report certainly warrant further investigation. Of particular interest is determination of the rubber MW as resulted from the bacterial isoprene UPP. This would certainly hold a promise for a better understanding of the RB mechanism and potential utilization of the *Hevea* enzymes system for the *in vitro* synthesis of specialty functionalized rubber with the desired properties of superior functions. This will of course be further pursued and subsequently reported on the molecular properties of such derived rubbers.

Conclusion

Bacterial undecaprenyl diphosphate (C₅₅-UPP), lipid carrier of glycosyl residues in the cell wall synthesis, was found very suitable and highly effective for rubber synthesis by the *Hevea* latex enzymes. The washed bottom fraction membrane-bound particles of centrifuged fresh latex was rubber biosynthesis (RB) active. Washed BF membrane (WBM) showed much higher RB activity, strongly stimulated by anionic surfactants, with DOC being more effective than SDS. WBM enzymes can synthesize rubber with allylic isoprenes or without (but lower RB). Washed rubber

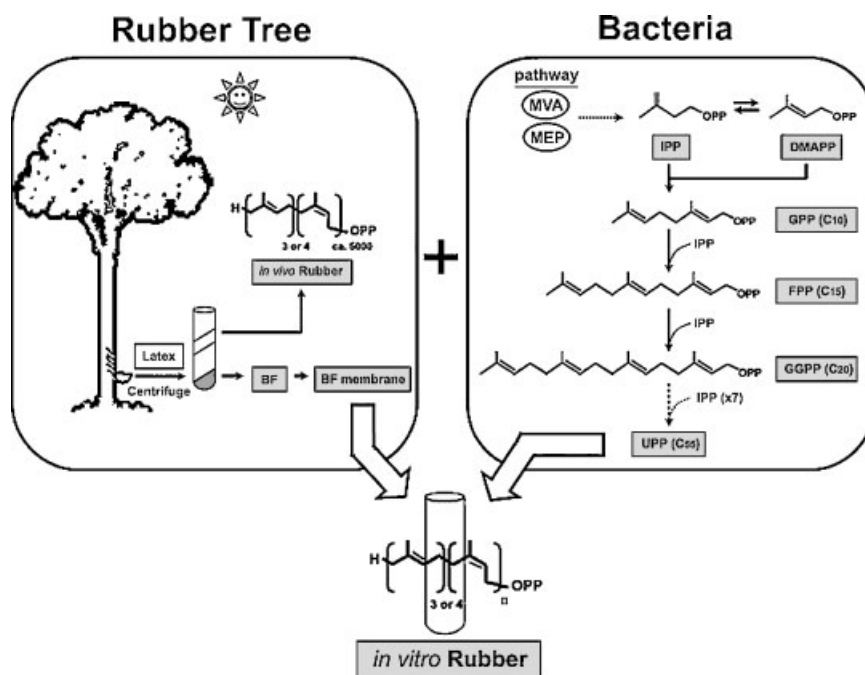


Figure 6. Schematic view proposing the interactive combinations of plant and bacteria in rubber biosynthesis.

particles (WRP) was very low on RB activity compared to the very much higher RB by WBM. Bacterial undecaprenyl diphosphate (C₅₅-UPP) was very effective as an allylic initiator for rubber synthesis by WBM. Comparisons of UPP with the shorter allylics (C₁₅-FPP, C₂₀-GGPP) showed UPP was the most effective. The RB activity orders of WBM were UPP >> GGPP > FPP. The DOC activated WBM synthesized more final rubber product (toluene/hexane extract), with less polyprenyl intermediates (butanol extractable) accumulated. This is different than FPP and GGPP, with more intermediates but less of the rubber product. Enzymes on WBM were highly versatile in using diverse different allylics, and UPP was most preferable. WRP was found little active with UPP + IPP, but inactive with IPP alone.

RP-TLC analyses of rubber product with acetone/hexane solvent system, quantitative and qualitative, were in good agreement with the WBM incubation RB assay results.

Results from this study strongly confirmed that WBM playing the key role in the RB functions, not WRP as mostly reported. WBM was thus serving as the actual rubber synthesis site, and the bacterial UPP was very good RB initiator for WBM enzymes system. A schematic view (Figure 6) can thus be drawn for proposing the interactive combinations of the apt microbial metabolite (UPP) and the plant enzymes capable of rubber synthesis *in vitro*, that might possibly be manipulating in formation of some specialty rubber. This idea would of course be verified and warrants study.

Acknowledgements: This work was fully supported by *Thailand Research Fund* (TRF). We are grateful to Prof. Dr. T. Koyama for his generous support providing us with the ¹⁴C-UPP in this research and the detailed information on the ¹⁴C-UPP purification. A. Rattanapittayaporn is supported by *Royal Golden Jubilee-Ph.D* program of TRF (Grant number: PHD 0086/2542). R. Wititsuwannakul is the TRF Senior Research Scholar with TRF research grant for this investigation.

- [1] F. Lynen, *J. Pure Appl. Chem.* **1967**, *14*, 137.
- [2] B. L. Archer, B. G. Audley, E. G. Cockbain, G. P. McSweeney, *Biochem. J.* **1963**, *89*, 565.
- [3] B. L. Archer, B. G. Audley, *Bot. J. Linnean Soc.* **1987**, *94*, 181.
- [4] R. G. O. Kekwick, in “*Physiology of Rubber Tree Latex*” J. d’Auzac, J. L. Jacob, H. Chrestin, Eds., CRC Press, Florida 1989, p. 145.
- [5] A. Kush, *Plant Physiol. Biochem.* **1994**, *32*, 761.
- [6] Y. Tanaka, A. H. Eng, N. Ohya, N. Nishiyama, J. Tangpakdee, S. Kawahara, R. Wititsuwannakul, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1501.
- [7] N. Ohya, T. Koyama, in “*Biopolymers: Vol. 2, Polyisoprenoids*”, T. Koyama, A. Steinbüchel, Eds., Wiley-VCH, Weinheim 2001, Chapter 4, p. 73.
- [8] D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, in “*Biopolymers, Vol. 2, Polyisoprenoids*”, T. Koyama, A. Steinbüchel, Eds., Wiley-VCH, Weinheim 2001, Chapter 6, p. 151.
- [9] B. G. Audley, B. L. Archer, in “*Natural Rubber Science and Technology*” A. D. Roberts, Ed., Oxford University Press, New York 1988, Chapter 2, p. 35.
- [10] R. A. Backhaus, *Israel J. Bot.* **1985**, *34*, 283.
- [11] L. N. S. Homans, J. W. Van Dalfsen, G. E. Van Gils, *Nature* **1948**, *161*, 177.
- [12] J. Dupont, F. Moreau, C. Lance, J. L. Jacob, *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1215.
- [13] S. Pujarniscle, *Physiol. Veg.* **1968**, *6*, 27.
- [14] P. B. Dickenson, *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* **1969**, *21*, 543.
- [15] J. B. Gomez, S. J. Hamzah, *Natl. Rubb. Res.* **1989**, *4*, 75.
- [16] R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, P. Suwanmanee, *Phytochemistry* **1990**, *25*, 1401.
- [17] R. Wititsuwannakul, *Experientia* **1986**, *42*, 44.
- [18] C. R. Benedict, in “*Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Volume 2*”, J. W. Porter, S. L. Spurgeon, Eds., John Wiley & Son, New York 1983, p. 355.
- [19] R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, S. Dumkong, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1755.
- [20] D. R. Light, M. S. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18589.
- [21] D. R. Light, R. A. Lazarus, M. S. Dennis, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18598.
- [22] M. S. Dennis, D. R. Light, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18608.
- [23] M. S. Dennis, W. J. Henzel, J. Bell, W. Kohr, D. R. Light, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18618.
- [24] G. F. J. Moir, *Nature* **1959**, *184*, 1626.
- [25] J. Tangpakdee, Y. Tanaka, K. Okura, T. Koyama, R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 269.
- [26] D. Wititsuwannakul, A. Rattanapittayaporn, R. Wititsuwannakul, *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *87*, 90.
- [27] D. Wititsuwannakul, A. Rattanapittayaporn, T. Koyama, R. Wititsuwannakul, *Macromol. Bioscience* **2004**, *4*, 314.
- [28] B. L. Archer, B. G. Audley, F. J. Bealing, *Plant. Rubb. Intl.* **1982**, *7*, 109.
- [29] T. Koyama, D. Wititsuwannakul, K. Asawatreratanakul, R. Wititsuwannakul, N. Ohya, Y. Tanaka, K. Okura, *Phytochemistry* **1996**, *43*, 769.
- [30] J. Tangpakdee, Y. Tanaka, K. Okura, T. Koyama, R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, K. Asawatreratanakul, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 261.
- [31] A. Takaya, Y. W. Zhang, K. Asawatreratanakul, D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, S. Takahashi, T. Koyama, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1625*, 214.
- [32] K. Asawatreratanakul, Y. W. Zhang, D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, S. Takahashi, A. Rattanapittayaporn, T. Koyama, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4671.
- [33] A. Steinbüchel, *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 261.
- [34] I. Takahashi, K. Ogura, *J. Biochem. (Tokyo)* **1982**, *92*, 1527.
- [35] J. D. Muth, C. M. Allen, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *230*, 49.
- [36] J. G. Christenson, S. K. Gross, P. W. Robbins, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 5436.
- [37] T. Baba, J. Muth, C. M. Allen, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 10467.
- [38] S. Fujisaki, T. Nishino, H. Katsuki, *J. Biochem.* **1986**, *99*, 1327.
- [39] C. M. Allen, M. V. Keenan, J. Sack, *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *175*, 236.

- [40] C. M. Allen, J. D. Muth, *Biochemistry* **1977**, *16*, 2908.
- [41] C. M. Allen, *Methods Enzymol.* **1985**, *110*, 281.
- [42] T. Baba, C. M. Allen, *Biochemistry* **1978**, *17*, 5598.
- [43] M. V. Keenan, C. M. Allen, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *161*, 375.
- [44] T. Kurokawa, K. Ogura, S. Seto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *45*, 251.
- [45] T. Baba, C. M. Allen, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, *200*, 474.
- [46] N. Shimizu, T. Koyama, K. Ogura, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19476.
- [47] T. Koyama, H. Fujii, K. Ogura, *Methods in Enzymol.* **1985**, *110*, 153.
- [48] S. Ohnuma, K. Hirooka, N. Tsuruoka, M. Yano, C. Ohto, H. Nakane, T. Nishino, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26705.
- [49] S. Tateyama, R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, H. Sagami, K. Ogura, *Phytochemistry* **1999**, *51*, 11.
- [50] S. K. Oh, H. Kang, D. H. Shin, J. Yang, K. S. Chow, H. Y. Yeang, B. Wagner, H. Breiteneder, K. H. Han, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17132.
- [51] S. K. Oh, K. H. Han, S. B. Ryu, H. Kang, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 18482.

**cDNA, from *Hevea brasiliensis* latex, encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate
reductoisomerase**

Krueawan Yoonram¹, Seiji Takahashi², Atiya Rattapittayaporn¹, Tanetoshi Koyama²,
Dhirayos Wititsuwannakul³, Rapepun Wititsuwannakul^{1,*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat -Yai,
Songkhla 90112, Thailand

² Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University,
Katahira 2-1-1, Aoba-ku, Sendai, Japan

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400,
Thailand

*Corresponding Author: rapepun.w@psu.ac.th; wrapepun@yahoo.com

Department of Biochemistry
Faculty of Science
Prince of Songkla University
Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand
Tel: 66-74-288-266
Fax: 66-74-446-656

Abstract

Natural rubber from *Hevea brasiliensis* is synthesized by enzymic polymerization of isopentenyl diphosphate (IDP) units. This has been proposed to occur inside the latex vessel in a thread-like tubular reticulum, connecting rubber particles to single- (luteoid) and double- (Frey-Wyssling, FW) membrane-bound organelles. We show that a membrane free preparation from FW particles converted [^{14}C] glucose into radio labeled prenyl products and this was only partially inhibited by mevinolin an inhibitor of the MVA cytosol associated pathway for IDP synthesis. This implicated the alternative plastid associated MEP pathway for IDP synthesis. We then identified a cDNA clone (*Hbdxr*) from a *Hevea* rubber latex cDNA library, encoding for 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR), a key enzyme of the MEP pathway for the IDP biosynthesis. Sequence analysis and the deduced amino acid sequence had >80% homology to other plant DXR enzymes with an ORF consisting of 1413 bp capable of encoding a 50.97 kDa polypeptide. A highly conserved binding site for NADPH was identified and an N-terminal transit peptide with a putative conserved cleavage site. The *Hbdxr-gfp* gene, transformed into *Arabidopsis* cells was located in the chloroplasts, thus *Hbdxr* may be expressed and localized in the FW plastids. The levels of *Hbdxr* mRNA detected in young latex containing tissues, inflorescence and seedling stems, were higher than those found in the latex from the tree and were barely detectable in the mature leaves. We therefore suggest that one function of the FW particles could be to supply IDP for rubber biosynthesis through the tubular thread-like reticulum.

Keywords

Hevea brasiliensis; Eupobiaceae; 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; Frey-Wyssling particles; Rubber latex; Rubber biosynthesis

1. Introduction

Hevea rubber latex is obtained as the white-colored fluid that exudes from the trunk of rubber (*Hevea brasiliensis*) trees after tapping. The tapping severs a number of latex vessel rings, allowing the latex to flow out. All the components present in the vessel ring, at their different stages of development, can be found in the tapped latex. The latex contains particles the majority of which are rubber, lutoids, and Frey-Wyssling [1-3]. The rubber particles consist mainly of a highly hydrophobic rubber core surrounded by a lipid monolayer containing a few embedded proteins [4]. The lutoids are vacuoles enclosed by a single membrane and because of their high acid hydrolase content [5] are considered to be phytolysosomes [6]. The Frey-Wyssling (FW) particles are surrounded by a double membrane and contain many membranes or tubular structures. They are specialized chromoplasts containing plastochromonol, plastoquinone and β -carotene with characteristic orange to yellow colors and assumed to be modified plastids [7-12]. The highly complicated structure of FW particles indicates that they have important functions in the metabolism of *Hevea* latex [8]. When viewed with a phase contrast microscope, these three major latex particles seen in fresh latex after being collected at a low temperature, seem to be attached to a network of threads or a thread-like reticulum,. The yellow FW particles were found in grape-like clusters enclosed within a bag-like membrane. The lutoids were strung along the reticulum thread, like beads, and the rubber particles were attached through their stalks [13]. The different particulate materials in fresh latex can be separated by centrifugation with the rubber particles in the top layer, the middle fraction composed of the aqueous C serum, and the sedimented bottom fraction of lutoid and FW particles. It has been suggested that the thread-like structures, commonly observed throughout the centrifuged fresh latex, represent the remnants of an extensive reticulum of hollow thread-like processes, within the latex vessel to which the various particles attach and through which they interact. It has been proposed that this thread-like reticulum could serve as the site for the biosynthesis of the natural rubber hydrocarbon [13]. In support of this possibility we have recently provided evidence for an active involvement of the latex

bottom fraction, containing the sedimented luteoid and FW particles, in rubber biosynthesis [14, 15]. The rubber is found in the top layer of rubber particles so it is possible that the tube-like reticulum acts as a conduit between these particles.

Natural rubber is synthesized and made almost entirely of *cis*-isoprene units derived from IDP. An allylic diphosphate is, however, required as the priming co-substrate to initiate the subsequent extensive prenyl chain elongation process for the formation of the rubber molecule [16-18]. Synthesis of the allylic prenyl diphosphates are catalyzed by *trans*-prenyl transferase enzymes, that were found in both the bottom fraction and the cytosol C-serum of centrifuged fresh *Hevea* latex [3, 19]. The allylic diphosphates of chain length C_5 - C_{20} have been shown to stimulate *in vitro* rubber formation, the efficiency of which increases with the increasing chain length of the allylic diphosphates, i.e. $C_5 < C_{10} < C_{15} < C_{20}$ [16]. A structural analysis study to characterize the initiating species of *Hevea* rubber has indicated that farnesyl diphosphate (FDP) is the preferred starting molecule for rubber biosynthesis [20]. Recently, the expression of *Hevea* FDP synthase in rubber latex was shown to be much higher than that of the geranylgeranyl diphosphate (GGDP) synthase [21]. The rubber transferase enzymes responsible for the *cis*-1, 4-polymerization of isoprene units onto the allylic primer have until now been thought to be bound to particles [22-24].

Since a laticiferous vessel is specialized in synthesizing the rubber polymer, it must have a means for a sufficient and efficient supply of IDP as this is the most important precursor required for the biosynthesis of rubber [25]. In higher plants, IDP is formed by two pathways that operate in different subcellular compartments [26-28]. The well-known mevalonate (MVA) pathway is present in the cytosol-endoplasmic reticulum while the 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway is localized in the plastid. The two pathways start from different central intermediates: the MVA pathway starts from acetyl-CoA whereas the MEP pathway starts from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate. Within the MEP pathway, the initial enzymatic step involves the condensation of glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate to form 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP),

catalysed by DXP synthase (DXS), the product of the *dxs* gene. The next reaction, the conversion of DXP to MEP, is catalyzed by 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR), encoded by the *dxr* gene. The DXP is an intermediate precursor of not only the IDP but is also a common precursor for thiamine pyrophosphate and pyridoxol phosphate [29, 30]. Thus, the reaction catalyzed by DXR is thought to represent the first committed step in the MEP pathway. Ko et al. [31] have previously reported the expression of a gene encoding DXS in the *Hevea* latex, thus the MEP pathway is initiated in the latex. The high level of latex *dxs* gene expression reported is compatible with a possible involvement of the MEP pathway in supplying the isoprene precursor for the synthesis of the major rubber (polyisoprene) product, in addition to other minor isoprenoids, in the *Hevea* latex.

To gain further insights into the MEP pathway in a non photosynthetic latex vessel, with the possibility of implicating it in rubber biosynthesis, we decided to attempt to clone the *dxr* gene from the latex of the rubber tree. Our previous detection of radio labeled prenyl products in the isolated FW particles after incubation with [^{14}C] glucose gave us some confidence that this might be possible. So far, the detailed biological function of these particles in latex, besides their possible involvement in carotenoid biosynthesis, has not been established [3]. In this report we describe the isolation and characterization of latex cDNA encoding the *dxr* gene.

2. Experimental

2.1 Materials

E. coli JM109 and pGEMT-easy vector (Promega) were used for the TA cloning. *E. coli* BL21 (DE3) and pET-32(a+) vector (Novagen) were used for expression of the recombinant protein. [$1\text{-}^{14}\text{C}$]Glucose was from Amersham. Precoated reverse phase TLC plates (RP-18) were from Whatman Chemical Separation. Restriction enzymes were from

Takara (Tokyo, Japan), TOYOBO (Osaka, Japan) and New England Biolabs, Inc. DXP was purchased from Echelon Research Labs (Salt Lake City, UT, USA)

2.2 Plant materials and RNA isolation

Fresh *Hevea* latex and other tissue samples were obtained from regularly tapped rubber trees at the Songkhla Rubber Research Institute, Songkhla, Thailand. *Hevea* seeds were collected during a fruit-bearing season, September–October, germinated in sterile sand and grown into 5-week-old seedlings. Total RNAs of latex, leaves, inflorescences and seedling stems were isolated by using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

2.3 Frey-Wyssling particle isolation

FW particle isolation was carried out as described by Phatthiya *et al.* [12]. Briefly, fresh latex was subjected to a series of centrifugations. First, a low speed centrifugation ($1700 \times g$ at 10°C for 30 min), using swing-out bucket rotors, was employed to minimize inter-particle collisions, especially between FW and luteoid particles, to allow all the particles to travel down the centrifuge tube through the viscous latex medium according to their density gradients. The upper half of the centrifuged latex, containing the less dense rubber particles, was removed whereas the lower half was further separated, by using a fixed angle rotor centrifuge ($7000 \times g$ at 4°C for 15 min), into three distinct layers: a minor uppermost rubber fraction with yellowish FW particles lying beneath, a middle aqueous fraction and a bottom fraction containing the most dense luteoid particles. After careful removal of the uppermost rubber layer, the floating yellowish-orange FW particles were collected from the top layer of the aqueous phase and collected as a pellet by ultracentrifugation ($59,000 \times g$ at 4°C for 20 min). The pellet was washed once by resuspending in 2 vol. of washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) and kept at -20°C until used.

2.4 Assay of radioactivity incorporation from [^{14}C] glucose into prenyl products

The washed FW particles were sonicated with 10 short 10 sec bursts interspersed by intervals of 10 sec for cooling. FW membranes were removed by centrifugation at $10,000 \times g$ at 4°C for 10 min). An aliquot (100 μl containing 280 μg of protein) of supernatant was added to a 500 μl reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 30 mM KF, 0.15 NADPH, 74 μM mevinolin (when required) and 1 mM [^{14}C]glucose (5 Ci/mol). After the reactions were incubated at 37°C for 6 h, radioactive prenyl diphosphate products were extracted with 1-butanol saturated with water and hydrolyzed to the corresponding alcohols with potato acid phosphatase according to the method reported previously [32]. The hydrolyzed products were extracted with pentane and analyzed by TLC on a reverse LKC-18 plate (Whatman) with acetone/water (19:1, v/v). The distribution of radioactive products on TLC plate was analyzed with a Fuji BAS-100 Mac Bioimage analyzer and spots of marker prenols were visualized with iodine vapor.

2.5 Cloning of *Hevea dxr* fragment

The cDNA fragment containing the region corresponding to the DXR was amplified from the *Hevea* latex cDNA library that had been constructed using the ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE). Degenerate primers were designed to amplify the *Hevea dxr* cDNA fragment according to the most highly conserved amino acid sequences of previously cloned genes encoding for plant *dxr*; sense primers, F1 (ALAAGSNV) 5'-GCNCTNGCNGCNGGNTCNAA YGT-3', F2 (VVTGIVGC) 5'-GTNGTNACNGGNATHGTNGGNTG-3', and F3 (VAAIEAGK) 5'-GTNGCTGCNATHGA AGCNGGNAA-3' and antisense primers, R1 (AQLGWPD M) 5'-CATATCNGGCCANCCNARYTGNGC-3', R2 (TWPRDL C) 5'-GCANAGRYC NAGNCKNGGCCANG-3', and R3 (MTGVLSAA) 5'-GCNGCRCTNAGA ACTCCNGTCAT-3', where R, Y, K, H and N represents A/G, C/T, G/T, A/C/T and A/C/G/T respectively. PCR was performed in a final volume of 50 μl containing 20 mM

Tris-HCl buffer (pH7.5), 25mM MgSO₄ 0.2 mM each dNTP mixture, 1 µM each primers, 0.1 µg template and 1 unit KOD-Plus DNA polymerase(Toyobo). The PCR program used was 35 cycles of 94°C for 15 s, 50°C for 30 s, 68°C for 1 min (Mastercycler Eppendorf). The amplified DNA fragments were purified from agarose gel by using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and subcloned into the TOPO TA cloning[®] Kit (Invitrogen) for sequencing. The resulting clones were verified by homology-based database searching using the BLASTN program. An internal 705 bp DNA fragment amplified by F1 and R1 primers which showed homology to plant *dxrs* was termed HDR705.

RLM-RACE-PCR was used for cloning the full-length cDNA of *Hevea dxr*. The procedures were according to the manufacturer's instructions (GeneRacer Kit, Invitrogen). Gene specific primers for performing both 5'- and 3'- RACE reactions were designed based on the sequence of HDR705. The primers used for 5'-RACE were 5'-TCCAGCTTCTATTGCAGCCACCG-3' (GSP1) and 5'-CTACACTGACAGCATCTGGATGG-3' (GSP2), respectively, and those used for 3'-RACE were 5'-TGGAGCTTTCAGGGATTGGCCTG-3' (GSP3) and 5'-CAGTGGACTCCGCTACCCTTTC-3' (GSP4), respectively. According to the sequence information obtained by the 5'- or 3'- RACE reaction, the cDNA was amplified by RT-PCR using the total latex RNA as the template and then sequenced. The final full length cDNA obtained was designated *Hbdxr*.

All cDNA fragments were sequenced with a Model 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems) using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit. Computer analysis and comparison of DNA sequences were carried out using GENETYX genetic information software (Genetyx Corp., Tokyo, Japan).

2.6 Analysis of *Hevea dxr* expression

For RT-PCR, the total RNA was extracted from inflorescences, seedling stems, leaves and latex. A quantity of 1 µg of total RNA was used as a template for synthesis of the first strand cDNA using Omniscript® Reverse Transcriptase (QIAGEN). PCR amplification was performed with first strand cDNA and *Hbdxr* specific primers, GSP4 and GSP5 (5'-TCATGCAAGAACAGGGCTTAGACCAG-3'). The reactions were carried out with 28 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 54 °C and 1 min at 68 °C with 2 min preheat at 94 °C. A 18s rRNA fragment was amplified for comparison. The amplified PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

2.7 Subcellular localization of *Hevea* DXR

The gateway entry clone harboring *Hbdxr* without a stop codon was applied for recombination with a Gateway destination vector. The pGWB5, kindly provided by Dr. Tsuyoshi Nakagawa (Shimane University, Japan), was used for construction of a binary vector to express HbDXR fused with sGFP at the C-terminal region in plant cells. The resulting plasmid was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90) by triparental mating. *Arabidopsis* T87 cultured cells [33] were transformed by co-cultivation with GV3101 (pMP90) carrying the resulting construct as reported [34]. A stationary phase culture of *A. tumefaciens* was washed and resuspended with the same amount of JPL medium [35]. Seven-day-old T87 cultured cells grown in JPL medium under continuous illumination at 22°C rotating at 120 rpm were filtered through a 0.5-mm nylon sieve. The filtered culture was diluted 5 times in fresh JPL medium and cultured to grow until 20-40 mg fresh weight/ml medium was obtained. Then 5 ml of the cultured cells were incubated with 50 µl of the *Agrobacterium* suspended in JPL medium in a 100 ml Erlenmeyer flask by gentle agitation (120 rpm) under continuous illumination at 22°C. After 48 h, the cells were collected, washed three times in the same amount of JPL medium supplemented with 200 mg/l claforan (Hoechst Marion Roussel, Tokyo, Japan). The cells were resuspended with 5 ml of JPL medium supplemented with 200 µg/ml claforan and cultured again for 3-4 days in a 100 ml Erlenmeyer flask. The co-cultivated cells were plated on cell growth

medium, containing 0.5 g/l MES (pH 5.7), 3.3 g/l Gamborg's B5 medium salt mixture (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), B5 vitamin (SIGMA, MI, USA), 3% (w/v) sucrose, 0.2 mg/l a-NAA, 200 mg/l claforan and 0.6% Bact-Agar, on which a nylon membrane was over-laid, and cultured under continuous illumination at 22°C for three days. The nylon membranes were transferred to new cell growth medium supplemented with 200 mg/l claforan and 10 µg/ml hygromycin and stored until green calli formation (for about two-weeks). Small cell aggregates of calli were transferred to JPL medium containing 200 mg/l claforan. The suspension was kept under continuous illumination at 22°C rotating at 120 rpm. After 7-10 days, an aliquot of cell suspension was transferred to fresh medium containing 200 mg/l claforan and 10 µg/ml hygromycin and maintained as an independent cell line.

For GFP imaging, T87 cells expressing GFP-fused HbDXR were observed with a BX50 microscope equipped with a FLUOVIEW confocal scanning system (OLYMPUS, Tokyo, Japan). The green (GFP) and red (chlorophyll autofluorescence) emissions were detected with filters BA510IF-BA550RIF and BA585IF, respectively. The images were then pseudo-colored and combined into one image.

3. Results

3.1 [¹⁴C] labeled prenyl products derived from [¹⁴C] glucose

A membrane-free extract, prepared from washed FW particles, was incubated with [¹⁴C] glucose in order to evaluate the presence of the MEP pathway in the putative FW plastids. An autoradiogram of the total acid phosphatase treated prenyl products, derived from [¹⁴C] IDP, revealed a major component, [¹⁴C] C₂₀-OH with [¹⁴C] C₁₅-OH and [¹⁴C] C₄₅-OH as minor products (Fig.1, lane 1). This result may indicate the presence of the MEP pathway

in the FW particles. For further confirmation, mevilonin (74 μ M) was added to the incubation mixture to inhibit HMG-CoA reductase, a rate-limiting enzyme of the MVA pathway that might be present due to contamination by residual latex cytosol and the thread-like reticulum in the original isolated FW particles. The concentration of mevilonin employed was about three times higher than that reported to completely inhibit the HMG-CoA reductase in *Parthenium argentatum* bark [36]. An autoradiogram of the prenyl alcohol products produced from [14 C] glucose gave a similar pattern to the original without the inhibitor but the intensity was reduced by approximately one-half (Fig. 1, lane 2). This result confirmed that the MEP pathway was present in the FW particle preparation. An allylic diphosphate, especially the C₁₅-diphosphate (FDP), had been identified as a species necessary for initiating rubber formation [21]. The presence of [14 C] C₁₅-OH in the autoradiogram indicated that the FW particles may be also involved in providing the initiating primer for the rubber biosynthesis. This warranted an attempt to detect and isolate the gene encoding for *Hevea* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (HbDXR), a rate limiting enzyme in the MEP pathway. This assists in establishing a biological function for the FW particles in *Hevea* latex synthesis.

3.2 Cloning of a full-length cDNA encoding *Hevea* DXR

For the cloning of *Hevea dxr*, a BLAST database search was conducted using DXR as the query. From the four previously isolated plant cDNA's encoding for *dxr* from, *Arabidopsis thaliana* [37], *Lycopersicon esculentum* [38], *Oryza sativa* [37] and *Stevia rebaudiana* [39], three sets of degenerated primers were designed to align with highly conserved regions. When PCR was conducted using a latex cDNA library as a template with the primer pair of F1 and R1, an amplified product of 705 bp was obtained and sequenced. The sequence was subsequently verified by using the BLAST program in a search of the NCBI database. This showed that it had a high sequence homology to the other plant DXRs. Based on the sequence of this DNA fragment, two sets of gene specific primers were designed to generate 5'- and 3'- ends using RNA ligase-mediated rapid amplification cDNA 5' and 3'

cDNA ends (RLM-RACE) PCR. The GSP1 and GSP2, in combination with a 5'-oligo primer and 5'-nested oligo primer, were used to amplify the 5'-end of cDNA. A 511 bp product was obtained by nested PCR. For the 3'- RACE, the first PCR was performed with GSP3 and oligodT primer. After 3'-nested PCR with GSP4 and the 3'- nested primer, a 572 bp fragment was obtained. Three contiguous regions were assembled, and the resulting full-length cDNA contained an open reading frame (ORF) of 1,413 bp capable of encoding a protein of 471 amino acids. We termed this clone *Hbdxr*. The GenBank accession number of this cDNA had been assigned as **DQ437520**. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence was compared with the NCBI databases. It had a very high homology throughout the entire ORF with the plant *dxrs*: *L. esculentum* (86%), *A. thaliana* (82%), *S. rebaudiana* (82%), and *O. sativa* (80%) (Fig. 2). The highly conserved GSTGSIG motif, proposed to constitute the NADPH binding site of a ketol acid reductoisomerase [40], was present near the N-terminal of HbDXR (positions 81-87).

To characterize the sequence of the N-terminal region, two prokaryotic DXRs; *E.coli* [40] and *Synechococcus leopoliensis* [41] DXRs were aligned with the plant DXRs. The plant enzyme contains an extension of about 80 residues that is not present in the prokaryotic sequence. The extended region at the N-terminal of the plant DXRs indicated that it was likely to be a transit peptide for a plastid protein and contained a conserved cleavage site [37]. A putative conserved processing site, Cys-Ser-Ala motif, was present at positions 49-51 of the HbDXR sequence. The extended region at the C-terminal side of the putative cleavage site contains a consensus motif PPPPAWPGRA (positions 53-62 of HbDXR), defined as the Pro-rich region at the N-terminus of the mature plant DXR [40].

Phylogenetic analysis, based on the alignment of plant *dxrs*, revealed a relationship between the phylogeny of *dxr* sequences and phylogenetic distances (Fig. 3). There appear to be three major lineages of these genes; gymnosperms, monocots, and eudicots. The eudicot genes formed two major clades, rosids and asterids. The *Hevea* gene was most closely

related to the one from *Croton stellatopilosus* (GenBank accession no **EF451544**) which is in the same Euphorbiaceae family as the rubber tree.

3.3 Expression analysis of *Hevea* mRNAs

To examine the *Hbdxr* mRNA expression in various *Hevea* tissues, RT-PCRs using total RNA extracted from inflorescences, seedling stems, leaves and latex were performed. As shown in Fig. 4, the levels of PCR products in the inflorescences and young stems were higher than that of the latex tapped from the tree. The PCR product was, however, barely detected in the mature leaves.

3.4 Subcellular localization of *Hevea* DXR

HbDXR was predicted by the ChloroP algorithm (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) to have a putative plastid transit peptide in the 80 amino acid region at the N-terminus thus indicating the function of HbDXR in the plastid. As expected, a fluorescence of HbDXR fused with GFP at the C-terminal region was detected in chloroplasts of *Arabidopsis* cultured cells, and this was confirmed by an overlapping of the autofluorescence of chloroplasts (Fig. 5).

4. Discussion

The presence of [^{14}C] C₄₅-prenyl DP products, derived from [^{14}C] glucose, on the autoradiogram from the membrane free preparation derived from sedimented FW particles indicated a successful preparation able to initiate synthesis of prenyl DP products.

Previously, C₄₅ prenyl side chains of plastoquinone-9 had been detected in the FW particles isolated from fresh *Hevea* latex [12] and C₁₅-, C₂₀- and C₄₅-prenyl DP products had been detected among the prenyl DP extraction products from a freeze-dried bottom fraction, containing both lutoid and FW particles, after incubation with [^{14}C] IDP [19]. The allylic

diphosphate, especially FDP, had been identified as an initiating species for rubber formation [20]. Hence, it is interesting to see whether the FW particles make a major contribution for providing both the initiating primer and the IDP, from the MEP pathway, for *in vivo* rubber formation in the proposed *Hevea* latex thread-like reticulum [13]. Moreover, the involvement of an endoplasmic reticulum had previously been reported in the ontogeny of rubber formation in guayule, *Parthenium argentatum* [42].

A *Hevea* rubber latex gene (*Hbdxr*) encoding for the rate limiting enzyme in the MEP pathway was successfully cloned from rubber latex cDNA. This gene contains a putative ORF encoding a protein consisting of 471 amino acid residues with a predicted molecular mass of 50.97 kDa. Accordingly, the study on the localization of HbDXR in the chloroplast of *Arabidopsis* cells indicated that HbDXR has a distinct transit peptide function in translocation of the HbDXR to a plastid. Latex FW particles have been assumed to be modified plastids due to the presence of plastoquinone, plastochromanol and isoprenoids [11, 12]. Hence, the *Hbdxr* may be expressed and localized in the latex FW plastid-like particles. Accordingly, the levels of *Hbdxr* mRNA transcripts in young latex containing tissues, inflorescences and seedling stems, were shown to be higher than that of the latex tapped from mature latex vessels localized in the bark of the rubber tree. This result is opposite to the barely detectable transcript found in the leaves rich in light gathering plastids. Thus, this *Hbdxr* homolog may be specific to the putative FW plastids specialized in the biosynthesis of rubber. It remains to be seen whether the IDP and FDP required for the biosynthesis of rubber polymer, in the proposed thread-like reticulum, is also mainly contributed by the FW particles.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Thailand Research Fund; TRF Royal Golden Jubilee-Ph.D. Program; Association of International Education, Japan; National Research

Council of Thailand (JSPS-NRCT) and Prince of Songkla University. We thank Dr Brian Hodgson for assistance with the English.

References

1. S. Hamzah, J. B. Gomez, Electron microscopy of ultracentrifugation fractions of *Hevea* latex. I. Top fractions, J. Rubb. Res. Inst. Malaysia. 30 (1982) 161-173.
2. S. Hamzah, J. B. Gomez, Electron microscopy of ultracentrifugation fractions of *Hevea* latex. II. Bottom fractions, J. Rubb. Res. Inst. Malaysia, 31 (1983) 117-128.
3. D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, Biochemistry of natural rubber and structure of latex. In: Steinbuchel, A. (Ed.), Biopolymers, vol. 2, WILEY-VCH, Germany, 2001, pp. 151-202.
4. K. Cornish, D. F. Wood, J. J. Windle, Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane, Planta 210 (1999) 85-96.
5. J. Dupont, F. Moreau, C. Lance, J. L. Jacob, Phospholipid composition of the membrane of lutoids from *Hevea brasiliensis* latex, Phytochemistry 15 (1976) 1215-1217.
6. S. Pujarnisclé, Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*. Müll Arg, Physiol. Veg. 6 (1968) 27-46.
7. P. B. Dickenson, The ultrastructure of the vessel of *Hevea brasiliensis*. In: Mullins, L. (Ed), Proc. Natl. Rubber Prod. Res. Assoc., Jubilee Conf. Mc Laren and Sons, London, 1965, pp. 52-56.
8. P. B. Dickenson, Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*, J. Rubb. Res. Inst. Malaya. 21 (1969) 543-559.
9. G. F. J. Moir, Latex metabolism, J. Rubb. Res. Inst. Malaya 21 (1969) 401-416.
10. B. L. Archer, B. G. Audley, G. P. Mc Sweeney, T. C. Hong, Studies on the composition of latex serum and bottom fraction, J. Rubb. Res. Inst. Malaya 21 (1969) 560-569.

11. N. Ohya, T. Koyama, Biosynthesis of natural rubber and other natural polyisoprenoids. In: Steinbuechel, A. (Ed.), Biopolymers, vol. 2, Wiley-VCH, Germany, 2001, pp. 73-109.
12. Phatthiya, S. Takahashi, N. Chareonthiphakorn, T. Koyama, D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, Cloning and expression of the gene encoding solanesyl diphosphate synthase from *Hevea brasiliensis*, Plant Sci. 172 (2007) 824- 831.
13. W. A. Southorn, Microscope studies on fresh *Hevea* latex, Rubber Development 14 (1961) 2-6.
14. J. Tangpakdee, Y. Tanaka, K. Ogura, T. Koyama, R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea* latex, Phytochemistry 45 (1997) 269-274.
15. D. Wititsuwannakul, A. Rattapittayaporn, R. Wititsuwannakul, Rubber biosynthesis by a *Hevea latex* bottom-fraction membrane, J. Appl. Polym. Sci. 87 (2003) 90-96.
16. B. L. Archer, B. G. Audley, New aspects of rubber biosynthesis, Bot. J Linnean Soc. 94 (1987) 181-196.
17. S. Madhavan, G. A. Greenblatt, M. A. Foster, C. R. Benedict, Stimulation of isopentenyl pyrophosphate incorporation into polyisoprene in extracts from guayule plants (*Parthenium argentatum*) by low temperature and 2-(3,4-dichlorophenoxy) triethanoamine, Plant Physiol. 89 (1989) 506-511.
18. K. Cornish, R. A. Backhaus, Rubber transferase activity in rubber particles of guayule, Phytochemistry 29 (1990) 3809- 3813.
19. J. Tangpakdee, Y. Tanaka, K. Ogura, T. Koyama, R. Wititsuwannakul, D. Wititsuwannakul, K. Aswatreeeratanakul, Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyl transferase activities on bottom fraction and C-serum from *Hevea* latex, Phytochemistry 45 (1997) 261-267.
20. Y. Tanaka, A. H. Eng, N. Ohya, N. Nishiyama, J. Tangpakdee, S. Kawahara, R. Wititsuwannakul, Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*:

- characterization of initiating species by structural analysis, *Phytochemistry* 41 (1996) 1501-1505.
21. Takaya, Y. Zhang, K. Asawatreratanakul, D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, S. Takahashi, T. Koyama, Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl diphosphate synthase of *Hevea brasiliensis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1625 (2003) 214-220.
 22. D. R. Light, M. S. Dennis, Purification of a prenyltransferase that elongates *cis*-polyisoprene rubber from the latex of *Hevea brasiliensis*, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 18589-18597.
 23. K. Cornish, The separate roles of plant *cis* and *trans* prenyl transferase in *cis*- 1, 4-polyisoprene biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* 218 (1993) 267-271.
 24. K. Asawatreratanakul, Y-W. Zhang, D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, S. Takahashi, A. Rattanapittayaporn, T. Koyama, Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding *cis*-prenyltransferase from *Hevea brasiliensis*: A key factor participating in natural rubber biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 4671-4680.
 25. K. Cornish, Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species, *Phytochemistry* 57 (2001) 1123-1134.
 26. W. Eisenreich, M. Schwarz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M. Zenk, A. Bacher, The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorgasims, *Chem Biol.* 5 (1998) 221-223.
 27. M. Rohmer, The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants, *Nat. Prod. Rep.* 16 (1999) 565-574.
 28. H. K. Lichtenthaler, Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors, *Biochem. Soc. Trans.* 28 (2000) 785-789.
 29. J. H. Julliard, R. Douce, Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts, *Proc Natl Acad Sci USA.* 88 (1991) 2042-2045.

30. R. E. Hill, K. Himmeldirk, I. A. Kennedy, R. M. Pauloski, B. G. Sayer, E. I. Wolf, D. Spenser, The Biogenetic Anatomy of Vitamin B₆: A ¹³C NMR Investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem. 271 (1996) 30426-30435.
31. J. Ko, K. Chow, K. Han, Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree), Plant Mol. Biol. 53 (2003) 479-492.
32. H. Fujii, T. Koyama, K. Ogura, Efficient enzymatic hydrolysis of polyprenyl pyrophosphates, Biochim. Biophys. Acta. 712 (1982) 716-718.
33. M. Axelos, C. Curie, C. Bardet, B. Lescure, A protocol for transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures, Plant Physiol. Biochem. 30 (1992) 123-128.
34. M. Suzuki, T. Xiang, K. Ohyama, H. Seki, K. Saito, T. Muranaka, H. Hayashi, Y. Katsube, T. Kushiro, M. Shibuya, Y. Ebizuka, Lanosterol Synthase in Dicotyledonous Plants, Plant Cell Physiol. 47 (2006) 565 - 571.
35. J. P. Jouanneau, C. Péaud-Lenoël, Growth and synthesis of proteins in cell suspensions of kinetin dependent tobacco, Physiol Plant. 20 (1967) 834-850.
36. W. Ji, C. R. Benedict, M. A. Foster, Seasonal variations in rubber biosynthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, and rubber transferase activities in *Parthenium argentatum* in the Chihuahuan desert, Plant Physiol. 103 (1993) 535-542.
37. L. Carretero-Paulet, I. Ahumada, N. Cunillera, M. Rodríguez-Concepción, A. Ferrer, A. Boronat, N. Campos, Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis DXR* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, Plant Physiol. 129 (2002) 1581-1591.
38. M. Rodríguez, I. Ahumada, E. Diez-Juez, S. Sauret-Güeto, L. María Lois, F. Gallego, L. Carretero-Paulet, N. Campos, A. Boronat, 1-Deoxy-D-xylulose 5-

- phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening, *The Plant Journal* 27 (2001) 213-222.
39. N. M. L. C. Totte, W. Van den Ende, E. J. M. Van Damme, F. Compernelle, I. Baboeuf, J. M. C. Geuns, Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellin and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana*, *Plant Physiol.* 81 (2003) 517-522.
 40. T. Kuzuyama, S. Takahashi, M. Takagi, H. Seto, Characterization of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 19928-19932.
 41. B. Miller, T. Heuser, W. Zimmer, Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis, *FEBS Lett.* 481 (2000) 221-226.
 42. R. A. Backhaus, S. Walsh, Ontogeny of rubber formation in guayule, *Parthenium argentatum* Gray, *Bot. Gaz* 144 (1983) 391-400.

Figure legends

Fig. 1. TLC autoradiogram of the prenol alcohols obtained by enzymatic hydrolysis of products formed by the reaction mixture containing [14 C] glucose and FW particles. The products obtained from reaction in the absence (lane 1) and presence of mevinolin (lane 2) was analyzed by TLC on a reversed-phase LKC-18 plate with a solvent system of acetone/water (19:1, v/v). S.F.: solvent front; Ori: origin.

Fig. 2. Multiple sequence alignment of the deduced amino acids of HbDXR and DXRs from four other plants and two from bacteria. The residues boxed in black indicate the positional identity for at least four of six compared sequences. Dashes indicate gaps introduced in order to optimize the alignment. Asterisks indicate the NADPH-binding motif. The putative cleavage site is indicated with an arrowhead. The cDNA accession

numbers are *A. thaliana*; **AF148852**, *L. esculentum*; **AF331705** 1, *O. sativa*; **AF367205**, *S. rebaudiana*; **AJ429233**, *H. brasiliensis*; **DQ437520**, *S. leopoliensis*; **AJ250721** and *E. coli*; **AB013300**.

Fig. 3. A phylogenetic tree generated by MEGA3 program based on the degree of similarity between plants *dxrs*. Sequence analysis was performed using CLUSTAL W. The branches were validated by bootstrap analysis from 500 replications, which are represented by percentages in the branch nodes. The cDNA accession number are Salvia (*S. miltiorrhiza*); **DQ991431**, Mentha (*M. x piperita*); **AF116825**, Plectranthus (*P. barbatus*); **AY515699**, Antirrhinum (*A. majus*); **AY770406**, Picrorhiza (*P. kurroa*); **DQ347963**, Catharanthus (*C. roseus*); **AF250235**, Nicotiana (*N. tabacum*); **DQ839130**, Lycopersicon (*L. esculentum*); **AF331705**, Stevia (*S. rebaudiana*); **AY834755**, Artemisia (*A. annua*); **AF182287**, Chrysanthemum (*C. x morifolium*); **AB205048**, Arabidopsis (*A. thaliana*); **AF148852**, Pueraria (*P. Montana var lobata*); **AY315651**, Cistus (*C. creticus*); **AY297794**, Populus (*P. tremula x P. alba*); **AJ574852**, Croton (*C. Stellatopilosus*); **EF451544**, Hordeum (*H. vulgare*); **AJ583446**, Oryza (*O. sativa*); **AF367205**, Ginkgo (*G. biloba*); **AY494186** and Taxus (*T. cuspidata*); **AY575140**.

Fig. 4. Analysis of mRNA expression patterns by RT-PCR. (A) mRNA expression of *Hbdxr* (28 cycles); (B) 18S rRNA expression as an internal control.

Fig. 5. Subcellular localization of *Hevea* DXR in Arabidopsis T87 cells. Cells expressing HbDXR, fused with GFP at the C-terminus and GFP, were observed by laser confocal microscopy. The panels indicated as BA510IF, BA585IF, and Merge show fluorescence images of GFP, the autofluorescence of chlorophylls, and the merged image of green and red fluorescence, respectively.

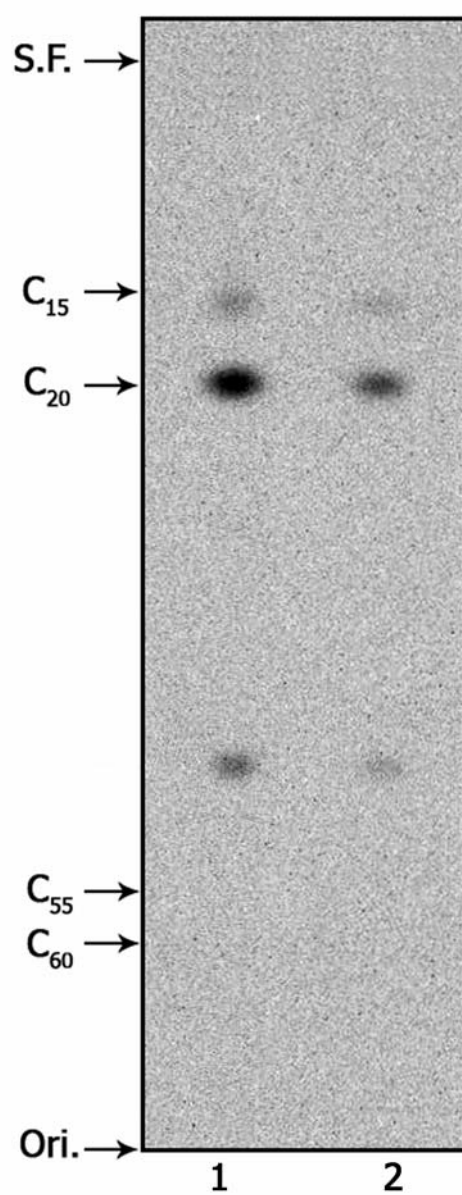


Fig. 1

A. thaliana 1:MTTNSIS-PAESHAISLDTSRF---NPIPLSGGSLRRPNQGRGFGKGVKCSVKV---QQQQQPPFANPGR-VPEAPRQS--NDG 79
 L. esculentum 1:--MNNLLS-PAEIKSISLNSKSSYNLSHLFTTGGLSRRKECSGAFKRVQCSA-----QLPPFPANPGRVAEPGRQS--NDG 77
 O. sativa 1:--MNVVSPFGDLAAYSLLDNRRG-ATNQLVVDLPQTRDRRAVSL--RRTCSM-----QQAPFPANPGRVAEPGRRS--NDG 75
 S. rebaudiana 1:--MSVYLS-PTQTLNLTSDCKSKQ--THLLKLQGGCFKRRKDVKLKAG-KGIRCSA-----QFPFPANPGRVLDVDPGRKN--NDG 74
 H. brasiliensis 1:--MNNLLS-PAEIKSISLDTSKS---SHLTLLPQGGSLKRRKDFGAAGKGVKQCSA-----QFPFPANPGRVDFDLGRKT--NDG 73
 S. leopoliensis 1:-----1
 E. coli 1:-----1

 A. thaliana 80:PKPISIVGSTGSGISGTQTLDIVAENPDKFFVVALAAGSNVTLLACVVRKHEALVAVPNEISLINEKSAIADLDYKLESTIPGEGGVPEW 167
 L. esculentum 78:PKPISIVGSTGSGISGTQTLDIVAENPDKFFVVALAAGSNVTLLACVVKTRPKNLVAVPNEISLVEELNKAALADCDMKPEIIPGEGGVPEW 165
 O. sativa 76:PKPISIVGSTGSGISGTQTLDIVAENPDKFFVVALAAGSNVTLLACVVKTRPKNLVAVPNEISLVEELNKAALADCDMKPEIIPGEGGVPEW 163
 S. rebaudiana 75:PKPISIVGSTGSGISGTQTLDIVAENPDKFFVVALAAGSNVTLLACVVKTRPKNLVAVPNEISLVEELNKAALADCDMKPEIIPGEGGVPEW 162
 H. brasiliensis 74:PKPISIVGSTGSGISGTQTLDIVAENPDKFFVVALAAGSNVTLLACVVKTRPKNLVAVPNEISLVEELNKAALADCDMKPEIIPGEGGVPEW 161
 S. leopoliensis 1:KNAVTLGSGTSGISGTQTLDEQYPPDFRIVGSAAGSNVALLSGRRHRSTVAIQDAQLSELCADHADLDNPFLEHTDEGAVPEW 88
 E. coli 1:MQLTLSGSGTSGISGCSLDDVVRNDEHFVVALVAGNVVFNVEGLESRIYAVMDDASAKLDTIMEQQGSRTEVLSGCAACDM 88
 A. thaliana 168:ARHPDAVTVVTGIVGCAGLKFTVAATEAGKDIALANKETLIAGGF-VULPLAKHNVKILFADSEHSAIFQCIQGLE---GA----- 246
 L. esculentum 166:ARHPDAVTVVTGIVGCAGLKFTVAATEAGKDIALANKETLIAGGF-VULPLAKHNVKILFADSEHSAIFQCIQGLE---GA----- 244
 O. sativa 164:ARHPDAVTVVTGIVGCAGLKFTVAATEAGKDIALANKETLIAGGF-VULPLAKHNVKILFADSEHSAIFQCIQGLE---GA----- 242
 S. rebaudiana 163:ARHPDAVTVVTGIVGCAGLKFTVAATEAGKDIALANKETLIAGGF-VULPLAKHNVKILFADSEHSAIFQCIQGLE---GA----- 241
 H. brasiliensis 162:ARHPDAVTVVTGIVGCAGLKFTVAATEAGKDIALANKETLIAGGF-VULPLAKHNVKILFADSEHSAIFQCIQGLE---GA----- 240
 S. leopoliensis 89:ARYGDAETVVTGIVGCAGLDEPTAAATEAGKDIALANKETLIAGGF-VULPLAKHNVKILFADSEHSAIFQCIQGLSHADFRPAQVV 175
 E. coli 89:JALPVDGMAALVGAAGLDEPTAAAPAGKTHLLANKESLVTCERLMDAVKQSKAQLLFV-DSEHSAIFQSLFPQIQHNLVADLEQ 175
 A. thaliana 247:--LRRRIILASGGAFRCDFVVKLKGKVVADALKHFNWNGMKKIIVDSATLNNKGLEVIEAHYLFGAGYDIEIVHFQSIHSMVETC 332
 L. esculentum 245:--LRRRIILASGGAFRCDFVVKLKGKVVADALKHFNWNGMKKIIVDSATLNNKGLEVIEAHYLFGAGYDIEIVHFQSIHSMVETC 330
 O. sativa 243:--LRRRIILASGGAFRCDFVVKLKGKVVADALKHFNWNGMKKIIVDSATLNNKGLEVIEAHYLFGAGYDIEIVHFQSIHSMVETC 328
 S. rebaudiana 242:--LRRRIILASGGAFRCDFVVKLKGKVVADALKHFNWNGMKKIIVDSATLNNKGLEVIEAHYLFGAGYDIEIVHFQSIHSMVETC 327
 H. brasiliensis 241:--LRRRIILASGGAFRCDFVVKLKGKVVADALKHFNWNGMKKIIVDSATLNNKGLEVIEAHYLFGAGYDIEIVHFQSIHSMVETC 326
 S. leopoliensis 176:AGLRRILASGGAFRCDFVVKLKGKVVADALKHFNWNGMKKIIVDSATLNNKGLEVIEAHYLFGLDYDIEIVHFQSIHSMVETC 263
 E. coli 176:NGVVSHLTSGGGFFRCHPLRDLATMTDQACRFHFNWNGMKKIIVDSATLNNKGLEVIEAHYLFNBSASCMGVLIHFQSVIHSNVRYC 263
 A. thaliana 333:DSSVLAQLGWPCMRPLFILTMSWPDRIYCSSEHWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGFAGGTMTGVLAAANEKAVENFID 420
 L. esculentum 331:DSSVLAQLGWPCMRPLFILTMSWPDRIYCSSEHWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGFAGGTMTGVLAAANEKAVENFID 418
 O. sativa 329:DSSVLAQLGWPCMRPLFILTMSWPDRIYCSSEHWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGFAGGTMTGVLAAANEKAVENFID 416
 S. rebaudiana 328:DSSVLAQLGWPCMRPLFILTMSWPDRIYCSSEHWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGFAGGTMTGVLAAANEKAVENFID 415
 H. brasiliensis 327:DSSVLAQLGWPCMRPLFILTMSWPDRIYCSSEHWPRDLCKLGSITFRAPDNVKYPSMDIAYAGFAGGTMTGVLAAANEKAVENFID 414
 S. leopoliensis 264:DSSVLAQLGWPCMRPLFILTMSWPDRLSTQ---NSALDVIWAGSLFRPPDHAKYECMDIAYAGFAGGTMTGVLAAANEKAVENFID 348
 E. coli 264:DSSVLAQLGWPCMRPLFILTMSWPDRLSTQ---NSALDVIWAGSLFRPPDHAKYECMDIAYAGFAGGTMTGVLAAANEKAVENFID 348
 A. thaliana 421:EKISYLDIFKIVELTCDKRRSEIVTSPSLEEIVHYDLNARDNAASLQPSGL-SFVIA 477
 L. esculentum 419:EKISYLDIFKIVELTCDKRRSEIVTSPSLEEIVHYDLNARDNAASLQPSGL-SFVIA 475
 O. sativa 417:EKISYLDIFKIVELTCDKRRSEIVTSPSLEEIVHYDLNARDNAASLQPSGL-SFVIA 473
 S. rebaudiana 416:EKISYLDIFKIVELTCDKRRSEIVTSPSLEEIVHYDLNARDNAASLQPSGL-SFVIA 473
 H. brasiliensis 415:EKISYLDIFKIVELTCDKRRSEIVTSPSLEEIVHYDLNARDNAASLQPSGL-SFVIA 471
 S. leopoliensis 349:ECIHFSMPRLIBACDRKQTNQQQPSLDDILANDNARDNAASLQPSGL-SFVIA 402
 E. coli 349:OCIRFTMAAIN-MSVLEKMEMREPCCV-DDVLNVANNEVVRKEVMRIAS 398

Fig. 2

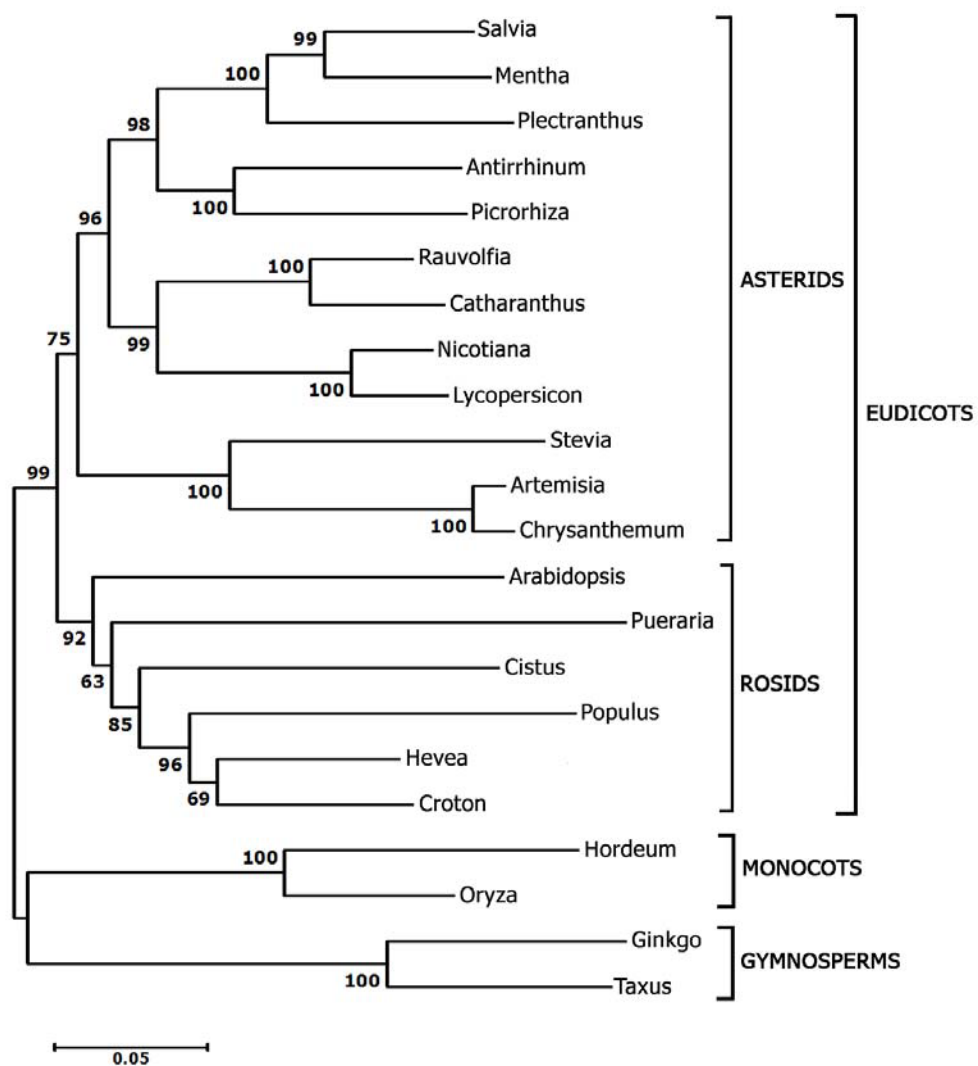


Fig. 3

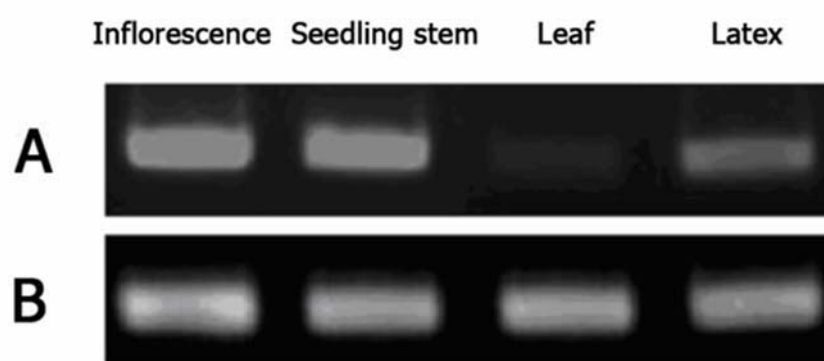


Fig. 4

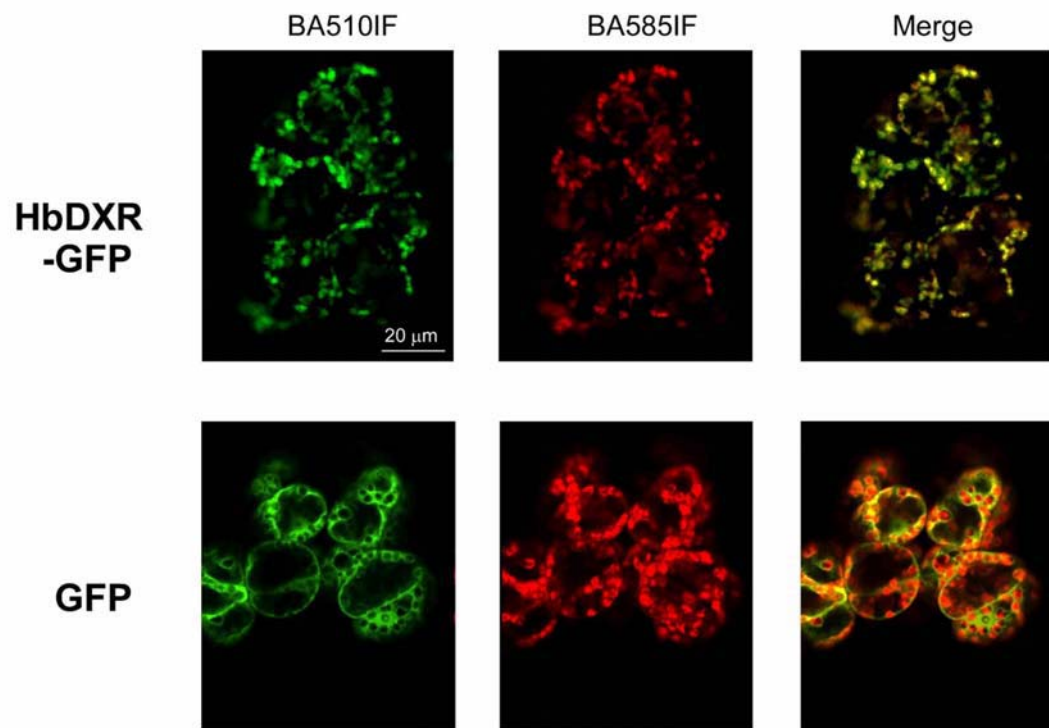


Fig. 5

Cloning and expression of the gene encoding solanesyl diphosphate synthase from *Hevea brasiliensis*

Atiphon Phatthiya^a, Seiji Takahashi^b, Nopphakaew Chareonthiphakorn^c,
Tanetoshi Koyama^b, Dhirayos Wititsuwannakul^{d,e}, Rapepun Wititsuwannakul^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Katahira 2-1-1, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

^c Department of Science and Technology, Surathani Community College, Prince of Songkla University, Surathani 84100, Thailand

^d Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^e School of Science, Walailuk University, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand

Received 9 November 2006; received in revised form 20 December 2006; accepted 20 December 2006

Available online 3 January 2007

Summary

Plastoquinones play important roles as electron carriers in the light-dependent reactions of photosynthesis and also as a cofactor of phytoene desaturation in the synthesis of carotenoid. A plastoquinone-9 (PQ-9) was identified in Frey-Wyssling organelles of fresh rubber latex from *Hevea brasiliensis*. This indicates that a *Hevea* solanesyl diphosphate synthase (HbSDS) must be present for the synthesis of the C₄₅ prenyl side chain of the PQ-9 found in the rubber latex. Based on the sequence information of other *trans*-prenyl diphosphate synthases, the cDNA encoding HbSDS was cloned from a *Hevea* rubber latex cDNA library. Sequence analysis revealed the presence of an ORF consisting of 1254 bp capable of encoding a 46,095 Da polypeptide. The deduced amino acid sequence of the clone contained all conserved regions found in typical *trans*-prenyl chain elongating enzymes. This cDNA, expressed in *Escherichia coli* cells as an insoluble but Trx-His-tagged fusion protein, showed a distinct solanesyl diphosphate synthase activity in the presence of Triton X-100. The expression level of HbSDS mRNA in latex was found to be higher than those in leaves, stems and roots. The expressed HbSDS is suggested to be a specific enzyme in the Frey-Wyssling particles of rubber latex.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Solanesyl diphosphate synthase; Plastoquinone; Frey-Wyssling particle; Prenyl diphosphate synthase; *Hevea brasiliensis*; Rubber latex

1. Introduction

Prenylquinones present in photosynthetic organisms belong to a large multifunctional family of lipid soluble compounds that include plastoquinones, phyloquinones, tocopherols and tocotrienols. All prenylquinones are composed of hydrophobic prenyl tails of various lengths attached to aromatic head groups that are capable of donating and accepting electrons. The aromatic compound homogenistic acid is used for condensation with phytyl diphosphate (PDP), geranylgeranyl DP (GGDP), or solanesyl DP (SDP) in tocopherol, tocotrienol and plastoquinone synthesis, respectively [1–4]. The length of the prenyl side chain is controlled by specific *trans*-prenyl diphosphate synthase. In general, a long-chain *trans*-prenyl diphosphate

product is derived from its short-chain prenyl diphosphate precursor produced by short-chain *trans*-prenyl diphosphate synthases which includes farnesyl diphosphate synthase (FDS) or geranylgeranyl diphosphate synthase (GGDS). Several genes encoding for short-chain *trans*-prenyl diphosphate synthases have been cloned and characterized including *Arabidopsis thaliana* FDS [5] and GGDS [6–8], *Hevea* FDS [9] and GGDS [10], *Citrus sinensis* and *Capsicum annuum* geranyl diphosphate synthases (GDS) [11–13]. At present, there have been only two plant genes encoding for a long-chain *trans*-prenyl diphosphate synthase, solanesyl diphosphate synthase (SDS) reported from a small cruciferous plant, *A. thaliana* [14–16].

To gain further insight into the structure, function and evolution of the long-chain *trans*-prenyl diphosphate synthases among various plants, we became interested in isolating the SDS gene from the latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). The incentive for this isolation arises from a preliminary detection of plastoquinone with a C₄₅ prenyl side chain moiety

* Corresponding author. Tel.: +66 74 288 266; fax: +66 74 446 656.

E-mail address: wrapepun@yahoo.com (R. Wititsuwannakul).

(plastoquinone-9) in specialized rubber latex organelles called the Frey-Wyssling (FW) particles [17]. The FW particles are surrounded by a double membrane and had been shown to contain plastochromanol and carotenoids that give characteristic yellow to orange colors [18,19]. So far, the detailed biological function of these particles in latex, besides their possible involvement in carotenoid biosynthesis, has not been established [20].

2. Materials and methods

2.1. Materials

Escherichia coli JM109 and pGEMT-easy vector (Promega) were used for the TA cloning. *E. coli* BL21 (DE3) and pET-32(a+) vector (Novagen) were used for expression of the recombinant protein. [^{14}C]IDP was from Amersham. Non-labelled IDP, GDP, FDP and GGDTP were synthesized according to the procedure of Davisson et al. [21]. Precoated reverse phase TLC plates (RP-18) were from Whatman Chemical Separation. Restriction enzymes were from Takara (Tokyo, Japan), TOYOBO (Osaka, Japan) and New England Biolabs, Inc. Ubiquinone-10 (UQ-10) was a product of Sigma.

2.2. Plant materials and RNA isolation

Fresh *Hevea* latex and other tissue samples were obtained from regularly tapped rubber trees (*Hevea*) at the Songkhla Rubber Research Institute, Songkhla, Thailand. *Hevea* seeds were collected during a fruit-bearing season, September–October, germinated in sterile sand and grown into 5-week-old seedlings. Total RNAs of latex, leaves, roots and whole young seedling tissues were isolated by using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Mitochondria and chloroplasts were prepared from *Hevea* leaves by the previously described method [22].

2.3. Frey-Wyssling particle isolation

Fresh latex containing most numerous rubber particles, in addition to other luteoid and FW particles [23], was subjected to a series of centrifugations to isolate the FW particles. First a low speed centrifugation ($1700 \times g$ at 10°C for 30 min) with swing-out bucket rotors to allow all the particles to travel through the viscous latex media, according to their densities gradients, down the length of the centrifuge tube without being forced against the sides of the tube. This aimed to minimize inter-particle collisions, especially between FW and luteoid particles. The upper half of the centrifuged latex, containing the majority of the less density rubber particles, was removed whereas the lower half was further separated, by using a fixed angle rotor centrifuge ($7000 \times g$ at 4°C for 15 min), into three distinct layers: a minor uppermost rubber fraction with yellowish FW particles lying beneath, a middle aqueous fraction and a bottom fraction containing the most dense luteoid particles. After careful removal of the uppermost rubber layer, the floating yellowish-orange FW particles were collected from the top layer of the aqueous phase and collected as a pellet by

ultracentrifugation ($59,000 \times g$ at 4°C for 20 min). The pellet was washed twice by suspending in 3 vol. of washing buffer (50 mM Tris–HCl, pH 7.4), and kept at -20°C until used.

2.4. Prenylquinone analysis

H. brasiliensis leaves (50 g) were cut into small pieces and homogenized in a Waring blender with 300 ml of ice-cold medium (0.3 ml 1 M MgCl_2 , 0.3 ml 1 M MnCl_2 , 0.3 ml 1 M glycine, 0.6 ml 0.5 M Na_2EDTA , 15 ml 1 M Tris–HCl, pH 7.5, 30.81 g sucrose, 0.48 g BSA, 211 g Na-ascorbate, added immediately before used, H_2O added to 300 ml). After filtration through four layers of cheesecloth, the filtrate was centrifuged at $2500 \times g$ at 4°C for 5 min. The pellet contained the chloroplasts and the supernatant contained the mitochondria. The mitochondria were isolated from the supernatant by centrifugation at $15,000 \times g$ at 4°C for 15 min [22]. Prenyllipids were separately extracted from the pellets (2 g, wet weight, each) of mitochondria, chloroplasts and FW particles under total reflux for 3 h with chloroform/methanol (2:1, v/v). The extracts were evaporated to dryness, dissolved in chloroform/methanol (1:1), and analyzed by normal-phase TLC (Kieselgel 60 F_{254} , Merck) with hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1, v/v/v) [24]. The UV-visualized areas contained the prenylquinones (R_f 0.27–0.59) and these areas were scraped from the TLC plates, extracted with chloroform/methanol (1:1, v/v) and evaporated to dryness. The dry sample was dissolved in solvent A (methanol/propan-2-ol; 4:1, v/v) and subjected to HPLC (Waters) on a reverse-phase C_{18} Symmetry $5 \mu\text{m}$ (3.9 mm $\times$ 150 mm) column, preequilibrated with a solvent mixture containing an equal volume of solvent A and solvent B (methanol/propan-2-ol; 1:1, v/v), at a flow rate of 1.0 ml/min. After sample injection, the column was eluted with a linear gradient from 50 to 100% solvent B for 10 min, followed by isocratic elution with solvent B for another 10 min. A standard solution of UQ-10 was prepared in solvent A and used to confirm identification of purified ubiquinone ($\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$). Plastoquinone ($\lambda_{\text{max}} = 256 \text{ nm}$) was identified by a combination of spectroscopy and mass spectroscopy according to the method of Hirooka et al. [14].

2.5. PCR amplification of *Hevea trans*-prenyl diphosphate synthase cDNA fragment

The cDNA fragment containing the region corresponding to the *trans*-prenyl diphosphate synthases was amplified from the *Hevea* latex cDNA library that had been constructed using the ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE). Seven degenerate oligonucleotide primers were designed to amplify the *Hevea trans*-prenyl diphosphate synthase cDNA fragment after identifying highly conserved regions of other *trans*-prenyl diphosphate synthases; sense primers, TransF1 (GGKRVRP, region I) 5'-GGNGGHAARMGKRTNMGDCC-3', TransF2 (VXLVSRA, region I) 5'-GTRYTSCRTTATCACRWGC-3', TransF3 (EMIHTAS, region II) 5'-GARATGATHCAYACNGCHAG-3', and TransF4 (HDDXXDE, region II) 5'-CAHGAYGAYGTGKTAGAYGA-3' and antisense primers, TransR1

(KTASLVA, region V) 5'-GCHACYAAWGANGCNGTYTT-3', TransR2 (VDDILDF, region VI) 5'-AMRTCVARAATRTCRTCMAC-3', and TransR3 (GKPAGXD, region VI) 5'-ACMBWMSCKRCHGGYAAHCC-3', where R is G or A, K is G or T, S is G or C, W is A or T, M is A or C, Y is T or C, D is G or A or T, V is G or A or C, B is G or T or C, H is A or T or C, and N is G or A or T or C. PCR was performed in a total volume of 20 μ l containing 1 μ M of amplification primer pair for 30 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 50 °C and 1 min at 68 °C. The resulting band of PCR products were extracted from agarose gel and subcloned into pGEMT-easy vector for sequencing by the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer and analyzed by GENETYX software. One of the resulting clones, that showed homology to *trans*-prenyl diphosphate synthases, was termed LS300.

2.6. 3'- and 5'-RACE reaction and cloning of *Hevea trans*-prenyl diphosphate synthase cDNA

Cloning of the full length cDNA of *Hevea trans*-prenyl diphosphate synthase was performed by using total RNA extracted from young *Hevea* seedlings as the template for both 3'- and 5'-RACE reactions based on the cDNA sequence of the LS300. The procedures applied for the 3'- and 5'-RACE reactions were according to the manufacturer's instructions (GeneRacer Kit, Invitrogen). The primers used for 3'-RACE were 5'-CGGCCAGCTTAATCCTGATGATGT-3' (HesF1), 5'-ACTCTATGGCAGGAGGGTGGCAGT-3' (HesF2) and 5'-CTGCGATGTTGAACTCGAGGAGTA-3' (HesF3), respectively, and those used for 5'-RACE were 5'-ACTCCTC-GAGTTCAACATCGCAGT-3' (HesR1), 5'-GTACTGCCAC-CCTCGTGCCATAGA-3' (HesR2) and 5'-CATCATCATG-GATTAAGCTGGCGGTAT-3' (HesR3), respectively. According to the sequence information obtained by the 3'- or 5'-RACE reaction, the cDNA was amplified by RT-PCR using the total latex RNA as the template and then sequenced. The final full length cDNA obtained was designated HbSDS.

2.7. Construction of an expression vector system in *E. coli* and purification of *Hevea trans*-prenyl diphosphate synthase

An expression vector system for the HbSDS was constructed by choosing the pET-32(a+) vector (Novagen) designed to express the gene product as a thioredoxin- and His-tagged fusion protein, suitable for production of soluble protein in the *E. coli* cytoplasm and for rapid purification. The restriction enzyme recognition site for *Sac*I and *Sal*I was introduced by PCR at the 5'- and 3'-end of the coding regions of the HbSDS cDNA, respectively. The resulting fragments were sequenced, digested with *Sac*I and *Sal*I, and ligated into the *Sac*I–*Sal*I vector of pET-32(a+), yielding the expression plasmid pET-HbSDS. The expressed plasmid was used for transformation of *E. coli* BL21(DE3), and 1 ml of an overnight culture of the transformant in Luria–Bertani medium containing 100 μ g/ml ampicillin was inoculated into 200 ml of the same medium. The cells were grown at 37 °C to reach an A_{600} value of 0.8.

Isopropyl thio- β -D-galactoside was added to a final concentration of 0.1 mM, and the culture medium was further incubated at 30 °C for 5 h. Overproduction of the proteins was confirmed by SDS/PAGE according to the standard method of Laemmli [25]. The cells were harvested by centrifugation ($5000 \times g$, 10 min) and then disrupted by sonication. The cell homogenates were separated into soluble and insoluble protein (inclusion body) fractions by centrifugation at $8000 \times g$ for 10 min. The expressed proteins were purified essentially according to the protocol of Xpress Protein Purification System (Invitrogen), using a Ni^{2+} nitrilotriacetic acid-agarose column. The insoluble proteins were extracted with buffer A (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl and 8 M urea) at 37 °C for 1 h. The protein extract was collected by centrifugation at $8000 \times g$ for 10 min, filtered through a filter membrane, and applied to a Ni^{2+} resin column. The column was washed with buffer A and the tagged protein was eluted with buffer B (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl and 0.3 M imidazole). The purified protein was renatured by dialysis against buffer C (10 mM Tris–HCl, pH 7.4, containing 1% Triton X-100).

2.8. *Solanelys* diphosphate synthase assay and product analysis

The incubation mixture, in a total volume of 100 μ l, contained 50 mM Tris–HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 20 mM β -mercaptoethanol, 50 μ M FDP, 50 μ M [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP, 0.5% Triton X-100 and 200 μ g of crude enzyme from the cell-free homogenate of HbSDS-overexpressed *E. coli* cells. After incubation at 30 °C for 1 h, the reaction was stopped by chilling on ice and followed by addition of 100 μ l saturated NaCl solution. The products were extracted with 1 ml of 1-butanol saturated with water and the amount of [$1\text{-}^{14}\text{C}$]IDP incorporated into the 1-butanol-extractable polyprenyl diphosphate was measured in a liquid scintillation counter. The enzyme activity was expressed in terms of the radioactivity in the 1-butanol extract. The 1-butanol extracts were hydrolyzed with potato acid phosphatase according to Fujii et al. [26]. The hydrolyzed products were extracted with pentane and analyzed by TLC on a reversed LKC-18 plate (Whatman) with acetone/water (19:1, v/v). The distribution of radioactive products on the TLC plate was analyzed with a Fuji BAS-100 Mac Bioimage analyzer and spots of marker prenols were visualized by exposing the plate to iodine vapor.

2.9. Expression analysis of *HbSDS* mRNAs

RT-PCR was performed for the analysis of *HbSDS* mRNA expression. Total RNAs (1 g) from various *Hevea* tissues was amplified with HbSDS specific primers, S1 (5'-CCTAGTGT-CAAGAGCCACAGCAGAA-3') and C2 (5'-GTTTATACCCC-TGTAAAGCTTACCTA-3'). The reactions were carried out with 35 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 54 °C and 1 min at 68 °C with a 2 min preheat at 94 °C. The products obtained were analyzed by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining.

3. Results

3.1. Latex Frey-Wyssling prenylquinone identification

Frey–Wyssling particles are known to be very specialized chromoplasts containing β -carotene and found in laticiferous vessels including rubber latex collected by tapping [23,27]. The prenylquinones in the lipids extracted from FW particles were identified, through a combination of TLC and HPLC, and compared to those of leaf chloroplast and mitochondria. A similar retention time (9.5 min), monitored by A_{256} in an HPLC chromatogram was obtained for the main chromatographic peaks of the prenylquinones from FW particles and chloroplasts (Fig. 1). Their chemical structures were confirmed as plastoquinone-9 (PQ-9) by mass spectroscopy (data not shown). This is different from the mitochondrial prenylquinone which was identified as UQ-10 (Fig. 1), by comparing the retention time of the chromatographic peak, monitored by A_{275} , with an authentic reference UQ-10 standard. These findings indicate a possible involvement of latex FW particles in the synthesis of PQ-9. Hence, further studies to isolate and characterize the *Hevea* solanesyl diphosphate synthase (HbSDS), involved in the synthesis of the C₄₅ prenyl side chain of the PQ-9 present in rubber latex are thus warranted.

3.2. Isolation of the gene encoding solanesyl diphosphate synthase

In order to obtain a gene fragment containing conserved amino acid regions of HbSDS, seven degenerated oligonucleotide primers were designed to identify highly conserved regions of various *trans*-prenyl diphosphate synthases such as octaprenyl diphosphate synthase (ODS) from *E. coli* [28], SDP synthase from *Anabaena* [29], SDP synthase 1 from *A. thaliana* [14], decaprenyl diphosphate (DDP) synthases from *Gluconobacter suboxydans* [30] and *Schizosaccharomyces pombe* [31]. Three kinds of products were obtained from PCR using a *Hevea* latex cDNA library as a template with primer pairs of TransF1 and TransR2. Then nested PCR was performed using primers TransF3 and TransR1. The resulting 0.3 kb cDNA fragment was cloned into the pGEMT-easy vector, and its nucleotide sequence was determined. The deduced amino acid sequence of this cDNA contained regions common to the conserved regions II, III, IV and V of *trans*-prenyl diphosphate synthases with 39, 65 and 89% identities to the corresponding regions of *E. coli* ODS, *Anabaena* SDP synthase and *A. thaliana* SDP synthase 1, respectively. Specific primers, designed from the 0.3 kb cDNA fragment, were used to amplify 5'- and 3'-UTRs by 5'- and 3'-RACE, respectively. Two cDNA fragments that contained the same ORF were obtained from the 5'-end amplification and only a 762 bp cDNA fragment was obtained from the 3'-RACE. These sequences were used to design primers for the amplification of full length cDNA. The full length sequence revealed the presence of an ORF consisting of 1254 bp capable of encoding a 418 amino acid protein (Fig. 2). The protein encoded by this ORF contains the seven conserved regions found in typical prenyl diphosphate synthases (Fig. 3). This gene was thus designated as *HbSDS* (*Hevea* solanesyl diphosphate synthase, GenBank accession no. DQ437520). The amino acid identities of the protein encoded by this ORF compared to those of the SDP synthase 1 from *A. thaliana*, ODP synthase from *E. coli*, GDP synthase from *Citrus sinensis*, GGDP and FDP synthases from *Hevea* were 70, 46, 41, 33 and 23%, respectively.

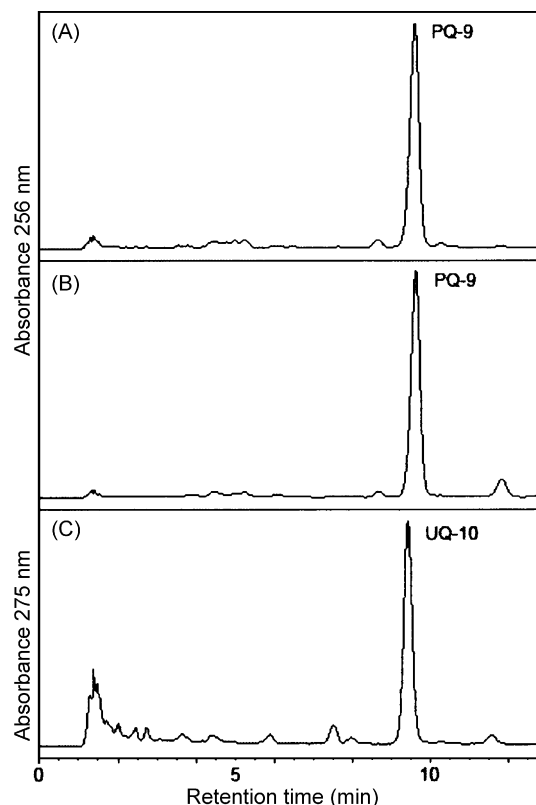


Fig. 1. HPLC chromatogram of *Hevea* prenylquinones. (A) Chloroplast plastoquinone-9 extracted from leaves; (B) Frey-Wyssling particle plastoquinone-9 extracted from latex; (C) mitochondrial ubiquinone-10 extracted from leaves.

sphate synthases (Fig. 3). This gene was thus designated as *HbSDS* (*Hevea* solanesyl diphosphate synthase, GenBank accession no. DQ437520). The amino acid identities of the protein encoded by this ORF compared to those of the SDP synthase 1 from *A. thaliana*, ODP synthase from *E. coli*, GDP synthase from *Citrus sinensis*, GGDP and FDP synthases from *Hevea* were 70, 46, 41, 33 and 23%, respectively.

3.3. Overproduction of recombinant HbSDS protein in *E. coli*

In order to obtain a HbSDS gene product, its cDNA was expressed in *E. coli* cells by means of a pET-32a(+) expression system that contains a thioredoxin fusion sequence suitable for production of soluble proteins in the *E. coli* cytoplasm. By induction with IPTG, the *E. coli* cells harboring HbSDS cDNA produced a recombinant protein of 60 kDa in the insoluble pellet fraction (Fig. 4). The urea extracted HbSDS protein was subjected to a metal affinity column for purification of the His-tagged fusion protein, under denaturing conditions. As shown in Fig. 4, the affinity-purified HbSDS protein was detected as a single band of 60 kDa corresponding to the His-tagged fusion protein.

3.4. Enzymatic activity of HbSDS protein

The activity of HbSDS was examined in the crude enzyme obtained from a cell-free homogenate of IPTG-induced *E. coli*

```

1  AATCACTGGCOCTCAAACCTCAAACCTGATAAGAACTCCAAGACAAGACCGTCTTATGTGGGCTTATTGGATCCACGAGTGGAGAACTCCCACTTCTGT
101 CGTCTGTGAAAAGAGAAACTTCTGAACTTGGAAACCCATTGCACTTCTTTTATTCTTTTATTCTTTCAAGTTTCCATCAGAACCCGTGTTTGTGTTTC
201 TTCTTTTCACTCTATTCTTCTGCTGTTTGTGCTTATGGCAATCTGAACGAGATTGCTATCTGGGTTTGTATTGAAGTCAAATTTCTTTGCTTTCT
301 GTTTCTTGTGAGAAATGATGTCAATGACATGCTACAGTCTTGATTTTGAAGGACTGTGTTTGAATTGGCGGCTGTGGGTGCTCCTCCAATGCTTCAA
      M M S M T C Y S L D F G R T V F D L A A C G C S S N A S I 29
401 TAGATAGGTGTTCACTGAGGAATTATGCAAGGTCGGTTTATAGGACTTGAATAGAGACTATGCTGCTAGAAGATCGCCCTATTGCCGGCGAGATAGTGC
      D R C S V R N Y A R S V Y R T C N R D Y A A R R S P Y C R R D S A 62
501 TTGGTGTGAGTTTCTTCGAACCAAGGCCCTGAGACTTTACTTAAACGGGGTTAGTCAAGATCCTGCTGTAAATTTGAAGGAGTCAAGAGGCCAATTTC
      W C R V S S T K A P E T L L N G V S Q D P A V N L K E S R G P I S 95
601 TTGATAAATGTGTTGAAGCGGTTGCTGGTGATCTCCAGACTCTCAACCAAAACCTCGGTCGATTGTTGGTGCAGAAAACCCAGTTTATGTCTGCAG
      L I N V F E A V A G D L Q T L N Q N L R S I V G A E N P V L M S A A 129
701 CTGATCAGATATTTGGTGTGGTGGGAAAAGGATGCGACCACTTTGGTATTCTAGTGTCAAGAGCCACAGCAGAAATAGTAGGGTTAAAGAACTCAC
      D Q I F G A G G K R M R P A L V F L V S R A T A E I V G L K E L T 162
801 TACGAAACATCGACGTTTAGCAGAGATCATTGAGATGATCCATCTGCAAGCTTAATTCATGATGATGTACTAGATGAAAGTAACATGCGAAGAGGAAAA
      T K H R R L A E I I E M I H T A S L I H D D V L D E S N M R R G K 195
901 CAAACGGTTTCATCAACTGTATGGCAGGAGGGTGGCAGTACTGGCTGGGATTTCATGTTTGGTCTCAGTCTCATGGTACCTAGCAAACTCTGAAACATTG
      Q T V H Q L Y G T R V A V L A G D F M F A Q S S W Y L A N L E N I E 229
1001 AAGTCATTAAGCTTATCAGCCAGGTATTAAAGATTTTGCAAGTGGTGAATAAAGCAAGCATCTAGTTTGTGTTGACTGCGATGTTGAACTCGAGGAGTA
      V I K L I S Q V I K D F A S G E I K Q A S S L F D C D V E L E E Y 262
1101 CTTGATCAAGAGCTATTACAAAACCTGCTCTTTAATTGCTGCAAGTACCAAGGAGCTGCTATTTTGTAGTGGGGTGGACAGCAGTGTGCTGAACAAATG
      L I K S Y Y K T A S L I A A S T K G A A I F S G V D S S V A E Q M 295
1201 TATGAATATGGTAAAGATCTTGGTCTGCTTCCAAGTTGTTGACGAGTACTGGATTTTACGCACTCAGCAGAGCAGCTGGGGAAGCCAGCTGGCAGTG
      Y E Y G K N L G L S F Q V V D D V L D F T Q S A E Q L G K P A G S D 329
1301 ACTTGGCAAAGGGAACCTTACCGCCCTGTAATATTGCTCTGGGAGAAGAACCAAACCTGAGAGAAATCATTGAGTCTGAATTCGTGAGACTGGTTTC
      L A K G N L T A P V I F A L E K E P K L R E I I E S E F C E T G S 362
1401 TCTGGATGAAGCTGTTGAGTTGGTTAAGCAGTGTGGGGTATTGAAAGAGCACAAGAATTAGCGAAGGAGAAAGCTGATCTTGAATACAGAATCTTAAT
      L D E A V E L V K Q C G G I E R A Q E L A K E K A D L A I Q N L N 395
1501 TGTCTTCTCGGGGTGATTTCAATCACATCTCAAAGAAATGGTGTGTACAATCTCGAACGGATTGATTAGTTAGATACTGCTGTAGAGAAACAAATA
      C L P R G V F Q S H L K E M V L Y N L E R I D 418
1601 TAGGTAAGCTTTACAGGGGTATAAACAAGAAATAGCTGGATGAGGATCCTTTATGTATCAGTGCAGCAATTGTTTTCTGCAATTGTTTCACTGAAGTTG
1701 GCCCAAACAGAAATAACTCCGCAAAATTTCTGGTATACAGATTTTGTGGCCATCAATAATGTGAAGCTTCTTTATGTATTTTGTGCTGATTTTCAAAAA
1801 AAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HbSDS. The number of nucleotide sequence and amino acid sequence are indicated on the left and right, respectively.

harboring pET-HbSDS. The prenyl alcohol product clearly indicated that the cloned gene catalyzed the synthesis of a C₄₅ prenyl moiety (Fig. 5). This confirmed that the expressed enzyme is solanesyl diphosphate synthase. When the primer substrate specificity was examined by using four allylic diphosphates namely dimethylallyl diphosphate (DMADP), GDP, FDP and GGDP (Table 1), the HbSDS was found to utilize only allylic primers that contain at least two C₅ isoprenyl units and its allylic substrate specificity is directly proportional to the isoprene unit contents of the primers, GGDP > FDP > GDP, respectively.

3.5. Expression analysis of HbSDS mRNAs

To examine the HbSDS mRNA expression in various *Hevea* tissues, RT-PCRs using total RNA extracted from young stems, roots, leaves and latex were performed. As shown in Fig. 6, the

PCR products representing the HbSDS mRNA expressions were detected in all tissues but at a different level. The level of transcript accumulation for HbSDS was found to be highest in the latex and lowest in the root. This is opposite to the expression level of *Hevea* GGDP synthase, a short-chain prenyl

Table 1
Allylic substrate specificity of HbSDS

Substrate	Relative activity
DMADP	0
GDP	44
FDP	100
GGDP	257

Enzyme reactions were performed as described in Section 2. Each allylic substrate was used at 50 with 50 μM [1-¹⁴C]IDP. Relative activities were determined based on the activity with FDP.

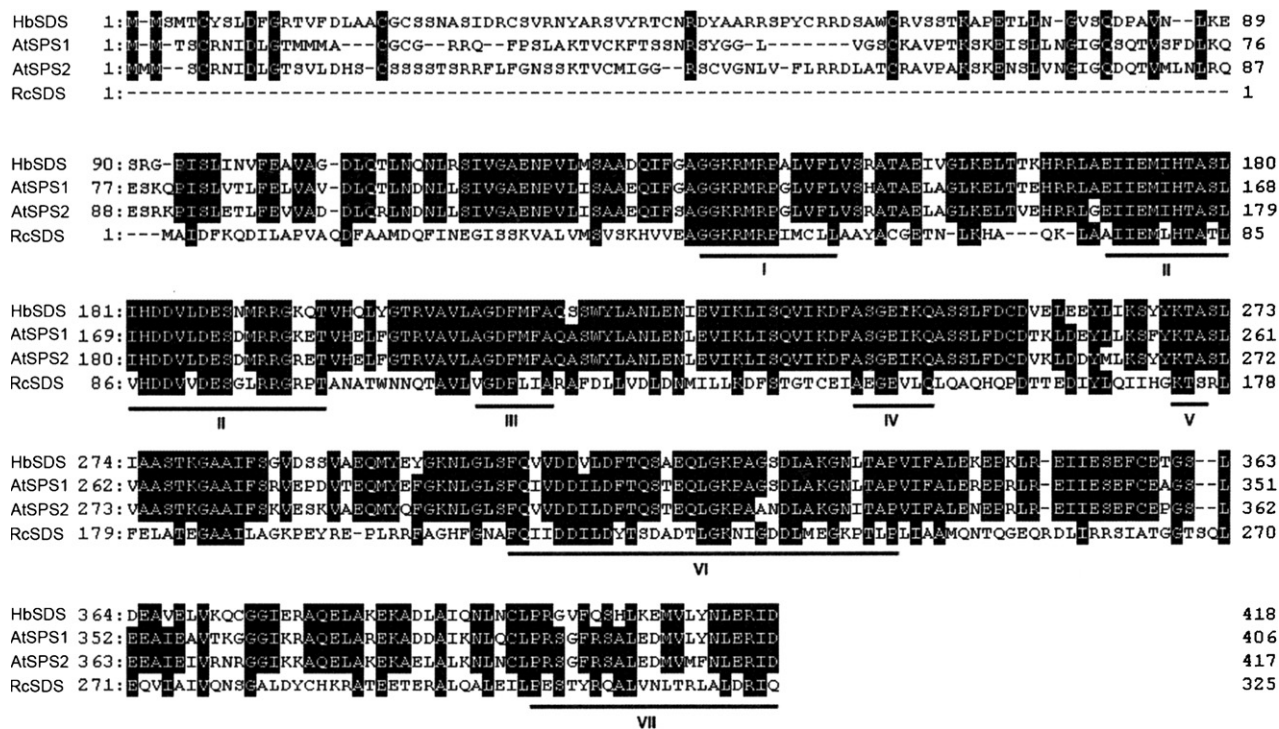


Fig. 3. Comparison of the deduced amino acid sequences of HbSDS. The deduced amino acid sequences of HbSDS are compared with those of solanesyl diphosphate synthases from *A. thaliana* (SPS1 GenBank accession no. BAD88533 and SPS2 GenBank accession no. BAD88534) and *Rhodobacter capsulatus* (GenBank accession no. BAA22867). The filled boxes indicate the positional identity of the sequences. The seven highly conserved regions are underlined.

diphosphate synthase, which had been shown to be higher in the leaves than in the latex [10].

4. Discussion

Our identification study on prenylquinones from *Hevea* tissues showed that the prenylquinone in leaf mitochondria possesses a C₅₀ prenyl side chain which is longer than those C₄₅ prenyl side chains found in leaf chloroplast and rubber latex FW particles. This finding indicates the need for at least two *Hevea* trans-long chain prenyl diphosphate synthases including a latex solanesyl diphosphate synthase. This is different from the prenylquinones found in *A. thaliana* where only a single species of side chain with the C₄₅ prenyl moiety was found [14].

A *Hevea* rubber latex gene that encodes for a solanesyl diphosphate synthase was successfully cloned and expressed in *E. coli* cells. This gene contains a putative ORF encoding a protein consisting of 418 amino acid residues with a predicted molecular mass of 46 kDa. The expressed protein was found in the pellet fraction in spite of being fused with a His- and thioredoxin-tag suitable for production of soluble protein in the *E. coli* cytoplasm. This may result from a much higher proportion of hydrophobic amino acids (48%) as compared to the hydrophilic ones (28%). As a consequence, a non-ionic detergent (Triton X-100) was required to stimulate the enzymic activity of the HbSDS, and this is similar to reports for other long-chain prenyl diphosphate synthases found in microorganisms [32,33]. From the sequence analysis of HbSDS the Predotar program [34] has predicted the presence of a plastid targeting sequence. The plant plastids had previously been

shown to accumulate isoprenoids, including carotenoids, prenyl chains of chlorophylls and plastoquinone, synthesized via the MEP pathway [35–37]. The latex FW particles have also been assumed to be modified plastids [38] due to the presence of

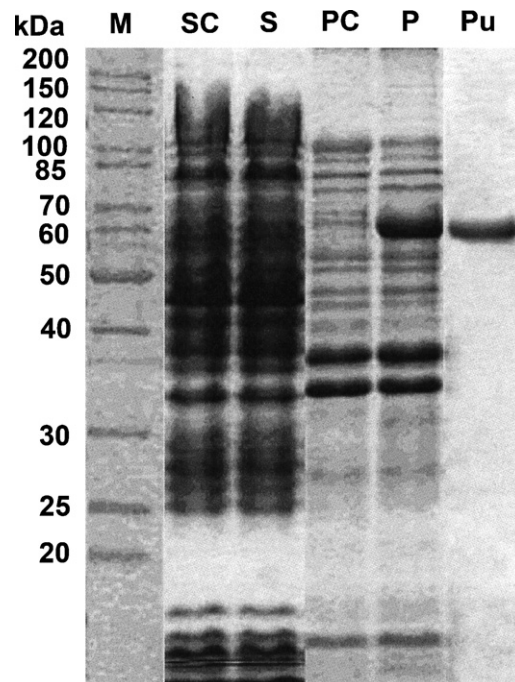


Fig. 4. SDS-PAGE gel of purified HbSDS. Lanes SC and S, soluble protein from non-induced and induced *E. coli* cells, respectively; lanes PC and P, insoluble proteins from non-induced and induced *E. coli* cells, respectively; lane Pu, purified HbSDS; lane M, molecular-mass markers.

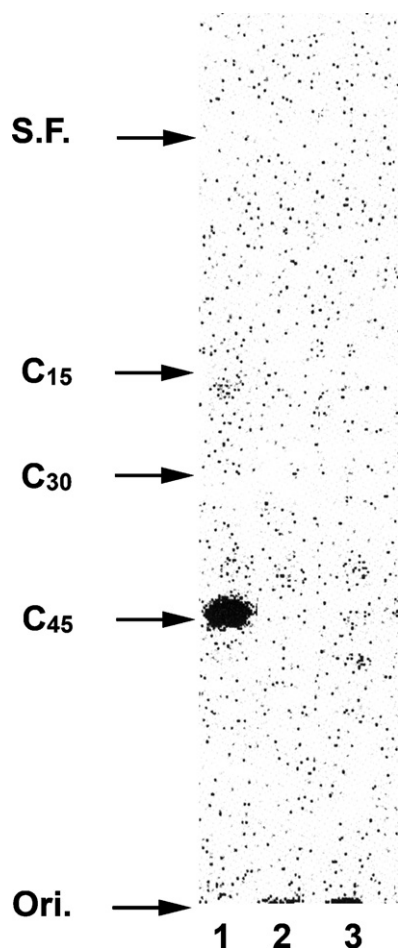


Fig. 5. TLC autoradiogram of the prenol alcohols obtained by enzymatic hydrolysis of the products formed by the reaction with cell-free homogenate of IPTG-induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 1), non-induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 2), and *E. coli* harboring pET-32 (lane 3). S.F.: solvent front; C₁₅: farnesol; C₃₀: hexaprenol; C₄₅: solanesol; Ori.: origin.

plastoquinone, plastochromanol and isoprenoids. Hence, the expressed HbSDS may be specific for the synthesis of PQ-9 prenol side chains in the latex FW particles. Accordingly, the level of HbSDS mRNA transcript was also found to be higher in the latex. We therefore suggest that it has an important function in the laticiferous vessels where rubber biosynthesis is highly active. The PQ-9 in the latex FW particles may function as a cofactor in the sequential desaturation reactions, catalyzed by phytoene desaturase, required for carotenoid synthesis and play an antioxidative role similar to the function of ubiquinone in mitochondria and/or be involved in disease resistance as had been reported in other plants [39–41].

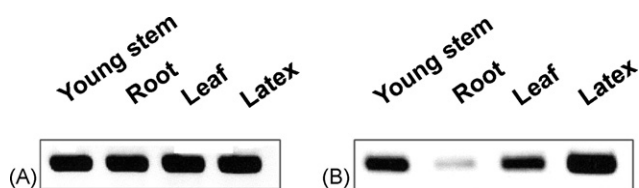


Fig. 6. Analysis of mRNA expression patterns by RT-PCR. (A) Control (18S rRNA); (B) mRNA expression of HbSDS (35 cycles).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Thailand Research Fund, TRF Royal Golden Jubilee-Ph.D. Program, Association of International Education, Japan, and Prince of Songkla University. We thank Dr. Brian Hodgson for the critical reading of the manuscript.

References

- [1] D.R. Threlfall, G.R. Whistance, Biosynthesis of isoprenoid quinones and chromanols, in: T. Goodwin (Ed.), *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, Liverpool, UK, 1971, pp. 357–404.
- [2] D. Schulze-Siebert, U. Homeyer, J. Soll, G. Schultz, Synthesis of plastoquinone-9, α -tocopherol and phyloquinone (Vitamin K1) and its integration in chloroplast carbon metabolism of higher plants, in: P. Stumpf, J. Mudd, W. Nes (Eds.), *The Metabolism, Structure, and Function of Plant Lipids*, Plenum Press, New York, 1987, pp. 29–36.
- [3] U. Oster, C.E. Bauer, W. Rudiger, Characterization of chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a* synthases by heterologous expression in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 9671–9676.
- [4] J.F. Pennock, Biosynthesis of plastoquinone, *Methods Enzymol.* 110 (1985) 313–319.
- [5] N. Cunillera, M. Arro, D. Delourme, E. Karst, A. Boronat, A. Ferrer, *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes, *J. Biol. Chem.* 272 (1996) 7774–7780.
- [6] K. Okada, T. Saito, T. Nakagawa, M. Kawamukai, Y. Kamiya, Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 122 (2000) 1045–1056.
- [7] X.F. Zhu, K. Suzuki, K. Okada, K. Tanaka, T. Nakagawa, M. Kawamukai, H. Matsuda, Cloning and functional expression of geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*, *Plant Cell Physiol.* 38 (1997) 357–361.
- [8] X.F. Zhu, K. Suzuki, T. Saito, K. Okada, K. Tanaka, T. Nakagawa, H. Matsuda, M. Kawamukai, Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria, *Plant Mol. Biol.* 35 (1997) 331–341.
- [9] K. Adiwilaga, A. Kush, Cloning and characterization of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *Plant Mol. Biol.* 30 (1996) 935–946.
- [10] A. Takaya, Y. Zhang, K. Asawatreratanakul, D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, S. Takahashi, T. Koyama, Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl diphosphate synthase of *Hevea brasiliensis*, *Biochim. Biophys. Acta* 1625 (2003) 214–220.
- [11] F. Bouvier, C. Suire, A. d'Harlingue, R.A. Backhaus, B. Camara, Molecular cloning of geranyl diphosphate synthase and compartmentation of monoterpene synthesis in plant cells, *Plant J.* 24 (2000) 241–252.
- [12] M. Kuntz, S. Romer, C. Suire, P. Hugueney, J.H. Weil, R. Schantz, B. Camara, Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening, *Plant J.* 2 (1992) 25–34.
- [13] A. Badillo, J. Steppuhn, J. Deruere, B. Camara, M. Kuntz, Structure of a functional geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Capsicum annum*, *Plant Mol. Biol.* 27 (1995) 425–428.
- [14] K. Hirooka, T. Bamba, E. Fukusaki, A. Kobayashi, Cloning and kinetic characterization of *Arabidopsis thaliana* solanesyl diphosphate synthase, *Biochem. J.* 370 (2003) 679–686.
- [15] L. Jun, R. Saiki, K. Tatsumi, T. Nakagawa, M. Kawamukai, Identification and subcellular localization of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 45 (2004) 1882–1888.
- [16] K. Hirooka, Y. Izumi, C. An, Y. Nakazawa, E. Fukusaki, A. Kobayashi, Functional analysis of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 592–601.

- [17] A. Frey-Wyssling, Microscopic investigations on the occurrence of resins in *Hevea* latex, Arch. Rubbercult. 13 (1929) 392.
- [18] P.B. Dickenson, The ultrastructure of the vessel of *Hevea brasiliensis*, in: L. Mullins (Ed.), Proc. Natl. Rubber Prod. Res. Assoc., Jubilee Conf., Mc Laren and Sons, London, 1965, pp. 52–56.
- [19] B.L. Archer, B.G. Audley, G.P. Mc Sweeney, T.C. Hong, Studies on the composition of latex serum and bottom fraction, J. Rubb. Res. Inst. Malaya 21 (1969) 560–569.
- [20] D. Wititsuwannakul, R. Wititsuwannakul, Biochemistry of natural rubber and structure of latex, in: A. Steinbuchel (Ed.), Biopolymers, vol. 2, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001, pp. 151–202.
- [21] V.J. Davison, A.B. Woodside, T.R. Neal, K.E. Stremmer, M. Muehlbacher, C.D. Poulter, Phosphorylation of isoprenoid alcohols, J. Org. Chem. 51 (1986) 4768–4779.
- [22] J. Day, Isolation of nuclear, chloroplast and mitochondrial DNA from plants, Biochem. Educ. 25 (1997) 41–43.
- [23] G.F.J. Moir, Ultracentrifugation and staining of *Hevea* latex, Nature 21 (1959) 1626–1628.
- [24] H.A. Schwertner, J.B. Biale, Lipid composition of plant mitochondria and of chloroplasts, J. Lipid Res. 14 (1973) 235–242.
- [25] L.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 277 (1970) 680–685.
- [26] H. Fujii, T. Koyama, K. Ogura, Efficient enzymatic hydrolysis of poly-prenyl pyrophosphates, Biochim. Biophys. Acta 712 (1982) 716–718.
- [27] P.B. Dickenson, Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea Brasiliensis*, J. Rubb. Res. Inst. Malaya 21 (1969) 543–559.
- [28] K. Asai, S. Fujisaki, Y. Nishimura, T. Nishino, K. Okada, T. Nakagawa, M. Kawamukai, H. Matsuda, The identification of *Escherichia coli ispB* (CEL) gene encoding the octaprenyl diphosphate synthase, Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 (1994) 340–345.
- [29] T. Kaneko, Y. Nakamura, C.P. Wolk, T. Kuritz, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, S. Shimpō, M. Sugimoto, M. Takazawa, M. Yamada, M. Yasuda, S. Tabata, Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, DNA Res. 8 (2001) 205–213.
- [30] K. Okada, T. Kainou, K. Tanaka, T. Nakagawa, H. Matsuda, M. Kawamukai, Molecular cloning and mutational analysis of the *ddsA* gene encoding decaprenyl diphosphate synthase from *Gluconobacter suboxydans*, Eur. J. Biochem. 255 (1998) 52–59.
- [31] K. Suzuki, K. Okada, Y. Kamiya, X.F. Zhu, T. Nakagawa, M. Kawamukai, H. Matsuda, Analysis of the decaprenyl diphosphate synthase (*dps*) gene in fission yeast suggests a role of ubiquinone as an antioxidant, J. Biochem. 121 (1997) 496–505.
- [32] S. Takahashi, T. Nishino, T. Koyama, Isolation and expression of *Paracoccus denitrificans* decaprenyl diphosphate synthase gene for production of ubiquinone-10 in *Escherichia coli*, Biochem. Eng. J. 16 (2003) 183–190.
- [33] S. Ohnuma, K. Koyama, K. Ogura, Purification of solanesyl diphosphate synthase from *Micrococcus luteus*. A new class of prenyltransferase, J. Biol. Chem. 266 (1991) 23706–23713.
- [34] I. Small, N. Peeters, F. Legeai, C. Lurin, Predotar: a tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences, Proteomics 4 (2004) 1581–1590.
- [35] H.K. Lichtenthaler, J. Schwender, A. Disch, M. Rohmer, Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway, FEBS Lett. 400 (1997) 271–274.
- [36] W. Eisenreich, F. Rohdich, A. Bacher, Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids, Trends Plant Sci. 6 (2001) 78–84.
- [37] M. Seemann, B.S. Bui, M. Wolff, M. Miginiac-Maslow, M. Rohmer, Isoprenoid biosynthesis in plant chloroplasts via the MEP pathway: direct thylakoid/ferredoxin-independent photoreduction of GcpE/IspG, FEBS Lett. 580 (2006) 1547–1552.
- [38] N. Ohya, T. Koyama, Rubber biosynthesis of natural rubber and other natural polyisoprenoids, in: T. Koyama, A. Steinbuchel (Eds.), Biopolymers, vol. 2, Wiley-VCH, 2001, pp. 73–109.
- [39] S.R. Norris, T.R. Barrette, D. DellaPenna, Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis thaliana* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation, Plant Cell 7 (1995) 2139–2149.
- [40] T. Hundal, P. Forsmark-Andree, L. Ernster, B. Andersson, Antioxidant activity of reduced plastoquinone in chloroplast thylakoid membranes, Arch. Biochem. Biophys. 324 (1995) 117–122.
- [41] U. Maciejewska, L. Polkowska-Kowalczyk, E. Swiezewska, A. Szkopinska, Plastoquinone: possible involvement in plant disease resistance, Acta Biochim. Pol. 49 (2002) 775–780.

Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms

Kanyanatt Kanokwiroon,¹ Rawee Teanpaisan,² Dhirayos Wititsuwannakul,³ Alan B. Hooper⁴ and Rapepun Wititsuwannakul¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, ²Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, ³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand and

⁴Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics, University of Minnesota, St Paul, MN, USA

Summary

This study aimed at screen for antimicrobial activity present in the non-rubber constituents of rubber latex of *Hevea brasiliensis* against various microbial strains. An antimicrobial protein, hevein was extracted from the bottom fraction after centrifugation and purified by acetone fractionation and anion exchange chromatography on a DEAE-Sepharose Fast Flow column. This procedure was more efficient and rapid than the previously described procedures. The antimicrobial activity was investigated and revealed that hevein, a small (4.7 kDa) cysteine-rich protein, had strong antimicrobial activity, especially against *Candida* spp. including *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. The MIC₈₀ value for hevein was as low as 12 µg ml⁻¹ with *C. tropicalis* ATCC 750. Higher MIC₈₀ values were obtained for *C. albicans* ATCC 10231 (95 µg ml⁻¹) and *C. krusei* ATCC 6258 (190 µg ml⁻¹). To confirm the antifungal activity, hevein also inhibited the growth of those fungi in a disk diffusion assay and its inhibition was enhanced when a *Hevea* latex protease inhibitor was also included. Hevein at a concentration of 30 µg ml⁻¹ also caused a Ca²⁺-dependent aggregation of *C. tropicalis* yeast cells. These data indicate that hevein can inhibit the growth of certain potential oral fungal pathogens.

Key words: *Hevea brasiliensis*, hevein, antimicrobial activity, *Candida* spp., oral organisms, rubber latex.

Introduction

Hevea brasiliensis is a tropical rubber tree belonging to the family Euphorbiaceae. It is extensively cultivated in Southeast Asia for the production of natural rubber. Although numerous plants can synthesize rubber in latex, the *Hevea* rubber tree remains to be the most suitable and viable source of commercial natural rubber. A few hundred milliliters of latex can be obtained from each tree by simply incising the bark, the common practice of tapping the rubber trees. Besides rubber particles that constitute 30–40% of the whole

latex volume, the latex contains numerous other non-rubber constituents including proteins that are presently overlooked and discarded as waste in the rubber industry. In our laboratory, we had already purified and characterised several biological-active molecules present in the non-rubber constituents from latex such as β-1,3-glucanase isozymes,¹ a polyphenol oxidase,² NAD(P)H quinone reductase³ and a protease inhibitor.⁴ These proteins are involved in the defense mechanisms of the rubber tree against fungal pathogens. In this study, hevein was found to inhibit various *Candida* spp. As the rubber trees are tapped or wounded almost everyday for latex collection, it has been suggested that the rubber tree must be well equipped with antimicrobial compounds to protect itself from any invaders. Defense-related proteins reported to be present in latex include chitinase, β-1,3-glucanase, hevamines, hevein, glucosidase, β-galactosidase, β-N-acetyl-glucosaminidase, polyphenol oxidase, and a protease inhibitor.^{5,6}

Correspondence: Assoc. Prof. Dr. Rapepun Wititsuwannakul, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

Tel.: +66 7 428 8266. Fax: +66 7 444 6656.

E-mail: wrapepun@yahoo.com or rapepun.w@psu.ac.th

Accepted for publication 21 December 2007

This has been supported by the finding that whole latex had antifungal activity against a broad spectrum of potential plant fungal pathogens. Such antifungal activity may be related to the presence of glycosidase activities such as α -mannosidase, *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitinase, chitinase/lysozyme and β -1,3-glucanase that hydrolyse the polymers in the fungal cell wall.^{1,7–9} Another report showed that another substance with antifungal activity was hevein, a major protein component of the B-serum derived from the bottom fraction of centrifuged fresh latex. Hevein was active against several phytopathogenic fungi included *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Pyricularia oryzae*, *Septoria nodorum* and *Trichoderma hamatum*.¹⁰ Hence, the B-serum normally treated as waste could be a great biotechnological resource because of the large quantity produced and its potential for possible use as an antimicrobial agent, a value added product. In this study, we determined the antimicrobial activity of freshly prepared latex serum against various potentially pathogenic oral microorganisms and identified a compound that possesses antimicrobial activity.

Materials and methods

Microorganisms

A total of 49 microbial strains, potential pathogens of the oral cavity and respiratory tract, were tested in this study. These were *Porphyromonas gingivalis* A, *P. gingivalis* W 50, *P. gingivalis* 381, *P. gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* 25611, *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931, *Candida albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10231 and 28 clinical isolates. *Candida glabrata* ATCC 90030, *C. glabrata* ATCC 66032, *Candida tropicalis* ATCC 750, *C. tropicalis* ATCC 13803, *C. tropicalis* ATCC 66029, *Candida krusei* ATCC 6258, *C. krusei* ATCC 34135, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, *C. neoformans* ATCC 90113. Organisms were maintained on 5% blood agar, brain heart agar or Sabouraud dextrose agar as appropriate to their growth requirements.

Preparation of B-serum from fresh latex

Fresh latex was collected from rubber trees of the *H. brasiliensis* species (clone RRIM 600) grown at

Songkhla Rubber Research Center, Songkhla, Thailand. The latex was filtered through cheese cloth and centrifuged at 5000 *g* for 15 min at 4 °C to separate the bottom fraction from the latex serum. The bottom fraction was subject to ultracentrifugation at 59 000 *g*, 4 °C for 45 min and four main layers were obtained. The upper white creamy layer consisting mostly of rubber particles was discarded, a thin layer of yellow Frey-Wyssling particles beneath the top layer, the less coloured serum fraction called C-serum and the yellowish bottom fraction containing luitoid particles were kept for antimicrobial activity screening. After rinsing the bottom fraction with isotonic buffer [50 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4 containing 0.9% NaCl (w/v)] to remove any contaminating latex, the luitoid particles in the bottom fractions were burst by freezing and thawing several times until a majority had lysed. This was then centrifuged at 8000 $\times$ *g* for 15 min at 4 °C and the brownish aqueous fraction called B-serum was collected. The Frey-Wyssling layer, C-serum and B-serum were screened for antimicrobial activity. The B-serum from the bottom fraction was the only one to show antimicrobial activity.

Purification of an antimicrobial protein from B-serum

B-serum was fractionated by acetone precipitation with increasing concentrations from 0–40%, 40–60% and 60–80% acetone saturation and centrifuged. The pellets were collected and any acetone was removed by blow drying. Pellets of each fraction were dissolved in 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4 and were screened for antimicrobial activity. The active fraction was submitted to anion exchange chromatography on a DEAE-Sepharose Fast Flow column equilibrated in 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4 and washed with 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4 until the A₂₈₀ fell below 0.01. The bound protein was then eluted with a gradient of 0–0.5 mol l⁻¹ NaCl in the same buffer. The peak fractions containing antimicrobial activity were pooled, dialysed against water and lyophilised. Protein concentrations were determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard.¹¹

N-terminal amino acid sequencing

The 11 amino acids of the NH-terminal sequence were determined by Edman degradation using the Applied Biosystems-Procise HT Instrument (Mayo Proteomic Research, Minneapolis, MN, USA).

Antimicrobial assay of antimicrobial protein

The broth microdilution method

For determining the minimal inhibitory concentration (MIC) values, bacteria were grown to stationary phase in Brain Heart Infusion (BHI) broth under aerobic or anaerobic conditions, according to the species being tested. Each cell suspension was adjusted to approximately 10^6 CFU ml⁻¹. For yeast, MIC testing was performed using a modified broth microdilution method following that of the National Committee for Clinical Laboratory Standards.¹² Yeasts were grown on Sabouraud dextrose agar (SDA) and incubated at 35 °C for 24 h. The inoculum was prepared by picking five colonies from these culture plates and suspending them in RPMI medium pH 7.0, the cell density was adjusted to the density of a 0.5 McFarland standard unit at 530 nm, which resulted in a yeast stock suspension of 1×10^6 to 5×10^6 cells ml⁻¹. A working suspension was prepared by diluting this 1 : 1000 with appropriate medium to obtain 1×10^3 – 5×10^3 CFU ml⁻¹. The broth microdilution test was performed by using 96 well plastic flat bottom plates with covers. Then, 50 µl of sample was added and serially diluted by two fold dilutions to appropriate concentrations. A control was included for the determination of the growth of each species in the absence of antimicrobial protein. 50 µl of working inoculum was added to 100 µl final volumes. After inoculation, plate was incubated at 35 °C for 24 h. The optical density at 620 nm (OD₆₂₀) was measured with a microplate reader. The OD of the blank wells were subtracted from the OD of the inoculated wells.

For a growth inhibition plot, *Candida* spp. were mixed with RPMI 1640 medium and hevein at various concentrations and incubated for 24 h. The growth inhibition was represented as a percentage of the growth inhibition of the control cultures.

The disk diffusion assay

This was performed as described previously¹³ with several modifications. Briefly, SDA was autoclaved and cooled to 45 °C. A suspension of *C. albicans* ATCC 10231 and *C. tropicalis* ATCC 750 in RPMI 1640 medium was added to a concentration of 1×10^4 organisms ml⁻¹ and 20 ml portions of the warm liquid agar suspension were added to a Petri dish. Sterile paper discs were placed on the solidified agar, and 40 µl of diluted sample preparations was added to each disc, and the plates were incubated overnight at 37 °C. Clear zones of fungal growth were visualised around the discs containing inhibitory concentrations of antimicrobial proteins.

The disk diffusion assay was similarly employed for investigating the effect of a *Hevea* proteinase inhibitor (HPI) on the antifungal activity of hevein. The HPI was partially purified, as an 80–95% acetone precipitated fraction from the C-serum isolated from ultracentrifuged fresh latex, according to the method described by Sritanyarat *et al.* [4]. Hevein at 40 µg was mixed with either 200 or 400 µg HPI before adding it to each paper disc. The resulting clear zones of fungal growth were compared to those of the controls containing either hevein (40 µg) or HPI (400 µg) alone.

Aggregation analysis

Candida tropicalis ATCC 750 was used in this experiment. The experiments were carried out as previously described.¹⁴ Briefly, the yeast cells were suspended in calcium-binding buffer (CBB); 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 6.75, 0.5 mmol l⁻¹ CaCl₂, 5 mmol l⁻¹ MgSO₄, 0.1 mmol l⁻¹ DTT, 154 mmol l⁻¹ NaCl, (or CBB containing 10 mmol l⁻¹ EDTA) and diluted to the required absorbance at 620 nm (A₆₂₀). Appropriate concentrations of hevein or buffer were added to the final volume of 800 µl for all samples. After protein supplementation, the A₆₂₀ of each sample was measured every minute for 2 h. Aggregation is recorded by a decreasing A₆₂₀ greater than that observed in the negative control (without protein addition) as the aggregated material collected at the bottom of the assay tube as sedimentation.

Results

Purification and characterisation of protein that inhibits microbial growth

B-serum was fractionated by precipitation of protein with increasing concentrations of acetone, 0–40%, 40–60% and 60–80%. Each fraction was assayed for antimicrobial activity by the broth microdilution method. Only the 60–80% acetone fraction inhibited the growth of the microbes tested as shown by the MIC values (Table 1). *C. albicans* ATCC 90028 was the most sensitive microbe with an MIC 112 µg ml⁻¹ protein but *C. neoformans*, the other fungus tested at this time, was not sensitive at 1.8 mg ml⁻¹. All Gram-negative bacteria tested except the *P. aeruginosa* species had MIC values of 896 µg ml⁻¹ protein. However, the *Pseudomonas* and Gram-positive bacteria were not affected by 1.8 mg ml⁻¹ protein from this fraction. When this 60–80% acetone fraction was tested against 28 clinical isolates of *C. albicans*, the average MIC of those isolates was 91.3 ± 40.45 µg ml⁻¹ and two standard strains of

Table 1 Screening of a crude 60–80% acetone fraction from the *Hevea brasiliensis* against various potential microbial pathogens of the oral cavity and respiratory tract

Microbial	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Gram-negative bacteria	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> A	896
<i>Porphyromonas gingivalis</i> W50	896
<i>Porphyromonas gingivalis</i> 381	896
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	896
<i>Prevotella intermedia</i> 25611	896
<i>Tannerella forsythia</i> ATCC 43037	896
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384	896
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1800
Gram-positive bacteria	
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	>1800
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931	>1800
Fungi	
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	112
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112	>1800
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90113	>1800

Controls were cell suspensions added to broth without hevein.

C. albicans ATCC 10231 and ATCC 90028 had MIC of 56 and 112 $\mu\text{g ml}^{-1}$ respectively. Thus, *C. albicans* ATCC 10231 was used for the rest of the study to identify the active substance during further purification of the 60–80% acetone fraction. This first step using DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography separated a protein with antimicrobial activity. The active fractions were pooled and contained a homogenous protein of 0.3 mg of purified active protein per 1 l of fresh latex. The mass spectrum of the active fraction was determined by MALDI-TOF mass spectrometry and exhibited major peaks corresponding to an M_r value of 4717 Da (data not shown). The N-terminal sequence (11 residues) was analysed and showed 100% similarity to the hevein sequence (Fig. 1) that had been previously reported.¹⁵ Previously, the antifungal activity of hevein had been examined by a hyphal extension-inhibition assay in which it had shown potent antifungal activity against several plant pathogenic fungi.¹⁰ In this study, the antimicrobial activity of hevein was investigated with other ATCC strains of *Candida* spp. including *C. albicans* ATCC 10231 and ATCC 90028, *C. tropicalis*

ATCC 750, ATCC 66029 and ATCC 13803, *C. krusei* ATCC 34135 and ATCC 6258 and *C. glabrata* ATCC 90030 and ATCC 66032. The concentration of protein required for 80% growth inhibition (MIC_{80}) was used as a measure of the inhibitory potency of hevein on these fungi. Hevein was able to inhibit the growth of *C. tropicalis* strains in suspension cultures at as little as 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Although *C. tropicalis* strains were the most sensitive species of *Candida* tested, strains of *C. albicans*, and *C. krusei* were quite sensitive with strains of *C. glabrata* being the least sensitive with MIC values of >190 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 2).

The disk diffusion assay showed inhibition of growth of *C. tropicalis* ATCC 750 (Fig. 3a1) and *C. albicans* ATCC 10231 (Fig. 3a2) by hevein, added to the disc at a concentration of as little as 125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (5 μg per disc). At each concentration, the inhibition zone was bigger with *C. tropicalis* ATCC 750.

An enhancing effect of HPI on the antifungal activity of hevein was also revealed from the clear zone diameter size obtained upon combination with hevein (Fig. 3b). The HPI (at 400 μg) when tested alone showed no antifungal activity as no clear zone could be seen from disc 2. However, when it (at either 200 or 400 μg) was combined with 40 μg of hevein, the clear zone diameter obtained (discs 4 or 5) was significantly bigger than that of the hevein control, disc 3.

The interaction with hevein and *C. tropicalis* ATCC 750 yeast cells was investigated. We performed aggregation experiments using purified hevein. Hevein was added to the diluted yeast cells and the aggregation was tested by measuring changes in absorbance at 620 nm as a function of time. This provided a method for evaluating the interaction of hevein under a variety of conditions. The addition of hevein (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$) resulted in a decrease in absorbance owing to the aggregation of yeast cells to form sediment in the presence of 0.5 mmol l^{-1} CaCl_2 . This effect was inhibited by the addition of 10 mmol l^{-1} EDTA. Binding of hevein to yeast cells is therefore calcium dependent because the addition of EDTA completely inhibited the aggregation (Fig. 4).

Discussion

Hevein was previously shown to have antifungal activity against various plant pathogenic fungi.¹⁰ In our study, this is the first testing of its activity against various commensals and potential pathogens of the oral cavity and respiratory tract. The inhibitory effect of a pure sample obtained by a new procedure, that was far more simple than the previously described methods,¹⁰

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment
hevein      EQCGRQAGGKLCFNNLCCSQWGCSTDEYCSPDHNCQSNCKD 43
unknown    EQCGRQAGGKL----- 11
            *****

```

Figure 1 N-terminal sequence analysis of hevein purified in this study showing that its first 11 residues had 100% identity to hevein previously isolated.¹⁵

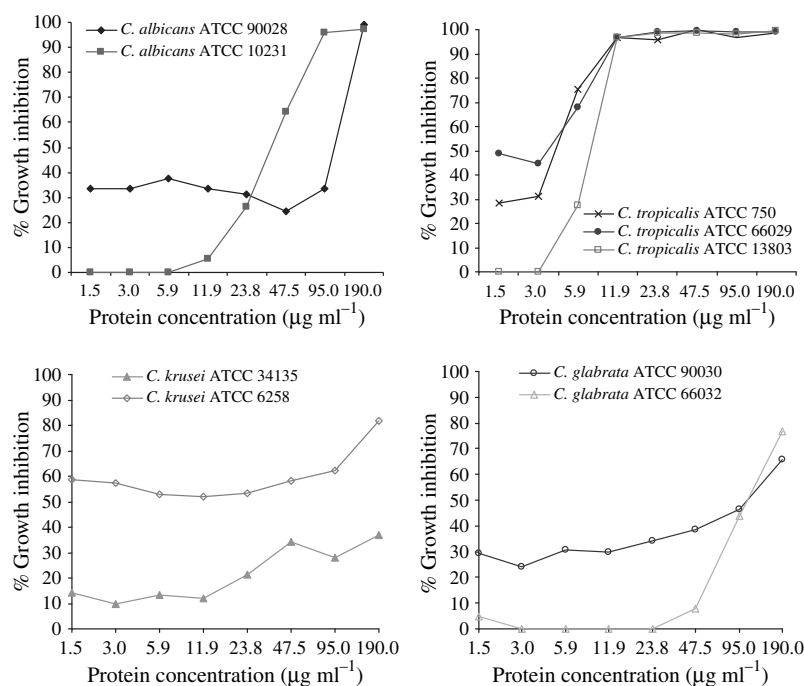


Figure 2 Antimicrobial activity of purified hevein. The percentage of growth inhibition was measured at varying concentrations of hevein with the following test organisms: *Candida albicans* ATCC 90028 (♦), ATCC 10231 (■), *C. tropicalis* ATCC 750 (*), ATCC 66029 (●), ATCC 13803 (□), *C. krusei* ATCC 34135 (▲), ATCC 6258 (◇), *C. glabrata* ATCC 90030 (○), ATCC 66032 (△). The growth inhibition is represented as a percentage of the growth of the control cultures.

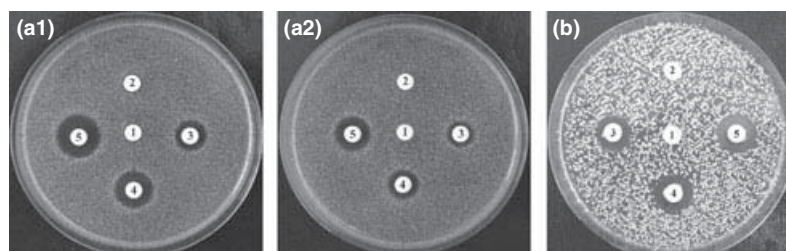


Figure 3 (a) Growth inhibition (clear zone) of hevein against *Candida tropicalis* ATCC 750 (a1) and *C. albicans* ATCC 10231 (a2) and (b) The enhancing effect on antifungal activity of hevein against *C. albicans* ATCC 10231 by Hevea protease inhibitor (HPI). Discs in both A1 and A2 contained 40 µl hevein solution added at different concentration, where disc 1 is the negative control containing 40 µl of 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl buffer, disc 2-5 contained 40 µl of hevein solution at 25, 125, 250, 750 µg ml⁻¹ or 1, 5, 10 and 30 µg per disc respectively. For the discs in C, disc 1, negative control containing 40 µl of 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl buffer; disc 2, 400 µg of HPI; disc 3, 40 µg of hevein; disc 4-5, 40 µg of hevein combined with 200 and 400 µg of HPI respectively.

showed a strong inhibition against *Candida* spp. (MIC range 12–190 µg ml⁻¹) but less for *C. krusei* ATCC 34135 and *C. glabrata* ATCC 90030 with MIC (>190 µg ml⁻¹). It was much less active against oral Gram-negative species (MIC 896 µg ml⁻¹) and inactive against Gram-positive species at concentrations of 1.8 mg ml⁻¹. Hevein is one of the major proteins in luteoids, which are small vacuole-derived organelles.¹⁶ Luteoids contain proteins encoded by defense- or stress-related genes.¹⁷ This indicates that defense is one of the functions of laticifers. Hevein is accumulated more than 10-fold in the latex when compared with the leaf

tissues.¹⁸ The antifungal property of hevein has been investigated against potential human pathogenic fungi including *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. glabrata*. The structural components of the cell wall of these fungi are mainly chitin, (1, 3)-β-D-glucan, (1,6)-β-glucans, lipids, and peptides embedded in a protein matrix.¹⁹ Hevein is a small chitin-binding protein that targets the chitin of the pathogenic fungal cell wall. An estimate of the fungal wall pore size predicts that proteins larger than 15–20 kDa will not pass through the fungal wall.²⁰ Thus, hevein with a molecular size of 4.7 kDa could penetrate the fungal cell wall matrix. As

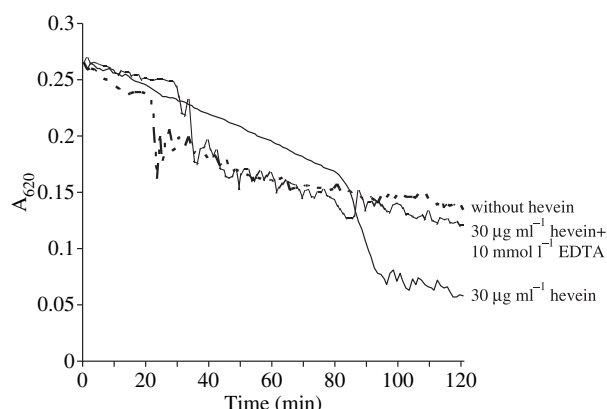


Figure 4 *Candida tropicalis* ATCC 750 aggregated by hevein. Yeast cells were suspended in calcium-containing buer with or without 10 mmol l^{-1} EDTA at room temperature. The suspensions were monitored at absorbance 620 nm (A_{620}) to the appropriate dilution and hevein was added to a final concentration of 30 µg ml^{-1} . Buer was added to the negative control sample. The A_{620} of the suspensions was monitored every minute for 2 h after protein supplement.

can be seen from the aggregation experiment, within 2 h of mixing, hevein caused a Ca^{2+} -dependent aggregation of *C. tropicalis*. Aggregation of the fungal cell was inhibited by EDTA. We assume that aggregation was because of the penetration of hevein through the protein matrix of the cell wall to bind to the chitin embedded in the protein matrix in the presence of Ca^{2+} . This binding then led to a modification of the wall to induce aggregation and finally death of the fungus within 24 h.

Our quantitative analyses of the growth-inhibitory effect of hevein gave some inconsistent results as shown by the broad distribution of MIC obtained against *C. albicans*, ranging from 12 to 95 µg ml^{-1} for strain ATCC 10231 and from 23 to 190 µg ml^{-1} for strain ATCC 90028 using different isolation and testing procedures (data not shown). For the disk diffusion assay, a higher concentration of hevein was required for growth inhibition (Fig. 3). The differences observed could be because of the different times of sample preparation. Different cultivation conditions, different protocols, or the different strains used had effects on the MIC values; for example, the test by the disc diffusion assay yielded higher MIC than those obtained by the broth microdilution method with the same material. This may also reflect different arrangements of the wall components. MIC values are therefore dependent on the choice of protocol.

A protease inhibitor (HPI) has recently been purified and characterised from *Hevea* latex in our laboratory.⁴ The assay of HPI, isolated from an 80% to 95% acetone

fraction of the C-serum, against several proteases, including serine and aspartic proteases, revealed that it inhibited only subtilisin A and trypsin. A protease inhibitor cocktail has been shown to enhance the activity of the antifungal peptides, Mucin MUC7 12-Mer-L and 12-Mer-D Peptides, by preventing them from protease degradation.²¹ It was therefore interesting to see if HPI had any effect on the antifungal activity of the latex hevein peptide. The HPI by itself was found to possess no antifungal activity (Fig. 3b), thus supporting the earlier finding on its ineffectiveness against aspartic protease,⁴ a virulence factor secreted by *C. albicans*.^{22,23} However, it was shown to enhance the antifungal activity of the hevein (Fig. 3b). The HPI may help to prevent hevein degradation by the intracellular proteases produced after the fungi are killed. Hence, it may be possible for the HPI acting as a natural protease inhibitor to be a candidate for inclusion in the protease inhibitor cocktail used to enhance the effectiveness of antifungal peptides in their therapeutic applications.

Candida albicans is part of the normal microbial flora of the human host and can be found in the digestive, oral cavity and vaginal tracts²⁴ and is a major human opportunistic pathogen, causing both mucosal and systemic infections called candidiasis, especially in immunocompromised patients.^{25,26} However, an increased prevalence of candidiasis has been attributed to the widespread use of antibiotics and immunosuppressive agents.²⁷ At present, synthetic antifungal drugs are available for the treatment of *Candida* infections some having very serious side effects to immunocompromised and AIDS patients who suffer from immune dysfunction. In the future, it may be necessary to seek out and test naturally occurring antifungal substances to treat these patients. However, as hevein is a known allergen (Hev b 6.02), its therapeutic application may be limited. Further work will be required to investigate this possibility. Ability to modify the hevein to eliminate its allergenicity without losing its antifungal activity would obviously create more opportunities for the use of this biologically active 'waste protein'.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund, TRF Royal Golden Jubilee – PhD Program and Prince of Songkla University. Dr Hyung J Kim is particularly appreciated for his valuable suggestion concerning mass spectrometry analysis and helpful discussion.

References

- Churngchow N, Suntaro A, Wititsuwannakul R. β -1,3-glucanase isozymes from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 1995; **39**: 505–9.
- Wititsuwannakul D, Chareonthiphakorn N, Mario P, Wititsuwannakul R. Polyphenol oxidases from latex of *Hevea brasiliensis*: purification and characterization. *Phytochemistry* 2002; **61**: 115–21.
- Chareonthiphakorn N, Wititsuwannakul D, Golan-Goldhirsh A, Wititsuwannakul R. Purification and characterization of NAD(P)H quinone reductase from the latex of *Hevea brasiliensis* Müll.-Arg. (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 2002; **61**: 123–8.
- Sritanyarat W, Pearce G, Siems WF, Ryan CA, Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D. Isolation and characterization of isoinhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 2006; **67**: 1644–50.
- D'Auzac J, Jacob JL. The composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm. In: d' Auzac J, Jacob JL, Chrestin H (eds), *Physiology of Rubber Tree Latex*. Florida: CRC Press, 1989: 59–98.
- Kim JS, Kim YO, Ryu HJ, Kwak YS, Lee JY, Kang H. Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant Cell Physiol* 2003; **44**: 412–4.
- Giordani R, Gachon C, Buc J, Regli P, Jacob JL. Antifungal action of *Hevea brasiliensis* latex. Its effect in combination with fluconazole on *Candida albicans* growth. *Mycoses* 1999; **42**: 465–74.
- Giordani R, Regli P, Buc J. Antifungal effect of *Hevea brasiliensis* latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against *Candida albicans*. *Mycoses* 2002; **45**: 476–81.
- Martin MN. The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases/lysozymes. *Plant Physiol* 1991; **95**: 469–76.
- Van Parijs J, Broekaert WF, Goldstein IJ, Peumans WJ. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* 1991; **183**: 258–64.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–54.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M27-A.*, Wayne, PA: NCCLS, 1997.
- Roberts WK, Selitrennikoff CP. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J Gen Microbiol* 1990; **136**: 1771–8.
- Allen MJ, Voelker DR, Mason RJ. Interactions of surfactant protein A and D with *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immunol* 2001; **69**: 2037–44.
- Walujono K, Scholma RA, Beintema JJ, Mariono A, Hahn AM. Amino acid sequence of hevein. In: Rajarao JC (ed.) *Proceedings of International Rubber Conference, Kuala Lumpur, Vol II*. Kuala Lumpur: Rubber Res Inst Malaysia, 1975: 518–31.
- Archer BL, Audley BG, Sweeney GP, Tan CH. Studies on composition of latex serum and 'bottom fraction' particles. *J Rubber Res Inst Malays* 1969; **21**: 560–9.
- Ko JH, Chow KS, Han KH. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol Biol* 2003; **53**: 479–92.
- Kush A, Goyvaerts E, Chye ML, Chua NH. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1787–90.
- Selitrennikoff CP. Antifungal proteins. *Appl Environ Microb* 2001; **67**: 2883–94.
- Money NP. Measurement of pore size in hyphal cell wall of *Achylya bisexualis*. *Exp Mycol* 1990; **14**: 234–42.
- Wei GX, Bobek LA. Human salivary mucin MUC7 12-mer-L and 12-mer-D peptides: antifungal activity in saliva, enhancement of activity with protease inhibitor cocktail or EDTA, and cytotoxicity to human cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2336–42.
- Pichová I, Pavličková L, Dostál J *et al*. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae* Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 2669–77.
- Skrbec D, Romeo D. Inhibition of *Candida albicans* secreted aspartic protease by a novel series of peptidomimetics, also active on the HIV-1 protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **297**: 1350–3.
- Shepherd MG. The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidosis. *New Zealand Dent J* 1986; **82**: 78–81.
- Odds FC. *Candida and Candidosis. A Review and Bibliography*, 2nd edn. London: Baillière Tindall, 1988.
- Odds FC. *Candida species and virulence*. *ASM News* 1994; **60**: 313–8.
- Gadea I, Cuenca M, Gegúndez MI, Zapardiel J, Valero ML, Soriano F. Effect of pH and buffer system on the in-vitro activity of five antifungals against yeasts. *J Antimicrob Chemother* 1997; **39**: 453–9.

Isolation and characterization of isoinhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*

Wannapa Sritanyarat^{a,b,c}, Gregory Pearce^c, William F. Siems^d, Clarence A. Ryan^{c,*}, Rapepun Wititsuwannakul^b, Dhirayos Wititsuwannakul^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

^b Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkla 90112, Thailand

^c Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA 99164-6340, United States

^d Department of Chemistry, Washington State University, Pullman, WA 99164-6340, United States

Received 31 August 2005; received in revised form 31 October 2005

Available online 24 January 2006

Dedicated to Prof. Rod Croteau to celebrate his 60th birthday.

Abstract

Three isoinhibitors have been isolated to homogeneity from the C-serum of the latex of the rubber tree, *Hevea brasiliensis* clone RRIM 600, and named HPI-1, HPI-2a and HPI-2b. The three inhibitors share the same amino acid sequence (69 residues) but the masses of the three forms were determined to be $14,893 \pm 10$, 7757 ± 5 , and 7565 ± 5 , respectively, indicating that post-translational modifications of the protein have occurred during latex collection. One adduct could be removed by reducing agents, and was determined to be glutathione, while the other adduct could not be removed by reducing agents and has not been identified. The N-termini of the inhibitor proteins were blocked by an acetylated Ala, but the complete amino acid sequence analysis of the deblocked inhibitors by Edman degradation of fragments from endopeptidase C digestion and mass spectrometry confirmed that the three isoinhibitors were derived from a single protein. The amino acid sequence of the protein differed at two positions from the sequence deduced from a cDNA reported in GenBank. The gene coding for the inhibitor is wound-inducible and is a member of the potato inhibitor I family of protease inhibitors. The inhibitor strongly inhibited subtilisin A, weakly inhibited trypsin, and did not inhibit chymotrypsin. The amino acid residues at the reactive site P₁ and P'₁ were determined to be Gln45 and Asp46, respectively, residues rarely reported at the reactive site in potato inhibitor I family members. Comparison of amino acid sequences revealed that the HPI isoinhibitors shared from 33% to 55% identity (50–74% similarity) to inhibitors of the potato inhibitor I family. The properties of the isoinhibitors suggest that they may play a defensive role in the latex against pathogens and/or herbivores.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; Euphorbiaceae; Proteinase isoinhibitors; Wounding; Plant defense

1. Introduction

Para rubber trees (*Hevea brasiliensis* from the Euphorbiaceae family) grow in hot humid intertropical regions and are cultivated for their latex, the main source of natural rub-

ber used for many industrial purposes in the world. The physiological roles of latex remain unclear and considering the high-energy cost, it is unknown why plants produce latex. Latex secretion has been hypothesized to be part of the defense system targeted against pest and/or pathogen attacks (Farrell et al., 1991). In latex collection, rubber trees are regularly wounded by a systematic “tapping” procedure, in which the bark is shaved to a thin layer and pretreated with Ethrel[®] or Ethepon[®] (ethylene generators)

* Corresponding authors. Fax: +66 2 248 0375 (D. Wititsuwannakul).
E-mail addresses: cabudryan@hotmail.com (C.A. Ryan), scdwt@mahidol.ac.th (D. Wititsuwannakul).

to stimulate latex production. *Hevea* possesses articulated laticifers at the inner soft zone of the bark that produce the latex (de Fay and Jacob, 1989; Premakumari and Panikkar, 1992). Wounding in the manner described can cause a 10- to 50-fold increase in the expression of stress related genes (Kush et al., 1990). These genes produce the second most abundant transcripts in *Hevea* latex, with transcripts for rubber biosynthesis being the highest (Han et al., 2000; Ko et al., 2003). Defense-related proteins reported to be present in latex include chitinase, β -1,3-glucanase, heveamines, hevein, glucosidase, β -galactosidase, β -N-acetyl-glucosaminidase, polyphenol oxidase, and a protease inhibitor (D'Auzac and Jacob, 1989; Kim et al., 2003). Details on the biochemistry of natural rubber and of latex structure and compositions, including rubber biosynthesis and defense-related proteins have been extensively reviewed (Wititsuwannakul and Wititsuwannakul, 2001). Our recent interest is focused on the protease inhibitor activity that we found to be induced in the latex as a result of tapping. We report here the purification and characterization of three subtilisin A iso inhibitors (HPI) from the latex of *Hevea* that had been repeatedly tapped. These studies revealed that the three iso inhibitors contained an identical amino acid sequence, and that post-translational modifications of the single half-cystine residue with two small organic adducts resulted in the three iso inhibitor types. The iso inhibitors are members of the potato inhibitor I family and may play a defensive role in the latex against pests and/or pathogens.

2. Results

The presence of trypsin inhibitors in the non-rubber fractions of *Hevea* latex was investigated. The non-rubber fractions were separated from the rubber fractions by centrifugation of the latex, and included a clear serum called C-serum and a fluid derived from the luitoid or bottom fraction called B-serum (see Graphical Abstract). The latex of repeatedly tapped rubber trees contains about 3 times higher trypsin inhibitory activity than latex of rubber trees tapped for the first time (Fig. 1), indicating that the latex trypsin inhibitory activity was induced by wounding. Trypsin inhibitory activity was not detected in the B-serum fraction from repeatedly tapped trees.

Trypsin inhibitor activity found in 70–95% acetone fractions of the C-serum comprised over 80% of the total inhibitory activity of the original serum, while 60% of the total trypsin inhibitory activity was in an 80–95% fraction. SDS–PAGE analysis of the proteins present in the 80–95% acetone fraction, revealed the presence of only one major protein band with an estimated M_r of about 7 kDa (Fig. 2). The protein was called *Hevea* protease inhibitor, HPI.

The inhibitory activity in the 80–95% acetone fraction was assayed against several proteases in addition to trypsin, including chymotrypsin, pepsin, papain, subtilisin A,

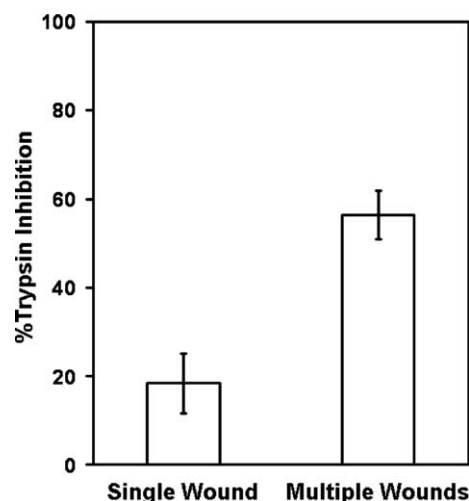


Fig. 1. Inhibition of trypsin activity by the C-serum of fresh latex collected from rubber trees during the first tapping (single wound) and from trees after several days of alternate-day tapping (multiple wounds). Equal amounts of C-serum protein (250 μ g protein) were pre-incubated with 7.5 μ g trypsin for 10 min at 37 °C and the activities assayed as described in Section 4. Data were performed in triplicate. The single wound data are the average from three singly wounded trees.

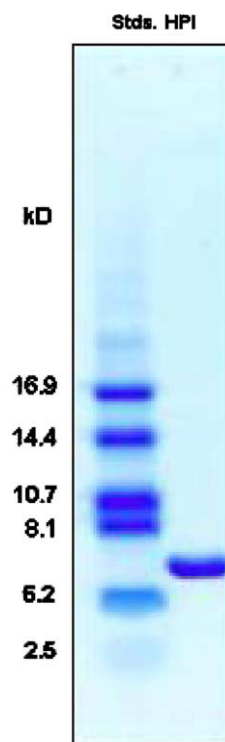


Fig. 2. SDS–PAGE separation of proteins *Hevea* latex C-serum that precipitated at 80–95% acetone. Electrophoresis of 3 μ g HPI in Tricine–SDS–PAGE gels (16.5%).

pronase E, protease type XIII, and thermolysin. Only subtilisin A and trypsin were inhibited, with HPI activity against subtilisin A being 40-fold higher. Therefore, subtilisin A was chosen to assay HPI activity during further investigations.

Sephadex G-75 size-exclusion chromatography of the 80–95% acetone fraction revealed the presence of three components, of which two exhibited inhibitory activity against subtilisin A (Fig. 3). The inhibitory proteins were designated as HPI-1 and HPI-2, respectively.

Proteins in HPI-1 eluted from a C18-HPLC column separation as one major peak along with two minor peaks, and each exhibited inhibitory activity (Fig. 4A). HPI-2 eluted as two peaks, each having inhibitory activity, and were designated HPI-2a and HPI-2b (Fig. 4B). The major component of HPI-1 corresponds to M_r 14,893 $\pm$ 10 (m/z = 14,894, 7449, 4967, and 3725, +1, +2, +3, and +4 ions, respectively). The mass spectrum of HPI-2 exhibited major peaks corresponding to M_r values of 7757 $\pm$ 5 for HPI-2a (m/z = 7758 and 3879, +1 and +2 ions, respectively) and 7565 $\pm$ 5 for HPI-2b (m/z = 7566 and 3785, +1 and +2 ions, respectively). The same m/z values were observed in the spectrum of HPI-1, but as minor components, confirming that HPI-1 contains small amounts of the two proteins HPI-2a and HPI-2b.

Size-exclusion chromatography of HPI-1 on Sephadex G-75 indicated a mass of about 14 kDa, which is twice the M_r estimated by electrophoretic analysis using Tricine-SDS-PAGE under reducing conditions. This indicated that HPI-1 had a monomer molecular mass of approximately 7 kDa. HPI-1 therefore, under oxidizing conditions, was engaged as a disulfide-linked dimer.

The isoelectric points of HPI-2a and HPI-2b, analyzed by isoelectric focusing, were 4.24 and 4.17, respectively.

All three isoinhibitors were fully active after incubation at 90 °C for 2 h. They were also stable between pH 3 and pH 11 when incubated at 37 °C for 24 h.

The inhibitory activities of HPI-1, HPI-2a, and HPI-2b against subtilisin A are shown in Fig. 5. The K_i s for the

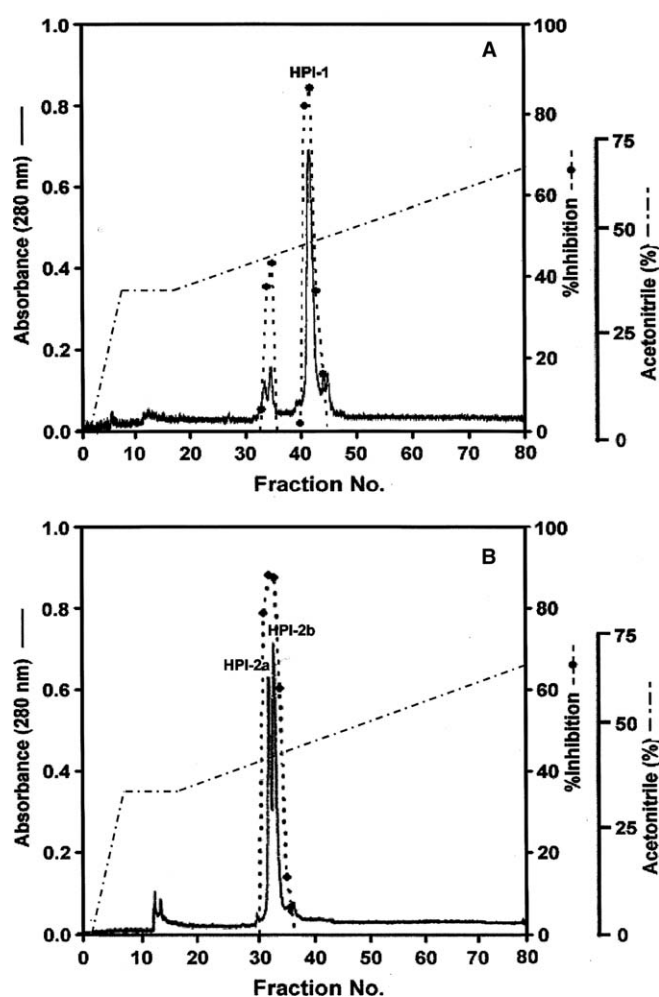


Fig. 4. Separation of (A) HPI-1 and (B) HPI-2 by C18-HPLC. Proteins were eluted with an acetonitrile gradient in 0.1% TFA. The absorbance was recorded at 280 nm and subtilisin A inhibition was assayed as in Fig. 3.

three isoforms toward subtilisin A were estimated to be 0.21, 0.08, and 0.10 nM, respectively.

The N-terminal amino acids of all three isoinhibitors were blocked, precluding sequence analysis on the native proteins. The proteins were reduced and alkylated, and then digested with the endopeptidase Glu-C to obtain fragments for MALDI-MS analysis. The resulting peptides were separated by C18-HPLC and sequenced. Three of the peptide fragments derived from each digestion were determined to have the sequences NANVKAIVVKE, GLPITQDLNFRVRVFVD, and NRVVTQVPAIG, respectively.

To obtain the complete amino acid sequences, the proteins were reduced and subjected to the deblocking enzyme, Ac-DAP, an enzyme that specifically cleaves N-terminal acyl-type blocking groups (such as formyl, acetyl, and myristyl) sequentially releasing amino acids from the N-terminus until it encounters an X-Pro bond. The deblocked N-terminal peptides were sequenced. The amino acid sequences of peptide fragments produced by endopeptidase

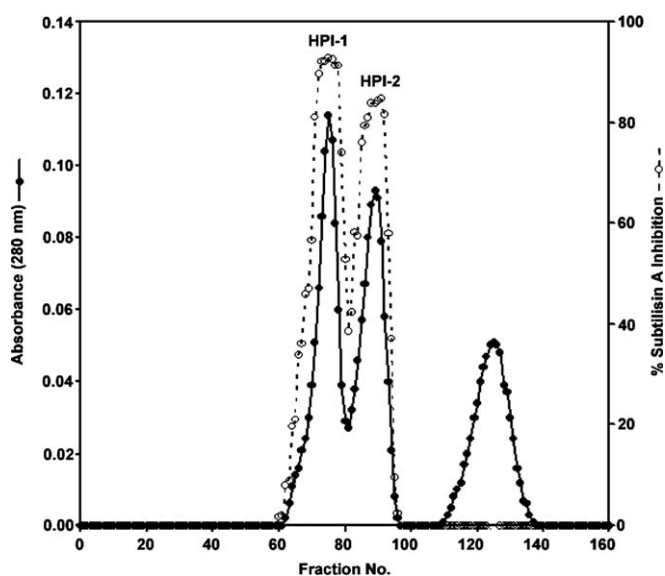


Fig. 3. Chromatography of HPI on Sephadex G-75 in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8. The absorbance of eluting proteins was recorded at 280 nm and subtilisin A inhibition was assayed using azocasein as substrate.

Glu-C and Ac-DAP cleavages from each protein produced the complete sequence that is shown in Fig. 6. This supported the mass spectroscopy data that all three iso-inhibitors were derived from the same protein.

A search of the HPI sequence using the National Center for Biotechnical Information (NCBI) databases (NIH, USA), using the protein–protein BLAST (blastp) program, revealed high sequence homology with a conserved domain of the potato inhibitor I family, pfam00280 (score = 72.2 bits). The amino acid sequence of HPI showed the highest sequence identity with a family member called HbPII (GenBank accession no. AAP46156) that had been identified by ESTs and cDNA-AFLP as a protein from Para rubber tree (*Hevea brasiliensis*) (Han et al., 2000; Ko et al., 2003).

The amino acid sequence of HPI was identical to HbPII except at two residues. At residue 9 an N in HPI replaced D in HbPII, and at residue 10, S replaced A, consistent with the MS/MS data. HPI iso-inhibitors differ from the HbPII in several other respects. All HPI iso-inhibitors have acetyl-Ala at their N-terminus, while HbPII has an N-terminal Met. Isoinhibitor HPI-2a is modified with a small molecule through a disulfide bond and released by reduction. Non-reduced HPI-2a, analyzed by LC/MS, produced a +2 ion with m/z 846.9 ± 0.5 Da, yielding a spectrum consistent with a species having a glutathione molecule linked to the cysteine residue by a disulfide linkage, including fragment ions that specifically relate to the glutathionyl moiety. In contrast to HPI-2a, reduction and alkylation of HPI-2b did not result in a change in its mass spectrum, indicating that the adduct with the cysteine residue was not through a disulfide linkage. LC/MS/MS analyses of HPI-2b yielded an MS/MS spectrum having a cysteine modified or substituted to produce a residue with mass 116 ± 1 Da greater than cysteine itself. This is consistent with the cysteine being alkylated with an adduct with the molecular formula $C_6H_{12}O_2$, although no additional structural information could be gleaned from the MS/MS spectrum.

The reactive site of HPI, analyzed by the amino acid sequences of cleavage products when incubated with subtilisin A at low pH, indicated that the P_1 – P'_1 residues of the reactive site of the HPI for subtilisin A were Gln45–Asp46.

3. Discussion

The tapping system in latex collection involves multiple wounds over a period of weeks that create important entry sites for pests and pathogens. Plants respond to wounding by activating genes that play roles in wound healing and defense (Ryan, 1990; Bowles, 1990; Ryan, 2000; Lawrence and Koundal, 2002; Valueva and Mosolov, 2004). Protease inhibitor proteins are among the defenses induced by wounding, and their defensive role in vegetative tissues and storage organs have been studied in detail in species of the Solanaceae, Leguminosae, Cucurbitaceae, and Graminaceae families (Ryan, 1990; Koiwa et al., 1997;

Mosolov et al., 2001; Mosolov et al., 2004). The consistently higher trypsin inhibitory activity in the C-serum from the latex of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) (Fig. 1) indicated that a wound inducible protease inhibitor was present in the latex. The presence of 60% of the inhibitory activity as a single electrophoretic band in the 80–95% acetone fraction of the C-serum (Fig. 2) facilitated the purification of the inhibitory activity. Although the inhibitory activity present in the latex was originally identified using trypsin inhibitor assays, the inhibitory activity of the C-serum was 40 times higher against subtilisin A than against trypsin.

Three iso-inhibitors of subtilisin A were purified from the protein in the 80–95% acetone fraction of C-serum, (Figs. 3–5) and were named HPI-1 (M_r 14, 893), HPI-2a (M_r 7757), and HPI-2b (M_r 7565). The iso-inhibitors were heat stable, and acidic in charge, and the N-terminal residue of each iso-inhibitor was blocked with an acetylated alanine. All three were powerful inhibitors of subtilisin A, having K_i 's in the high pM range.

The complete amino acid sequences of the three iso-inhibitors were achieved by removing the acetyl groups from the iso-inhibitors with the enzyme Ac-DAP, and producing internal fragments using endopeptidase Glu-C. The amino acid sequences of the three iso-inhibitors were revealed as being identical (Fig. 6), and the differences in the molecular masses determined by mass spectrometry were therefore due to post-translational modifications of a single translation product of 69 amino acids in length that is a member of the potato inhibitor I family. Family members are found widely distributed throughout the plant kingdom, as well as in the leech and common earthworm, indicating that the family has an ancient origin. HPI is the only isolated family member that has a single cysteine.

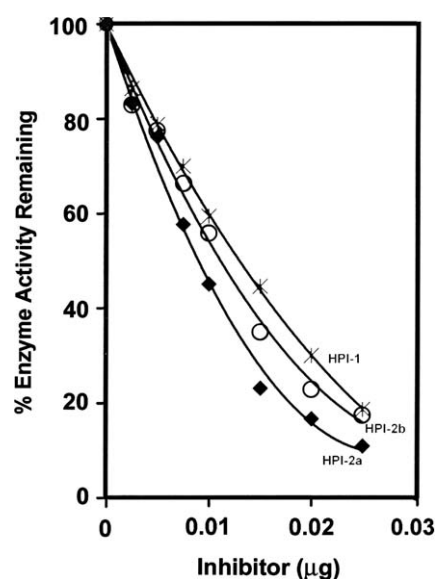


Fig. 5. Inhibition of the three purified iso-inhibitor forms of HPI (HPI-1, HPI-2a, and HPI-2b) by subtilisin A. Each point was performed in triplicate.



Fig. 6. The amino acid sequences of HPI. The peptides sequences of HPI fragments after enzyme digestion with endopeptidase Glu-C (Glu-C) and Pfu *N*-acetyl deblocking aminopeptidase (Ac-DAP) are shown, analyzed by either Edman degradation or MALDI MS. (<) indicates the acetylated N-terminal. Fragments produced by Glu-C digestion and identified by MALDI MS are designated by f_1 , f_2 , f_3 , f_4 , f_4' , and f_5 .

Structural analyses indicated that the single cysteine residue present in the inhibitor was engaged in three interactions. The first being the formation of an intermolecular disulfide bond through the cysteine residue to cause dimerization, which explains the identification of a 14 kDa species (HPI-1). The other two modifications also involved the cysteine residue in a disulfide bond with glutathione (HPI-2a) or by a small unknown adduct of mass 116 ± 1 , in a covalent bond with cysteine that could not be dissociated under reducing conditions (HPI-2b). The post-translational modifications of the nascent polypeptide may have resulted from cross-linking of HPI-1 reduced monomers with itself, with glutathione, and an unknown adduct, in the oxidizing environment of the latex, either before or during its collection from trees.

The inhibitors may be components of the wound-inducible defenses of rubber trees, directed against secreted proteases of pathogens and/or digestive proteases of herbivores. The natural targets of HPI, and the wound signals that regulate its synthesis in *Hevea* latex, remain to be investigated.

4. Experimental

4.1. Materials

Trypsin (bovine pancreas, EC 3.4.21.4), chymotrypsin (bovine pancreas, EC 3.4.21.1), subtilisin A (Carlsberg Type VIII protease from *Bacillus licheniformis*, EC 3.4.21.62), pronase E (*Streptomyces griseus*, EC 3.4.24.31), pepsin (porcin stomach mucosa, EC 3.4.23.1), papain (papaya latex, EC 3.4.22.2), protease type XIII (*Aspergillus saitoi*, EC 3.4.23.18), thermolysin (*Bacillus thermoproteolyticus* rokko, EC 3.4.24.27), casein, azocasein, hemoglobin, benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), *N*-succinyl-alala-pro-phe-*p*-nitroanilide (SAAPF *p*NA), and iodoacetic acid (IAA) were from Sigma (St. Louis, MO). *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) was from Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland, OH). Dithiothreitol

(DTT) was from Pierce (Rockford, IL). Endoproteinase Glu-C (*Staphylococcus aureus*, EC 3.4.21.19) excision grade, was from Calbiochem (La Jolla, CA). *N*-acetyl deblocking aminopeptidase (*Pyrococcus furiosus*) was from Takara Mirus Bio Corporation (Madison, WI).

4.2. Methods

Rubber trees (*Hevea brasiliensis*, RRIM 600 clone), age about 20 years, were grown at Songkhla Rubber Research Center, Hat-Yai, Songkhla, Thailand. The trees were tapped for latex on alternate days. Fresh latex was collected in ice-chilled plastic cups, pooled and separated on the same day as collected. The pooled latex was sieved through cheesecloth to remove small particles and centrifuged (Beckman Model JA 2-21, Beckman Coulter, Fullerton, CA) at 5000g for 15 min at 4 °C. The latex separated into 3 layers; the top white zone containing rubber, a middle milky aqueous center layer called C-serum, and the sediment bottom layer containing luteoid particles. The C-serum was further subjected to ultracentrifugation (Beckman Model L8-70 M ultracentrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, CA) at 59,000g for 45 min at 4 °C, and the supernatant containing the C-serum was collected and used for protease inhibitor purification. C-serum proteins were fractionated step-wise by the addition of acetone in increments of 0–50%, 50–70%, 70–80% and 80–95%. Each fraction was centrifuged at 59,000g, resuspended in distilled water, and assayed for trypsin inhibitory activity.

Amino acid sequencing from the N-terminus was performed on an Applied Biosystems (Foster City, CA) Pro-cise Model 492 protein sequencer using Edman chemistry.

HPI-2a and HPI-2b were assayed for temperature stability in 50 mM citrate buffer, pH 6.

The reactive-site of the HPI with subtilisin A was identified by the methods of Finkenshtadt and Laskowski, 1965. HPI (2 nmol) was incubated with 1% mol of subtilisin A in the solution of 0.5 M KCl and 0.05 M CaCl₂, pH 3.75 for 24 h at room temperature. After incubation, the reaction mixture was subjected to amino acid sequence analysis.

SDS-PAGE was performed according to the modified method of Laemmli (1970), using a 7–15% linear gradient of acrylamide, a 4% stacking gel and protein standards from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). After electrophoresis, proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, St. Louis, MO). Tricine-SDS-PAGE (polyacrylamide gel, 16.5%) was prepared using the method as described by Schägger and von Jagow (1987). Isoelectric focusing was performed with a BIO-RAD minigel IEF apparatus (Model 111 Mini IEF Cell, Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions.

Protease inhibitory activity against trypsin and subtilisin A were assayed using azocasein as substrate. Aliquots from fractions were pre-incubated for 10 min at 37 °C with subtilisin A in a total volume of 300 μ L containing 50 mM Tris-HCl pH 8.8. The assays were initiated by the addition of

200 μL substrate solution (1% (w/v) azocasein), further incubated for 20 min at 37 °C, and 235 μL of trichloroacetic acid (TCA, 20% w/v) was added to terminate the reaction. After 20 min at room temperature, the mixture was centrifuged at 10,000g for 10 min and the absorbance of the supernatant was measured at 335 nm. One unit of subtilisin A inhibitory activity was defined as the amount of inhibitor which decreases the absorbance at 335 nm by 0.1 OD when compared to a control solution lacking inhibitory activity. Activity assays against trypsin, chymotrypsin, pronase E and subtilisin A were measured as follows; aliquots of inhibitor-containing solutions were pre-incubated for 2 min with the appropriate enzyme in a total volume of 50 μL of appropriate buffer (see below) and the reaction was initiated by adding 500 μL substrate and adjusted to a final volume of 1 mL with buffer. The change in absorbance was recorded every minute for 5 min with a Hitachi Model U-2000 spectrophotometer. Trypsin and pronase E were assayed at pH 8.1 in 46 mM Tris–HCl, 11.5 mM CaCl_2 with the substrate BAPNA by a modified procedure based on the methods of Erlanger et al. (1961); Hummel (1959). Chymotrypsin was assayed at pH 7.8 in 80 mM Tris–HCl, 100 mM CaCl_2 with the substrate BTEE as described by Hummel (1959). Subtilisin A was assayed at pH 8.8 in 50 mM Tris–HCl, 5 mM CaCl_2 with *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (SAAPF pNA) as substrate by the method of Pekkarinen et al. (2002). Thermolysin and papain were assayed using casein as substrate (Eguchi and Yamashita, 1987; Shivaraj and Pattabiraman, 1981). Papain assays was carried out using 100 mM phosphate buffer, pH 6, with 0.38 mM EDTA and 1.9 mM cysteine-HCl. Pepsin and *Aspergillus* protease were assayed according to the Anson method (1938), using hemoglobin as substrate.

Purified inhibitors were reduced and alkylated using the method described by Pearce et al. (2001). The reduced and alkylated inhibitors were separated from the unreacted reagents prior to cleavage with enzymes by using ZipTip_{C18} pipette tips containing C18 reversed-phase media (Millipore, Bedford, MA, USA), concentrated using a Speed Vac concentrator and then subjected to MALDI mass spectrometry analysis.

MALDI spectra were obtained using a PerSeptive Biosystems Voyager DE/RP time-of-flight mass spectrometer equipped with a nitrogen laser (337 nm) (Framington, MA). Dried-droplet samples were prepared using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix, and spectra were acquired as averages of 256 laser shots with the laser fluency set approximately 20% above threshold. For LC/MS/MS analyses of peptide mixtures, samples separated with an LC Packings Ultimate Capillary LC system (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) were analyzed in data-dependant mode with a Bruker Daltonics (Billerica, MA) HCT ion trap with nanospray electrospray ionization (ESI). Aliquots of 5 μL were injected onto a 150 μm i.d. $\times$ 5 mm C18 packed capillary column (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA) and eluted with a 60 min gradient of 0–100% methanol/0.1% trifluoroacetic acid.

Reduced and alkylated of each isoinhibitor (25 μg) were incubated with endopeptidase Glu-C (2.5 μg) in 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8, at 37 °C overnight to fragment the protein. The reaction was terminated by adding 1 μL TFA and dried in vacuo to remove ammonium bicarbonate and TFA. The dried fractions were dissolved in water, concentrated to small volumes and then subjected to mass spectroscopic analyses.

The internally calibrated positive ion MALDI-MS spectrum of the endopeptidase Glu-C digests exhibited peaks with m/z values within ± 0.1 Da of the predicted singly charged ions of fragments f_3 , f_4 , and f_5 of the EST (1184.7, 2232.2, and 1153.7 Da, respectively), while the negative ion spectrum exhibited a peak within ± 0.1 Da of the m/z expected for f_2 (1569.8 Da). The positive ion spectrum also showed a strong peak at m/z 1507.8 ± 0.1 Da, matching the mass expected for the fragment $f'_4 = \text{LNFNRVRFVDE}$, which was obtained by endopeptidase Glu-C cleavage at an aspartate residue. Numerous other peaks of moderate intensity were observed in the positive ion spectrum of the endopeptidase Glu-C digest, but even though the f_1 fragment of the EST contains a basic residue and is therefore expected to appear in the MALDI spectrum, none of the observed m/z values matched the m/z predicted for f_1 .

The endopeptidase Glu-C digest of purified HPI-2a included a prominent +2-charged peak of m/z 723.8 ± 0.5 Da at retention time 27.3 min. MS/MS spectra of this 723.8 Da +2 parent showed strong and interpretable series of b and y ions, containing the N and C termini, respectively, of a peptide tentatively interpreted to be Ac-ASQC*PVKNSWPE, where Ac-indicates N-terminal acetylation, and C* is the alkylation product of the SH group by iodoacetic acid.

N-acetyl deblocking aminopeptidase (Ac-DAP) was used to remove N-terminal acetyl groups from the inhibitor protein. Cleavage by Ac-DAP was performed according to the manufacturer's instruction (Takara Bio Inc, Shiga, Japan). The enzyme (25 μg) was added to the reduced and alkylated inhibitors (25 μg) in 50 mM *N*-ethylmorpholine-AcOH, 0.1 mM CaCl_2 , pH 8.0 and incubated at 50 °C for 24 h. The reaction was terminated by adding 50% formic acid to a final concentration of 5% and the protein were subjected to amino acid sequence analyses.

Acknowledgements

Supported in part by Washington State University College of Agriculture, Human, and Natural Resource Science, National Science Foundation (Grant No. IBN-0090766), the Charlotte Y. Martin Foundation, the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee-Ph.D. Program (Grant No. PHD/0131/2543), a Thesis Grant, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, and the Thailand Research Fund Senior Scholar for 2002–2007. The authors thank Gerhard Munske for peptide sequence analysis.

References

- Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22, 79–89.
- Bowles, D.J., 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 873–907.
- D'Auzac, J., Jacob, J.L., 1989. The composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm. In: d' Auzac, J., Jacob, J.L., Chrestin, H. (Eds.), *Physiology of Rubber Tree Latex*. CRC Press, Florida, pp. 59–98.
- de Fay, E., Jacob, J.L., 1989. Anatomical organization of the laticiferous system in the bark. In: d' Auzac, J., Jacob, J.L., Chrestin, H. (Eds.), *Physiology of Rubber Tree latex*. CRC Press, Florida, pp. 3–14.
- Eguchi, M., Yamashita, M., 1987. Comparison of six genetically defined inhibitors from the silkworm haemolymph against fungal protease. *Comp. Biochem. Physiol. B* 86, 201–208.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271–278.
- Farrell, B.D., Dessourd, D.E., Mitter, C., 1991. Escalation of plant defenses: do latex and resin canals spur plant diversification? *Am. Nat.* 138, 881–900.
- Finkstadt, W.R., Laskowski Jr., M., 1965. Peptide bond cleavage on trypsin–trypsin inhibitor complex formation. *J. Biol. Chem.* 240, 962–963.
- Han, K.H., Shin, D.H., Yang, J., Kim, I.J., Oh, S.K., Chow, K.S., 2000. Genes expressed in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Tree Physiol.* 20, 503–510.
- Hummel, B.C.W.A., 1959. Modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 1393–1399.
- Kim, J.S., Kim, Y.O., Ryu, H.J., Kwak, Y.S., Lee, J.Y., Kang, H., 2003. Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant Cell Physiol.* 44, 412–414.
- Ko, J.H., Chow, K.S., Han, K.H., 2003. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol. Biol.* 53, 479–492.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.* 2, 379–384.
- Kush, A., Goyvaerts, E., Chye, M.L., Chua, N.H., 1990. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87, 1787–1790.
- Laemmli, UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R., 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *J. Biotechnol.* 5, 93–109.
- Mosolov, V.V., Grigor'eva, L.I., Valueva, T.A., 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. *Appl. Biochem. Micro.* 37, 115–213 (Review).
- Mosolov, V.V., Grigor'eva, L.I., Valueva, T.A., 2004. Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins. *App. Biochem. Micro.* 37, 545–551 (Review).
- Pearce, G., Moura, D.S., Stratmann, J., Ryan Jr., C.A., 2001. RALF, A 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 98, 12843–12847.
- Pekkarinen, A.I., Jones, B.L., Niku-Paavola, M.L., 2002. Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Biochem.* 269, 798–807.
- Premakumari, D., Panikkar, A.O.N., 1992. Anatomy and ultracytology of latex vessels. In: Sethuraj, M.R., Mathew, N.M. (Eds.), *Developments in Crop Science, Natural Rubber: Biology, Cultivation and Technology*, vol. 23. Elsevier, The Netherlands, pp. 67–87.
- Ryan, C.A., 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425–449.
- Ryan, C.A., 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 112–121.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Shivaraj, B., Pattabiraman, T.N., 1981. Natural plant enzyme inhibitors: characterization of an unusual α -amylase/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana* Gaertn.). *Biochem. J.* 193, 29–36.
- Valueva, T.A., Mosolov, V.V., 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 69, 1305–1309.
- Wititsuwannakul, D., Wititsuwannakul, R., 2001. Biochemistry of natural rubber and structure of latex. In: Koyama, T., Steinbuchel, A. (Eds.), *Biopolymers, Polyisoprenoids*, vol. 2. Wiley–VCH, Germany, pp. 151–201.

รายงาน

พ.ศ. 17/49

รหัส 03-12-48

การทดสอบการก่อความระคายเคืองของ #1RW ต่อผิวหนังกระต่าย



ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม วิทยาเขต หาดใหญ่

โดย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ธันวาคม 2548

ผลการสอบเทียบนี้รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบเทียบเท่านั้น
ห้ามนำผลการสอบเทียบไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

รายงาน

เรื่อง : การทดสอบการก่อความระคายเคืองของ # 1RW ต่อผิวหนังกระต่าย
ชนิดตัวอย่างทดสอบ : สารสกัด
ลักษณะตัวอย่างทดสอบ : ของเหลวหนืด-ข้นสีเหลือง และมีกลิ่นเฉพาะตัว
เลขที่คำขอบริการ : ผกผ. 17/49, รหัส 03-12-48
ผู้ขอบริการ : ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่
วันที่ได้รับตัวอย่างทดสอบ : 22 ตุลาคม พ.ศ. 2548
วันที่ทำการทดสอบ : 6 - 10 ธันวาคม พ.ศ. 2548
การทดสอบเลขที่ : P 059/2005
วิธีการทดสอบ : วิธีทดสอบหมายเลข 404 : การทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนัง
ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 2001.

สรุปผลการทดสอบ

การทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ #1RW ตามวิธีทดสอบหมายเลข 404 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2001) โดยใช้ # 1RW ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปิดลงบนผิวหนังกระต่ายนาน 4 ชั่วโมงแล้วล้างออก สังเกตความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายติดต่อกัน 3 วัน

ผลการทดสอบ ตรวจไม่พบอาการแดงและอาการบวมของผิวหนังกระต่าย

ศิลาณ เกษมทอง

เตือนดา เตมาทอง, คบ. (วิทยาศาสตร์ทั่วไป)

ผู้ปฏิบัติการทดสอบ

วิภากร พัฒน์เวช

วิภากร พัฒน์เวช, วท.ม. (พืชวิทยา)

ผู้ประเมินผลการทดสอบ

ประไพภัทร คลังทรัพย์

ประไพภัทร คลังทรัพย์, Ph.D. (Mol Bio)

หัวหน้าด้านวิชาการ

สุวิรัตน์ บรรจงลิขิตกุล

สุวิรัตน์ บรรจงลิขิตกุล, Ph.D. (PharmS)

ผู้จัดการด้านคุณภาพ

ทอติภรณ์ อัครธรรมชาติ

ทอติภรณ์ อัครธรรมชาติ, ภว.

ผู้อำนวยการฝ่ายเภสัชภัณฑ์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ผู้รับรอง

วันที่ 26 มิ.ย. 2548

ผลการสอบเทียบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบเทียบเท่านั้น
ห้ามนำผลการสอบเทียบไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

การทดสอบการก่อความระคายเคืองของ "#1RW" ต่อผิวหนังกระต่าย

1. วัสดุและอุปกรณ์

- 1.1 ตัวอย่างทดสอบ : "#1RW" มีลักษณะเป็นครีมสีเหลืองมีกลิ่นเฉพาะตัว ได้รับจาก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เมื่อวันที่ 6 ธันวาคม 2548
- 1.2 สัตว์ทดลอง : กระต่ายสีขาวพันธุ์นิวซีแลนด์ไวกิงผสม ชื่อจากภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ น้ำหนักตัวประมาณ 2-3 กิโลกรัม
- 1.3 อาหารกระต่าย บริษัทโมคกันท์อาหารสัตว์ จำกัด
- 1.4 น้ำดื่ม ใช้น้ำกรอง
- 1.5 patch หมายถึง ผ้าพันแผลมาตรฐานขนาด 2.5 เซนติเมตร x 2.5 เซนติเมตร ทบซ้อนกัน 10 ชั้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีอบโดยใช้แรงดันไอน้ำ
- 1.6 Autoclave, รุ่น SS-320, Tomy Limited, ประเทศญี่ปุ่น
- 1.7 ปัดตาเลียนไฟฟ้า Wahl Clipper Corp., Sterling, Illinois, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.8 พลาสเตอร์ Leukoplast porous BDF Intanin Co., Ltd., ประเทศไทย
- 1.9 Transpore™ บริษัท สามเอ็ม ประเทศไทย จำกัด
- 1.10 ผ้ายัด (Pack and Grand, CCN Co., Ltd., ประเทศไทย)
- 1.11 อื่นๆ เช่น สำลี, น้ำกลั่น
- 1.12 เครื่องชั่ง OHAUS รุ่น E 02140, Switzerland

2. วิธีการทดสอบ

ใช้วิธีการทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ OECD, 2001

นำกระต่าย 3 ตัวมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสถานที่ ก่อนทำการทดสอบ 1 วัน โคนขนบริเวณลำตัวใต้หัวไหล่ขีดกระดุกสันหลังทั้งสองข้างเป็นบริเวณ 10 เซนติเมตร x 10 เซนติเมตร ด้วยปัตตาเลียนไฟฟ้าให้ขนสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้แต่ไม่ให้ผิวหนังเป็นแผล ปิด patch ที่เกลี่ยด้วย "#1RW" ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และปิดลงบนผิวหนังกระต่ายด้านหนึ่งที่โคนขนเตรียมไว้ (บริเวณทดสอบ) ส่วนอีกด้านหนึ่งของกระต่ายตัวเดิมปิดด้วย patch ที่เกลี่ยด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อเป็นบริเวณควบคุม ยึด patch ด้วยพลาสเตอร์ชนิด Transpore ห่อลำตัวกระต่าย ด้วยผ้ายัด เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุดเมื่อ

ผลการสอบเทียบนี้รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบเทียบเท่านั้น
ห้ามนำผลการสอบเทียบไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

ครบ 4 ชั่วโมง เปิด patch ออก แล้วใช้ผ้าชุบน้ำอุ่นเช็ดเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างทดสอบที่เหลือค้างอยู่บนผิวหนังหลุดออก
 ตรวจสอบอาการแดงและอาการบวมตรงบริเวณทดสอบ ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และถ้าพบว่ายังมีอาการแดง และ
 อาการบวมอยู่ให้ตรวจสอบอาการต่อจนถึงวันที่ 14 การให้คะแนนยึดตามหลักเกณฑ์ดังนี้

หลักเกณฑ์การให้คะแนน

อาการแดง

- ไม่แดง
- แดงเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้
- แดงจนมองเห็นได้ชัด
- แดงปานกลางถึงแดงมาก
- แดงซ้ำถึงผิวหนังตลอกเกิด

คะแนน

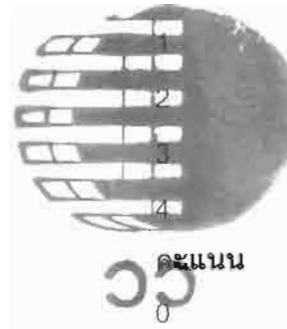
0

1

2

3

4



อาการบวม

- ไม่บวม
- บวมเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้
- บวมน้อย (ขอบนูนเห็นได้ชัดเจน)
- บวมปานกลาง (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร)
- บวมมาก (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร และลามออกไป)

คะแนน

0

1

2

3

4

ผลการสอบเทียบรับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบเทียบเท่านั้น
 ห้ามนำผลการสอบเทียบไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

3. ผลการทดสอบ

จากการสังเกตผิวหนังกระต่ายภายหลังจากล้างตัวอย่างทดสอบออกที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่พบอาการแดงและอาการบวมต่อผิวหนังกระต่าย

ตารางที่ 1 แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับน้ำกลั่น (บริเวณควบคุม) และ ตารางที่ 2 แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับตัวอย่างทดสอบ (บริเวณทดสอบ)

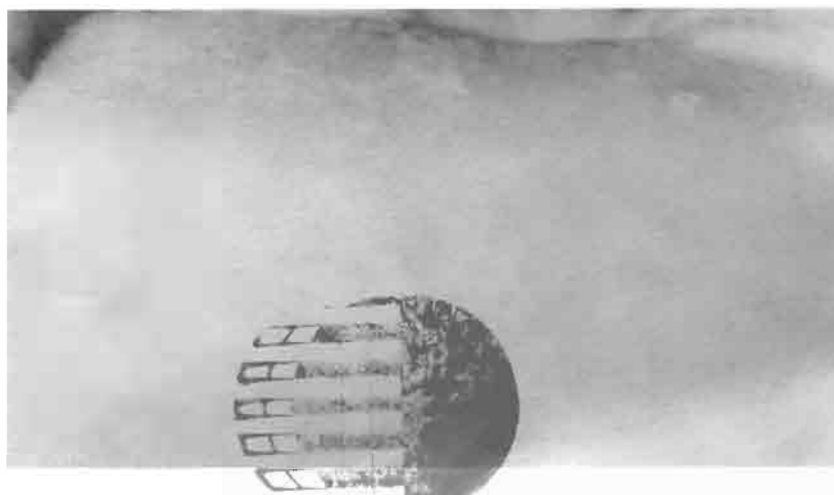
ตารางที่ 1 แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับน้ำกลั่น (บริเวณควบคุม)

กระต่าย ตัวที่	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม
87	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 2. แสดงคะแนนความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับตัวอย่างทดสอบ (บริเวณทดสอบ)

กระต่าย ตัวที่	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
	1		24		48		72	
	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม
87	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0	0	0	0

ผลการสอบเทียบนี้รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบเทียบเท่านั้น
ห้ามนำผลการสอบเทียบไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.



รูปที่ 1 แสดงผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับน้ำกลั่น (บริเวณควบคุม) ตรวจไม่พบ
อาการแดงและอาการบวมของผิวหนัง



รูปที่ 2 แสดงภาพผิวหนังกระต่ายบริเวณที่ได้รับตัวอย่างทดสอบ #1RW (บริเวณทดสอบ)
ตรวจไม่พบอาการแดงและอาการบวมของผิวหนัง

ผลการสอบเทียบนี้รับรองผลเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบเทียบเท่านั้น
ห้ามนำผลการสอบเทียบไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.

4. สรุปผลการทดสอบ

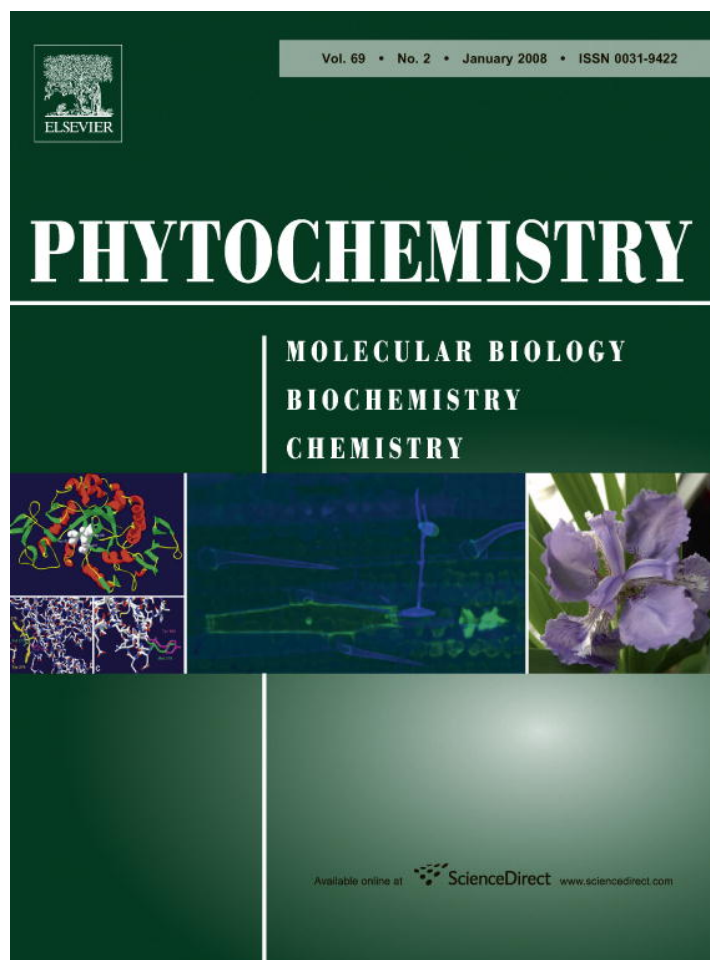
การทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ #1RW ตามวิธีทดสอบหมายเลข 404 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2001) โดยใช้ #1RW 0.5 มิลลิลิตร ปิดลงบนผิวหนังกระต่ายนาน 4 ชั่วโมง แล้วล้างออก สังเกตความผิดปกติของผิวหนังกระต่ายติดต่อกัน 3 วัน

ผลการทดสอบ ตรวจไม่พบอาการแดงและบวมของผิวหนังกระต่าย

5. เอกสารอ้างอิง

- 1 Organization for Economic Co-operation and Development. 2001. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects, 404. Acute Dermal Irritation / Corrosion.

ผลการสอบเทียบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ได้ทำการสอบเทียบเท่านั้น
ห้ามนำผลการสอบเทียบไปโฆษณาโดยมิได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจาก วว.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation [☆]

Rapepun Wititsuwannakul ^{a,*}, Piyaporn Pasitkul ^{a,b}, Kamonwan Kanokwiroon ^a,
Dhirayos Wititsuwannakul ^c

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla 90000, Thailand

^c Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Received 10 February 2007; received in revised form 1 July 2007

Available online 25 September 2007

Abstract

An *in vitro* aggregation of washed lutoid membrane and rubber particles, respectively, prepared from the bottom (lutoid) fraction and rubber layer of centrifuged fresh latex, leading to the formation of rubber coagulum necessary for a latex coagulation was demonstrated. A Triton X-100 extract of washed lutoid membrane proteins, isolated and prepared from the bottom fraction of centrifuged fresh latex was examined for its role in the latex coagulation process. It induced agglutination of rabbit erythrocytes, indicating the presence of a lectin-like protein. *Hevea* latex lectin-like protein (HLL) was purified to homogeneity by active chitin binding separation, followed by DEAE-Sephadex chromatography. Its M_r analyzed by SDS–PAGE was 17 kDa, whereas that determined by gel filtration was 267 kDa. The HLL had a pI value of 7.2. Several glycoproteins were shown to inhibit the HLL-induced hemagglutination. The hemagglutinin activity of HLL was enhanced by Ca^{2+} . Of most interest was the finding that HLL strongly induced aggregation of the *Hevea* latex rubber particles (RP). This strong RP aggregation leads to latex coagulation, indicating the possibility that it is involved in the formation of the coagulum that plugs the latex vessel ends and stops the flow of latex upon tapping. In addition, the purified HLL also induced aggregation of RP taken from several other non-*Hevea* latex producing plants. This might indicate either a common or universal role of this lectin-like protein in RP aggregation and hence latex coagulation. This paper, for the first time, provides clear and unequivocal evidence for either a key biological role or physiological function of an endogenous latex lectin-like protein in the sequential process of latex coagulation.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; Euphorbiaceae; Rubber latex; Lectin; Agglutinin; Rubber particle; Latex coagulation

1. Introduction

Protein–carbohydrate interactions play a major role in establishing the specificities of a wide range of biological

recognition and communication events. A class of carbohydrate binding proteins, called lectins, have been isolated from a wide variety of natural sources including plants, fungi, bacteria, viruses, algae and body fluid, as well as cell membranes of vertebrates (Goldstein and Hayes, 1978; Goldstein and Poretz, 1986; Lis and Sharon, 1986). Lectins in animal systems have been implicated as a direct first-line defence against pathogens, cell trafficking, immune regulation and prevention of autoimmunity (Hauri et al., 2000; Kilpatrick, 2002). The biological function of plant lectins is, nevertheless, still unclear although diverse roles that include enzymatic activity, storage proteins, cell wall

Abbreviations: RP, rubber particle; HLL, *Hevea* latex lectin-like protein; HBL, *Hevea* bark lectin; HA, hemagglutination activity.

[☆] Part 1 in the series ‘Proteins specifically involved in *Hevea* rubber particle aggregation and latex coagulation’.

* Corresponding author. Tel.: +66 74 219 065; fax: +66 74 446 656.

E-mail addresses: wrapepun@yahoo.com, rapepun.w@psu.ac.th (R. Wititsuwannakul).

extension, transport of carbohydrate, mitogenic stimulation, as well as plant defense mechanism have been suggested (Etzler, 1985; Chrispeels and Raikhel, 1991; Van Damme et al., 1998). There has been almost no evidence to indicate the occurrence of plant lectins that recognize and bind 'endogenous' glycoconjugates or ligands, and are therefore probably involved in recognition mechanisms within the organism itself.

The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is one of the world's most frequently wounded plants. The tree is regularly tapped by means of bark stripping, for collecting rubber latex, throughout its economic lifespan. Freshly tapped latex is in fact a living cytoplasm in which the rubber particles and non-rubber particles such as lutoids and Frey–Wyssling, particles as well as other cell components are dispersed in an aqueous phase of the cytosol (Moir, 1959; Dickenson, 1969). The rubber latex is largely formed and stored in the rings of anastomosing laticifers in the inner bark area. This allows draining of the latex from a large area after tapping (Zhao, 1987). A process leading to rubber latex coagulation at the severed vessel ends was suggested to take place immediately after tapping (Boatman, 1966). The progressive plugging of latex vessels during the course of the latex flow, following tapping, restricts the quantity of latex exuded and is thus an important limiting factor of yield output per tapping (Milford et al., 1969). The plugging of latex vessels is vital for the rubber tree in preventing the loss of its metabolites and entry of pathogens to the phloem. Various hypotheses have been proposed to explain the mechanism of plugging, many of which have emphasized a role for the damaged vacuolar lutoids (Southorn, 1969; Southorn and Edwin, 1968). Both damaged lutoids and rubber particles were found to be associated in a cap of rubber coagulum formed over the severed vessels (Southorn, 1968). A similar *in vitro* aggregation of ruptured lutoids and rubber particles that resulted in the formation of a rubber coagulum had also been demonstrated in ultracentrifuged fresh field-latex upon pro-

longed storage (Wititsuwannakul et al., 2004). A soluble protein inside the lutoid bodies, known as hevein, has also been shown to mediate rubber particle aggregation in a lectin like manner (Gidrol et al., 1994). This type of aggregation is not directly related to the association observed between lutoid membrane debris and rubber particles. It is the intention of this paper to investigate the presence of a latex protein on the lutoid membrane that could act like a lectin and induce aggregation of rubber particles to form a rubber latex coagulum.

2. Results and discussion

In this report, we demonstrate an *in vitro* aggregation of washed lutoid membrane and rubber particles giving rise to a rubber coagulum in a latex coagulation. Biochemical studies on a *Hevea* latex lectin-like protein derived from the lutoid membrane isolated from the bottom fraction of the centrifuged fresh latex are described. The role and function of the intrinsic latex lectin-like protein and its involvement in the latex coagulation process was established.

2.1. *In vitro* aggregation of lutoid membrane and rubber particles

The bottom (lutoid) particles in a centrifuged fresh latex, comprising around 20% or more of the latex volume, had previously been shown to be either unstable or disappeared upon prolonged storage of the fresh latex. The membrane debris from disrupted bottom particles was shown to be associated with rubber particles as a puffy upper rubber phase in the destabilized latex (Wititsuwannakul et al., 2004). Washed lutoid membranes and rubber particles, prepared from centrifuged fresh latex, were also observed to undergo an *in vitro* aggregation (Fig. 1). After incubating washed lutoid membranes with a rubber particle suspensions for 30 min, the membranes

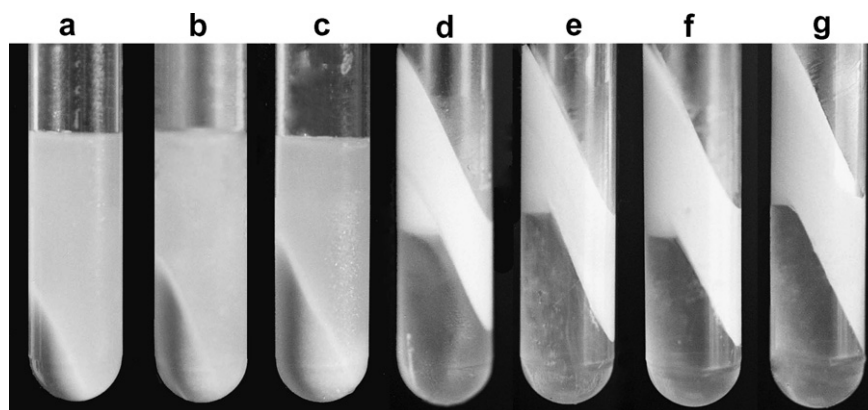


Fig. 1. Ultracentrifugation of suspensions, 6 ml each, containing washed lutoid membrane (a–c), washed rubber particles (d) and their mixtures (e–g). Tubes a, b and c: control washed lutoid membrane suspensions with total protein contents of 24, 48 and 72 mg and dry weight contents of 0.13, 0.26 and 0.39 g, respectively; Tube D: control rubber particle suspension with total protein content of 1.28 g and dry weight content of 2.42 g. Tubes e, f and g: a + d, b + d and c + d mixtures, respectively.

had completely disappeared from the bottom fraction and were found to be associated with the top rubber layer upon centrifugation. The increase in the size of the rubber layer was directly proportional to the amount of the washed lutoid membrane debris added to the incubation mixtures. (Fig. 1, tubes e–g). A direct involvement of lutoid membranes in rubber coagulum formation and latex coagulation was thus demonstrated. Although the lutoid membranes have always been implicated in the latex coagulation process, until now, with these findings, their role has neither been known nor well understood (Southorn, 1968, 1969a; Southorn and Edwin, 1968). Our current working hypothesis is that the latex coagulation process is based on a biologically specific recognition and interaction. We have therefore isolated a *Hevea* latex lectin-like protein from the lutoid membrane and investigated its properties.

2.2. Purification of *Hevea* latex lectin-like protein (HLL)

The HLL was extracted with Triton X-100 from the membranes of a washed lutoid particle sediment in the bottom fraction of the centrifuged fresh latex for purification and characterization of its properties. A Triton X-100 extract of the washed lutoid membrane proteins agglutinated erythrocytes from rabbits and mice, but had no activity with human erythrocytes of any blood group. The erythrocyte specificity of the lectin-like protein found in *Hevea* latex was in accordance with the property reported for the lectin from the latex of *Euphorbia marginata* (Stripe et al., 1993). Triton-X (0.2%) was as effective in solubilizing HLL from the vacuolar lutoid membrane as was the detergent previously employed for extracting lectin associated with the vacuolar membrane (Heyen et al., 2002). Triton-X was removed from the membrane protein extract using SM-2 beads prior to any further purification steps. HLL was found to have a high affinity for binding to chitin and was thus easily separated from other proteins. Triton-X was also found to effectively elute HLL after batch binding to chitin. A further chromatographic purification step for HLL with a DEAE-Sephacel column was also effective using Triton-X for elution (Fig. 2), as most of the hemagglutination activity (HA) was recovered. Hydrophobic regions of the HLL are implicated in playing a major role in the binding interactions with both the chitin and Sepharose matrices as indicated by the efficiency of the Triton-X elution protocols presented above.

2.3. Characterization of the purified HLL

The molecular weight of the active native HLL was determined by gel filtration in the presence of Triton X-100, according to the method employed for determination of a large molecular weight human membrane bound lectin (Baenziger and Maynard, 1980). The native HLL was a very large protein of ca 276 kDa (Fig. 3a). The M_r obtained by SDS-PAGE analysis showed a single purified

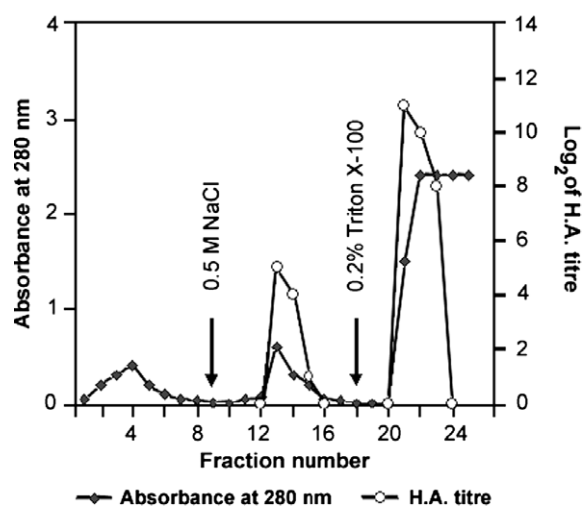


Fig. 2. Elution profile of HLL on a DEAE-Sephacel column.

HLL band of ca 17 kDa (Fig 3b and c). The HLL was thus unique in being a large multimeric protein comprising as many as 16 monomeric units of the 17-kDa protein. This is a major new finding, different from those found for the dimeric latex lectins previously reported in *E. Lactea* and *E. Lactea cristata* (Lynn and Clevette-Radford, 1986). The purified HLL showed a specific titre of 4.9 ng ml⁻¹ against rabbit erythrocytes used in the HA assay (Table 1). The minimum concentration of HLL required for detectable hemagglutination is about 16 times lower than that, 80 ng ml⁻¹, reported for the *Hevea* bark lectin (HBL) (Wittitsuwannakul et al., 1998). These large differences could be due to HLL being a much larger multimeric complex compared to that of HBL.

2.4. Factors influencing the HLL activity

Several glycoproteins tested (i.e. fetuin, asialofetuin, ovomucoid, mucin, asialomucin) were either found to inhibit the HLL-induced hemagglutination in a competitive manner. However, α_1 -acid glycoprotein, soybean trypsin inhibitor and a range of various mono- or disaccharides had no inhibitory activity (Table 2). Moreover, native fetuin and mucin were more effective inhibitors of HLL activity than were their asialo counterparts. Hence molecules devoid of the sialic moiety forms of *N*-acetylneuraminyl (sialic acid) residues are probably essential and actively involved as the HLL specific ligands. Based on these results from the glycoproteins tested in the assays, HLL might be one of the sialic acid specific lectins. However, the precise carbohydrate-binding specificity domain remains to be defined and verified by further analyses. Unlike the mostly cationic basic proteins found in the lutoid vacuolar contents (B-serum) (Southorn and Yip, 1968), the membranous HLL was a neutral protein with pI of 7.2 (Fig. 4).

Reports on the Ca²⁺ requirement of lectins for their interaction with carbohydrate and binding activity are well documented (Drickamer, 1993; Drickamer and Taylor,

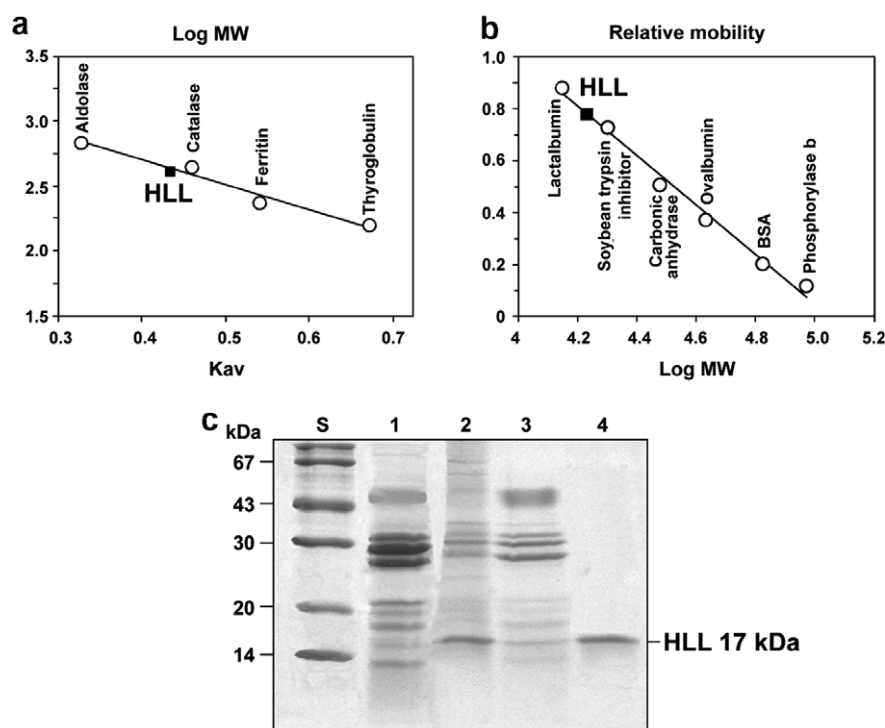


Fig. 3. Analysis of purified HLL. a and b: Molecular weight calibration of HLL by gel filtration on a Sepharose CL 6B column (a) and SDS-PAGE (b), respectively. c: SDS-PAGE. Lane 1: HLL extract (100 µg); lane 2: eluted protein (10 µg) from chitin-batch binding; lane 3: eluted protein (10 µg) from DEAE-Sepharose with 0.5 M NaCl; Lane 4: purified HLL (10 µg) eluted from DEAE-Sepharose column with 0.2% Triton X-100.

Table 1
Purification protocol of HLL

Fraction	Titre*	Specific titre** (ng ml ⁻¹)	Yield (%)
HLL extract	8.19×10^5	49.0	100
Chitin batch-binding	2.84×10^5	12.5	34.7
DEAE-Sepharose	2.66×10^5	4.9	32.5

* Titre is defined as the reciprocal of the lowest dilution that gives detectable agglutination of rabbit erythrocytes.

** Minimal concentration of HLL required for detectable hemagglutination.

Table 2
Carbohydrate binding specificity of HLL

Glycoprotein (mg ml ⁻¹)	Concentration required for 100% inhibition of agglutination of rabbit erythrocytes in the presence of HLL (1.17 µg ml ⁻¹)
Fetuin	0.625
Asialofetuin	1.250
Mucin	0.625
Asialomucin	2.500
Ovomucoid	2.500
Trypsin inhibitor (type II-S)	1.250

The carbohydrate binding specificity of the HLL was determined by hapten inhibition assays using a series of mono-, di-, tri-saccharides and some glycoproteins. The following compounds were not inhibitory: glucose, galactose, mannose, fucose, arabinose (200 mM); raffinose, GlcNAc, ManNAc, GalNAc (100 mM); chitosan dimer, chitosan trimer (5 mg/ml); GlcNAc 1 → 6 GlcNAc, Gal 1 → 4 GlcNAc (2 mg/ml); 3'-N-Acetylneuramin-lactose, 6'-N-Acetylneuramin-lactose (2 mg/ml) and α₁-acid glycoprotein, type II-S trypsin inhibitor (5 mg/ml).

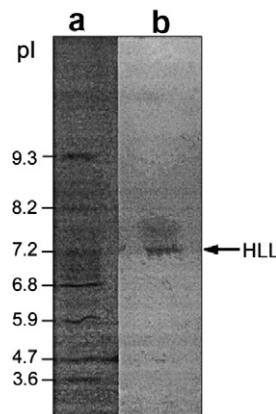


Fig. 4. pI determination of HLL. Lane a: standard markers; Lane b: purified HLL.

1993). In the case of HLL, the hemagglutination activity level was doubled with addition of low Ca²⁺ (0.5–1.5 mM) to the assay mixture (Fig. 5). This indicated that the residual Ca²⁺ present in the preparation was not sufficiently high enough to provide optimum conditions for the HA of HLL. This result was similar to those observed in a great majority of other lectin activities (Goldstein and Hayes, 1978). Surprisingly, the HLL-induced HA decreased when the concentration of the added Ca²⁺ was higher than 1.5 mM, a concentration reported to be the physiological concentration (around 1.5 mM) within the lutoid particles (d'Auzac and Jacob, 1989). The activity

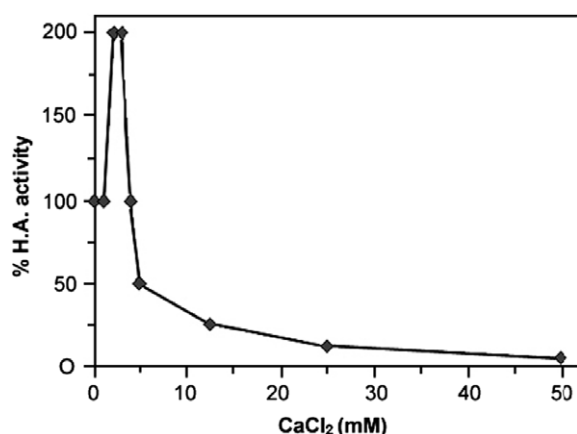


Fig. 5. Effect of CaCl₂ concentration on the hemagglutination activity of HLL.

was reduced by 50% at 5 mM and was almost completely inhibited at 10 mM Ca²⁺. The biphasic nature of the Ca²⁺ effect on HLL might be an intrinsic property of its hydrophobic protein producing a specific adverse response to high Ca²⁺ ionic strength in the HA assays.

2.5. Rubber particle aggregation induced by HLL

Unlike the hemagglutination assay for HLL as presented above (Section 2.3), the assay for rubber particle (RP) aggregation is still difficult to perform and the current commonly accepted reliable method is not yet available as a routine protocol. To circumvent this problem, a novel new assay technique to monitor the RP aggregation was developed. This new assay for the HLL induced aggregation of RP was based on a specific dye binding technique

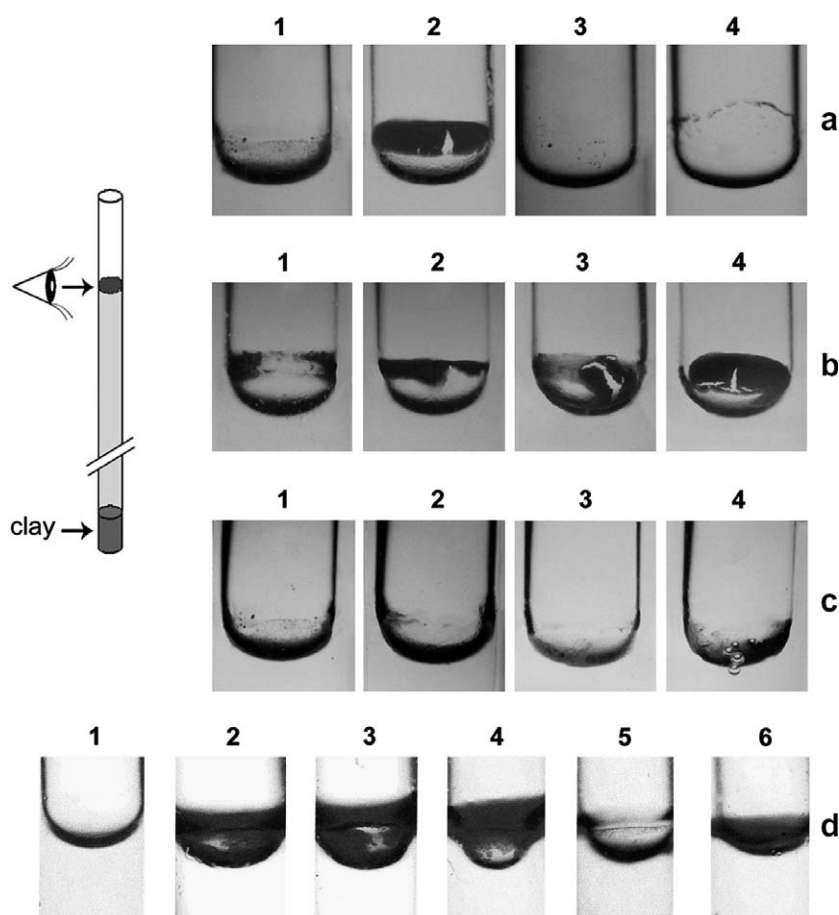


Fig. 6. RP aggregation induced by HLL. (a) Specific staining. After 30 min-incubation of RP with either control buffer (tubes 1 and 3) or 1.8 μ g of HLL (tubes 2 and 4), the assay mixture (50 μ l) was stained with either basic Fuchsin (tubes 1 and 2) or Alcian blue (tubes 3 and 4). The RP aggregates were separated by centrifugation and viewed with a light microscope. (b) Time course of HLL-induced RP aggregation. After the assay mixtures (50 μ l, each) containing RP and HLL (1.8 μ g) were incubated for 5, 10, 20 and 40 min as in tubes 1, 2, 3 and 4, respectively, and stained with Fuchsin. The amounts of RP aggregates obtained after centrifugation were compared. (c) Effect of various proteins other than HLL on RP aggregation. After 30 min-incubation of the RP with either control buffer (tube 1), 10 μ g of BSA (tube 2), 2.5 μ g of fetuin (tube 3), or 8 μ g of C-serum protein, the assay mixture was stained, separated by centrifuged and the amount RP aggregates were compared. (d) HLL induced aggregation of non-*Hevea* RP. HLL (1.8 μ g) was incubated with either isotonic buffer (tube 1) or RP suspension prepared from the latex of *Calotropis gigantea* (tube 2); *Euphorbia mili* DesMoulin (tube 3); *Ficus elastica* Roxb (tube 4); *Plumeria rubra* Linn. (tube 5); *Argyrea capitiformis* (tube 6) for 30 min. The mixtures were stained and the RP aggregates were separated and visualized.

for visualizing the stained complex using a microscopic observation. A hematocrit tube and centrifuge were employed for separating the free RP from the aggregated RP followed by examination with a microscope.

After the incubation of HLL with washed rubber particles, the RP aggregate, separated into the top layer and was specifically and intensely stained with basic Fuchsin (Fig. 6a). The Alcian blue dye that is generally used for detecting glycoproteins did not stain the aggregated complex. With a fixed amount of HLL used in the incubation, the size of RP aggregate, as evidenced by the stain intensity, increased with the incubation time (Fig. 6b). This is in addition to the intensity of the stain being dose dependent on HLL.

Lectins from other plants producing no latex (i.e. *Canavalia ensiformis*, *Cicer arietinum*, *Maackia amurensis* and *Sambucus nigra*) were either ineffective or unable to induce the RP aggregation (data not shown). Similarly, other non-lectin proteins such as bovine serum albumin (also served as the control), fresh latex C-serum proteins and fetuin (glycoprotein) were also unable to induce RP aggregation, as no staining was detected for these protein groups (Fig. 6c). These results strongly indicated a specific biological role for the endogenous latex lectin-like protein in mediating the aggregation of RP, hence the possibly that the lectin-like protein induced RP aggregation is an intrinsic physiological function. Moreover, the HLL may be a common RP agglutinin as it also induced aggregation of RP taken from several other latex producing plants (i.e. *Ficus elastica*, *Plumeria rubra*, *Euphorbia milii*, *Calotropis gigantea* and *Argyrea capitiformis*) in a similar manner to that shown for aggregation of the *Hevea* latex RP (Fig. 6d). Hence, the HLL recognition domain and the interacting glycoconjugate on RP surface receptors may be common among various different plant species.

2.6. HLL mediating latex coagulation: a proposed physiological function for latex lectin-like protein

Lutoids have been recognized for a long time and thought to play an important role in latex vessel plugging to stop the flow of latex (Southorn and Edwin, 1968; Southorn and Yip, 1968; Southorn, 1968; Milford et al., 1969; Paardekoooper, 1989). The rupture or extent of lutoid bursting was shown to be inversely correlated with the rubber yield (Southorn and Yip, 1968) by shortening the duration of flow. The lutoid vacuoles are bound by a single layered fragile membrane that can be either easily damaged or ruptured by osmotic shock or the physical shear occurring naturally during the flow of latex upon tapping. Release of the lutoid membrane debris together with its vacuolar contents, that also includes Ca^{2+} , into the latex cytosolic phase had been implicated as the initiator of latex coagulation or the formation of the so called rubber coagulum (Southorn and Edwin, 1968; Southorn and Yip, 1968). The plugging of the latex vessel end was a consequence of this coagulation. The association between the damaged lutoid fragment

and the RP aggregates had been demonstrated in the formation of the rubber coagulum cap over the tapping cuts or the severed latex vessel ends (Southorn, 1968). This biophysical association is now confirmed by our new and novel finding that the HLL of the lutoid membrane has a strong ability to aggregate the RP. The rupture or bursting of lutoids might ensure the exposure of the HLL, sited on the luminal membrane debris, to the RP surface glycoproteins in the presence of the concomitantly released Ca^{2+} along with other lutoid contents causing coagulation. This might eventually lead to an accumulation of the rubber coagulum into a large macromolecular complex that is sizable enough for plugging the extremity of the exuding vessel ends.

3. Conclusion remarks

Our findings have indicated the direct involvement of the lutoid membrane HLL in latex coagulation leading to the formation of a rubber coagulum from the interaction and association between the damaged lutoid membrane debris and the RP. The protein content ratios of lutoid membrane debris to rubber particles found in the rubber coagulum were from 1:54 to 1:17 (Fig. 1, tubes e–g). The process could thus lead to immobilization of the colloidal freely mobile RP. This phenomenon is different from the previous report on the rubber aggregate being cross-linked by the freely soluble small hevein protein of 4.7 kDa (Gidrol et al., 1994). That would seem to be a much less effective process, considering the very huge differences in size of RP having a maximum size distribution of 0.1 μm (Gomez and Hamzah, 1989) and the smaller hevein. Moreover, the amount of hevein required for minimum RP aggregation was observed to be much higher than that of HLL (data not shown). A physiological role for the intrinsic latex lectin-like protein in mediating RP aggregation in the rubber latex coagulation is therefore being proposed. This is a rather unique role for the lectin-like protein in latex of plants and is different from those diverse roles implicated or known for lectins in animal systems (i.e. intracellular routing of glycoproteins, cell–cell adhesion, phagocytosis) and other lectin interactions such as those proposed by (Inohara et al., 1996; Kappler et al., 1997; Ferguson et al., 1999). Further studies to purify and characterize the binding proteins recognized by or specifically interacting with HLL are thus warranted. The detailed findings are presented in the accompanying papers for this completely original long term investigative research.

4. Experimental

4.1. Chemicals

DEAE-Sepharose, glycoproteins, lectins, sugars and chitin were from Sigma, whereas SM-2 adsorbent was from Bio-Rad and Sepharose CL-4B was a product of Amer-

sham Pharmacia Biotech. All other chemicals were of reagent grade.

4.2. Plant material (collection and fractionation of latex)

Freshly tapped latex was collected in an ice-chilled beaker from regularly tapped trees of the RRIM 600 clone. The latex was fractionated by centrifugation at 49,000g (R_{av} 8.12 cm) for 45 min to give a floating rubber fraction, C-serum (latex cytosol) and the bottom (lutoid) fraction, respectively. The bottom fraction was separated and subjected to further treatment as described below.

4.3. Preparation of washed lutoid membrane

The bottom fraction (35 g) was washed three times by suspending in 5 volumes of Tris-buffered saline, (TBS: 50 mM Tris–HCl, pH 7.4, containing 0.9% NaCl), stirred for 30 min at 4 and recovered by centrifugation at 30,000g for 30 min. It was then subjected to hypotonic bursting by mixing with equal volumes of cold distilled H₂O and stirred on ice for 30 min. The lutoid membrane pellet was separated and washed three times with TBS.

4.4. Purification of *Hevea latex lectin-like protein (HLL)*

The washed lutoid membrane fraction was suspended in 10 volumes of buffer A (50 mM Tris–HCl pH 7.4) containing 0.2% Triton X-100 and extracted by stirring overnight at 4°. The HLL extract was separated after centrifugation at 10,000g for 25 min and concentrated by ultrafiltration (Amicon, M_r 10,000 cut-off). The concentrated HLL extract (5 ml) was incubated with SM2 absorbent (1:10, w/v) for 15 min to remove residual Triton X-100. It was then mixed with 10 ml of 30% (w/v) chitin solution and incubated overnight at 4°. Following adsorption, the adsorbent was extensively washed with buffer A with the bound protein eluted successively with 0.5 M NaCl and 0.2% Triton X-100 in buffer A. Fractions containing HLL were pooled, incubated with SM2 (1:10, w/v) for 15 min to remove Triton X-100 and then applied onto a DEAE-Sepharose CL-6B column (2.5 × 10 cm), previously equilibrated with buffer A. Following extensive washing, the column was successively eluted with 0.5 M NaCl and 0.2% Triton X-100 in buffer A (Fig. 1).

4.5. Hemagglutination assay of HLL

Hemagglutination assays were performed in U-well microtiter plates in a final volume of 100 µl containing 50 µl of a 2% suspension of rabbit erythrocytes, previously washed three times with TBS, and 50 µl of HLL solutions (each serially diluted with 2-fold increments). Hemagglutination was recorded visually after 1 h at room temperature, as the reciprocal of the lowest dilution giving detectable agglutination. The carbohydrate-binding specificity of the HLL was determined by inhibition assay using either the

glycoproteins (fetuin, asialofetuin, mucin, asialomucin, ovomucoid, α_1 -acid glycoprotein) or a series of mono-, di- or tri-saccharides. The sugars tested were glucose, galactose, mannose, fucose, arabinose, raffinose, GlcNAc, ManNAc, GalNAc, chitosan dimer, chitosan trimer, GlcNAc 1 → 6 GlcNAc, Gal 1 → 4 GlcNAc, 3'-N-Acetylneuramin-lactose and 6'-N-Acetylneuramin-lactose.

4.6. Molecular weight determination by gel filtration

The molecular weight of native HLL was determined by gel filtration on a Sepharose CL 6B column (2.5 × 85 cm) using buffer A containing 0.1% Triton X-100. Aldolase (158 kDa), catalase (240 kDa), ferritin (450 kDa) and thyroglobulin (660 kDa) were used as molecular weight standards. The molecular weight calibration was carried out according to the method described by Baenziger and Maynard (1980).

4.7. Preparation of washed rubber particles

For the latex coagulation assay, the entire rubber layer containing Moir's zone 1 and 2 (Moir, 1959) of ultracentrifuged latex was used in order to obtain sizable amount of rubber coagulum for direct visualization. The isolated rubber was thoroughly washed twice to remove any cytoplasmic protein adhering to their surface by resuspending in 10× vol by weight of TBS. The washed RP suspension was diluted to give protein concentration of 0.32 g/ml or a dry rubber content of 0.6 g/ml and used for the *in vitro* latex coagulation assay.

For the rubber particle aggregation assay, small RP were isolated from Moir's zone 2 translucent cream at the bottom of the rubber layer (facing C-serum) by skimming off and collected with a spatula. Similarly, this small RP cream was washed twice by resuspending in 10x vol. by weight of TBS. The washed small RP solution was diluted to give either a protein concentration of about 0.3 mg/ml or an absorbance at 600 nm of about 0.8–0.9 and used for the rubber particle aggregation assay.

For preparation of the non-*Hevea* latex rubber particle suspensions, incisions were made on young stems of several locally grown latex producing plants, including *Calotropis gigantea*, *Ficus elastica*, *Plumeria rubra*, *Euphorbia milii* Des Moulin or *Argyrea capitiformis*, in order to collect exuded latex into TBS. The latex was similarly washed and diluted with the same buffer to give an absorbance at 600 nm of about 0.8–0.9. All rubber particle suspensions were freshly prepared and kept on ice for use that day.

4.8. Latex coagulation assay

Three aliquots of a washed lutoid membrane suspension, containing measured amounts of total protein and dry weight contents as indicated in the text, were mixed with 4 ml of a rubber particle suspension with the total dry weight and protein content as indicated. The whole

mixture was readjusted to a final volume of 6 ml with TBS, thoroughly mixed and incubated for 30 min before being separated by centrifugation at 49,000g for 30 min. The increased rubber layer volumes due to latex coagulation and the disappearance of the bottom luteoid membrane fractions were visualized and compared with the controls.

4.9. Rubber particle aggregation assay

A new method was developed for the assay of rubber particle aggregation induced by HLL. The rubber particle suspension (25 μ l) was mixed with 25 μ l of solution containing either HLL or other proteins as indicated and incubated at room temperature for 30 min. After staining by mixing with 5 μ l of basic fuchsin, 0.1% w/v, or other dye as indicated, the mixture was loaded into a hematocrit tube by means of capillary suction. The mixture-containing end was plugged by pressing it into the Seal-ease from Clay Adams Co. or modeling clay. The rubber particle aggregate that separated into the top layer after 5 min centrifugation in a micro-hematocrit centrifuge, was examined microscopically. Aggregation and autoaggregation controls were, respectively, carried out by mixing HLL with isotonic buffer and rubber particles with isotonic buffer.

4.10. Effect of CaCl_2 concentration

Various concentrations of CaCl_2 were added to the hemagglutination assay buffer as indicated. The control was carried out in the same way but without CaCl_2 addition.

4.11. Isoelectric focusing

Isoelectric focusing was performed with a 5% polyacrylamide gel containing 2% Biolyte 3/10 ampholytes in the Bio-Rad minigel IEF apparatus (Model 111 Mini IEF Cell). The potential difference was increased stepwise according to the manufacturer's instructions.

4.12. Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE was conducted as described by Laemmli (1970) with 12 % (w/v) acrylamide gels.

4.13. Protein determination

Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a standard.

Acknowledgements

This work was supported by Grants from the Thailand Research Fund. The authors thank Dr. Brian Hodgson for his critical reading of the manuscript and Dr. Atiya Ratnapittayaporn for her assistance in the graphical work.

References

- Baenziger, J.U., Maynard, Y., 1980. Human hepatic lectin: physiochemical properties and specificity. *J. Biol. Chem.* 256, 4607–4613.
- Boatman, S.G., 1966. Preliminary physiological studies on the promotion of latex flow by plant growth regulators. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.* 19, 243–258.
- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V., 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell* 3, 1–9.
- d'Auzac, J., Jacob, J.L., 1989. Composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm. In: d'Auzac, J., Jacob, J.L., Chrestin, H. (Eds.), *Physiology of Rubber Tree Latex*. CRC Press, Florida, pp. 59–96.
- Dickenson, P.B., 1969. Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.* 21, 543–559.
- Drickamer, K., 1993. Evolution of Ca^{2+} -dependent animal lectins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 45, 207–232.
- Drickamer, K., Taylor, M.E., 1993. Biology of animal lectins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9, 237–264.
- Etzler, M.E., 1985. Plant lectins: molecular and biological aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36, 209–234.
- Ferguson, J.S., Voelker, D.R., McCormack, F.X., Schlesinger, L.S., 1999. Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J. Immunol.* 163, 312–321.
- Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H.-L., Kush, A., 1994. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J. Biol. Chem.* 269, 9278–9283.
- Goldstein, I.J., Hayes, C.E., 1978. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35, 127–340.
- Goldstein, I.J., Poretz, R.D., 1986. The lectins: properties, function and applications in biology and medicine. In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (Eds.), *Academic Press, Florida*, pp. 371–435.
- Gomez, J.B., Hamzah, S., 1989. Particle size distribution in *Hevea* latex: some observations on the electron microscopic method. *J. Nat. Rubb. Res.* 4, 204–211.
- Hauri, H., Appenzeller, C., Kuhn, F., Nufer, O., 2000. Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Lett.* 476, 32–37.
- Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., Randall, S.K., 2002. The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.* 130, 675–687.
- Inohara, H., Akahani, S., Kohts, K., Raz, A., 1996. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell–cell adhesion. *Cancer Res.* 56, 4530–4534.
- Kappler, F., Klopfenstein, D.R., Foguet, M., Paccard, J.P., Hauri, H.P., 1997. The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COP II. *J. Biol. Chem.* 272, 31801–31808.
- Kilpatrick, D.C., 2002. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 187–197.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lis, H., Sharon, N., 1986. Lectins as molecules and tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 35–67.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lynn, K.R., Clevette-Radford, N.A., 1986. Lectins from latices of Euphorbia and Elaeophobie species. *Phytochemistry* 25, 1553–1557.
- Milford, G.F.J., Paardekoooper, E.C., Ho, C.Y., 1969. Latex vessel plugging, its importance to yield and clonal behaviour. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya.* 21, 274–282.
- Moir, G.F.J., 1959. Ultracentrifugation and staining of *Hevea* latex. *Nature* 184, 1626–1628.

- Paardekooper, E.C., 1989. Exploitation of rubber tree. In: Webster, C.C., Baulkwill, W.J. (Eds.), *Rubber*. Longman, Essex, pp. 319–414.
- Southorn, W.A., 1968. Latex flow study. I. Electron microscopy of *Hevea brasiliensis* in the region of the tapping cut. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*. 20, 176–186.
- Southorn, W.A., 1969a. Physiology of *Hevea* latex flow. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*. 21, 494–512.
- Southorn, W.A., 1969b. Microscopy of *Hevea* latex. In: *Proc Nat Rubb Res Conf 1996*. Rubber Research Institute of Malaya, Kuala Lumpur, pp. 766–776.
- Southorn, W.A., Edwin, E.E., 1968. Latex flow studies. II. Influence of lutoids on the stability and flow of *Hevea* latex. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*. 20, 187–200.
- Southorn, W.A., Yip, E., 1968. Latex flow studies. III. Electrostatic considerations in the colloidal stability of fresh *Hevea* latex. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*. 20, 201–215.
- Stripe, F., Licastro, F., Morini, M.C., Parente, A., Savino, G., Abbondanza, A., Bolognesi, A., Falasca, A.I., Rossi, C.A., 1993. Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from the latex of *Euphorbia marginata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1158, 33–39.
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rouge, P., 1998. Plant lectins: a related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 575–692.
- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Sakulborirug, C., 1998. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry* 47, 183–187.
- Wititsuwannakul, D., Rattanapittayaporn, A., Wititsuwannakul, R., 2004. Involvement of *Hevea* latex organelle membrane protein in rubber biosynthesis activity and regulatory function. *Macromol. Biosci.* 4, 314–323.
- Zhao, X.Q., 1987. The significance of the structure of laticifer with relation to exudation of latex in *Hevea brasiliensis*. *J. Nat. Rubb. Res.* 2, 94–98.

A rubber particle protein specific for *Hevea* latex lectin binding involved in latex coagulation[☆]

Rapepun Wititsuwannakul^{a,*}, Kamonchanok Rukseree^{a,b}, Kamonwan Kanokwiroon^a,
Dhirayos Wititsuwannakul^b

^a Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand

^b Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Received 3 August 2006; received in revised form 1 October 2007

Available online 28 January 2008

Abstract

In the first of this three paper series, an *in vitro* latex coagulation was shown to arise from aggregation of rubber particles (RP) and lutoid membranes. RP aggregation was shown to be induced by a specific *Hevea* latex lectin-like protein (HLL) present on the lutoid membrane. In this second paper, a binding protein (BP) ligand counterpart for HLL was identified. This RP-HLLBP, having a specific interaction, with HLL was isolated from RP and characterized. The protein was extracted from the small RP in the presence of a surfactant (0.2% Triton-X-100) and further purified to homogeneity. Purification steps included acetone precipitation, heat-treatment, and column chromatography. The presence of RP-HLLBP was monitored by its ability to compete with erythrocytes in the hemagglutination inhibition (HI) assay. The purified RP-HLLBP had an HI titre of $1.37 \mu\text{g ml}^{-1}$, a *pI* value of 5.4, optimum activity at pH 5–8 and was thermostable up to 60 °C. On SDS–PAGE a single glycoprotein with M_r of 24 kDa was detected while on native PAGE the major M_r was about 120 kDa. The purified RP-HLLBP was shown to inhibit latex coagulation. Chitinase, but no other glycosidase tested, abolished its HI action and inhibited HLL-induced RP aggregation in a competitive dose dependent manner. This indicated the presence of, and role for, *N*-acetylglucosamine residues in the binding recognition. The *Hevea* latex lectin-like protein can thus be referred to as a *Hevea* latex lectin. Based on protein identification by peptide mass fingerprinting, the RP-HLLBP was confirmed to be the small rubber particle protein (SRPP). This work has unambiguously determined the role of an intrinsic RP glycoprotein (RP-HLLBP or SRPP) as a key component in formation of the rubber latex coagulum.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; Euphorbiaceae; Rubber particle; Lectin receptor; Rubber particle protein; Rubber latex; Latex coagulation

1. Introduction

Rubber particles (RP) are colloidal components present in natural rubber latex. They comprise 30–45% of the whole latex volume. The size of RP in fresh latex varies over a wide limit, from 0.02 to 3 μm (Southorn and Yip, 1968; Gomez and Hamzah, 1989) with maximum distribu-

tion of 0.1 μm (van den Tempel, 1952; Gomez and Moir, 1979). Three distinct zones with RP have been separated by means of ultracentrifugation of fresh latex (Moir, 1959). The largest RP particles are found in the uppermost Moir's zone 1 (Southorn, 1969; Yeang et al., 1995). Due to a large area occupied by zone 1, its RP diameter of 1.55 μm , as well as those as large as 3–6 μm , had been reported (Dickenson, 1969). In Moir's zone 2, the size of RP varies from 0.05 to 0.25 μm and those in Moir's zone 3 are of a lower average size (0.035–0.2 μm) (Hamzah and Gomez, 1982). Two major RP proteins of 14.6 and 24 kDa had been classified as proteolipids and identified in washed RP obtained from ultracentrifuged fresh latex

[☆] Part 2 in the series 'Proteins specifically involved in *Hevea* rubber particle aggregation and latex coagulation'.

* Corresponding author. Tel.: +66 74 219 065; fax: +66 74 446 656.

E-mail addresses: wrapepun@yahoo.com, rapepun.w@psu.ac.th (R. Wititsuwannakul).

(Hasma, 1987; Wititsuwannakul et al., 2004). The genes encoding these two major proteins were found to be most abundant in the analysis of the *Hevea* laticifer transcriptome (Ko and Chow, 2003). A deduced amino acid sequence obtained from a full-length c-DNA encoding the 24 kDa protein was shown to have a high homology to that of the 14.6 kDa protein (Oh et al., 1999). Both the 14.6 kDa (Hev b1), a first latex allergen reported in general population, and 24 kDa (Hev b3) proteins are major latex allergens in patients with spina bifida (Czuppon et al., 1993; Alenius et al., 1993; Yeang et al., 1996). The major rubber particles protein of 24 kDa has been suggested to be tightly associated with small rubber particles and also involved in rubber biosynthesis (Oh et al., 1999). A later study on micromorphology and *Hevea* rubber particle protein characterization has indicated that the 24 kDa core protein might not be the protein necessary for rubber biosynthesis (Singh et al., 2003). The exact role for the RP 24 kDa protein remains to be verified and discerned upon further careful studies, so the ambiguity could be resolved.

In this paper, a protein present on the smaller RP (the rubber layer zone 2 of centrifuged fresh latex) was purified and shown to be a specific binding protein for the *Hevea* latex lectin as well as being an inhibitor of latex coagulation. This binding protein on the RP surface serves as a specific receptor for the latex lectin interaction and sequentially mediates the latex coagulation.

2. Results and discussion

In our previous paper, the aggregation of small RP was shown to be induced by HLL (Wititsuwannakul et al., 2008). Although both the 14 and 24 kDa RP proteins were detected by SDS-PAGE in the Triton X-100 extracts of either large (Moir's zone 1) or small (Moir's zone 2) RP, the 24 kDa protein was found to be more abundant than the 14 kDa (Fig. 1) in the small RP. This was in contrast to the large RP where the 14 kDa was a dominant protein (data not shown). The washed small RP were, therefore, used for the extraction of the RP bound proteins.

2.1. Purification of a rubber particle surface protein as a HLL binding protein

RP bound protein was extracted from the washed small RP with 0.2% Triton X-100 present in the extracting solution mixture. The procedure used for successfully extracting the RP protein is similar to that employed for extracting either hydrophobic proteins or membrane-bound proteins (Barondes, 1986). The RP extracted soluble protein was shown to interact strongly with the *Hevea* latex lectin (HLL) as a specific binding protein (BP) and was thus designated as a HLL binding protein (HLLBP). In the previous report (Wititsuwannakul et al., 2008) the HLL was shown to cause either aggregation or agglutination of RP. Consequently, because washed RP was the

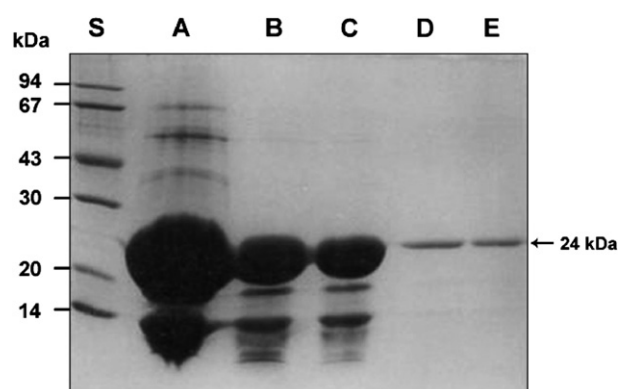


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the purified RP-HLLBP. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R250. Lane S: standard proteins; lane A: crude RP protein extract obtained after acetone precipitation of the washed rubber particle protein extract; lane B and C: as in A but after further heat treatment; lane D and E: purified RP-HLLBP from the DEAE-Sephacel peak fraction.

source of the lectin binding protein, the RP protein was thus designated as RP-HLLBP. The crude extracted RP-HLLBP prior to its purification showed strong inhibition of the HLL-mediated rabbit erythrocyte hemagglutination. It was further purified to homogeneity by the purification protocol described in the Section 4. This included acetone precipitation, followed by heat-treatment and chromatographic separation using Sepharose 6B (Fig. 2) and DEAE-Sephacel (Fig. 3) columns, respectively. The cytochrome P450 protein of 53 kDa had earlier been reported as the major rubber particle protein in guayule (Pan et al., 1995). However, in our analysis of the *Hevea* RP proteins by SDS-PAGE with acetone precipitation of the RP solubilized proteins showed mainly two major bands of about 14 and 24 kDa proteins (Fig. 1). They were considered as the intrinsic proteins of *Hevea* RP with a few other

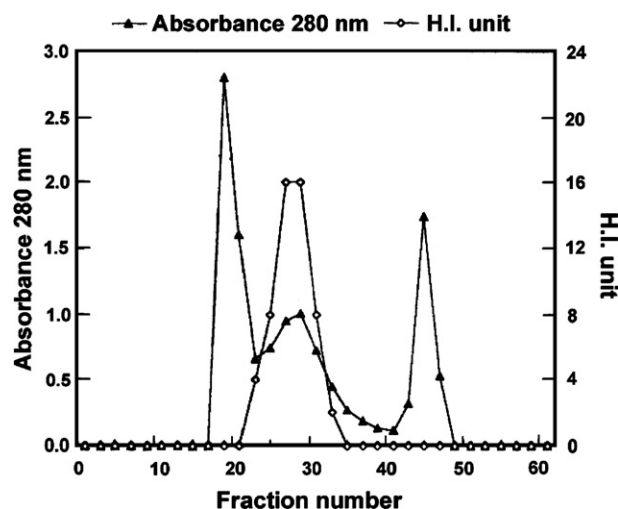


Fig. 2. Chromatographic profile of partially purified RP-HLLBP on a Sepharose 6B column. Acetone precipitated protein from a washed rubber particle protein extract was subjected to heat treatment before being loaded onto the column.

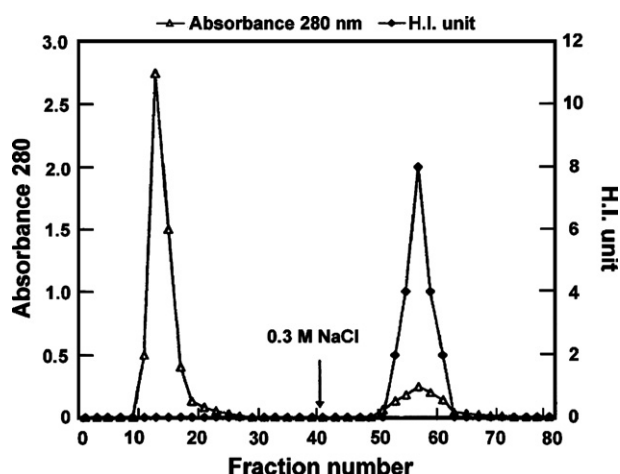


Fig. 3. Chromatographic profile of pooled active fractions from the Sepharose 6 B column on a DEAE-Sephacel column.

minor protein bands that likely resulted from association of the tightly bound bottom fraction membrane as earlier described (Wititsuwannakul et al., 2004). These extra and other contaminating proteins with higher molecular weight were sensitive to heat-treatment, unlike the two major 14 and 24 kDa proteins that are more heat stable. The purified RP-HLLBP, obtained after the ion exchange chromatography, showed a single protein band of 24 kDa by SDS-PAGE (Figs. 1, 4 and 5) and had a specific HI titre of $1.37 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Table 1).

2.2. Characterization of the RP-HLLBP properties and interactions

The purified RP-HLLBP produced a single band ca. 24 kDa on SDS-PAGE (Figs. 1 and 4) and major (ca. 120 kDa) as well as minor (ca. 130 kDa) bands on the non-denaturing native PAGE (Figs. 4 and 6). This result indicated that the native RP-HLLBP was a multimeric protein, either pentameric (major) or hexameric (minor)

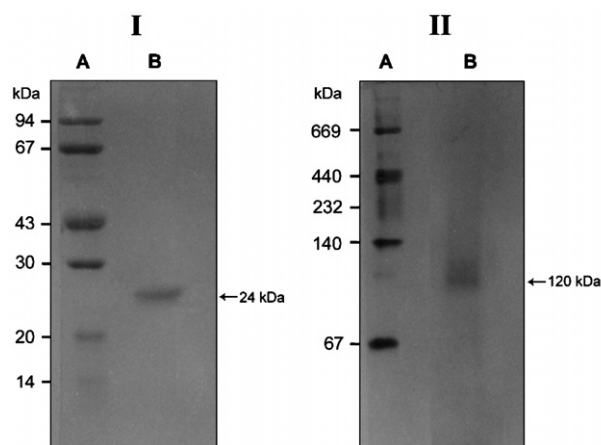


Fig. 4. SDS-PAGE (I) and native-PAGE (II) of purified RP-HLLBP, stained with Coomassie Brilliant Blue R250. Lane A: standard protein markers; Lane B: purified RP-HLLBP (30 μg).

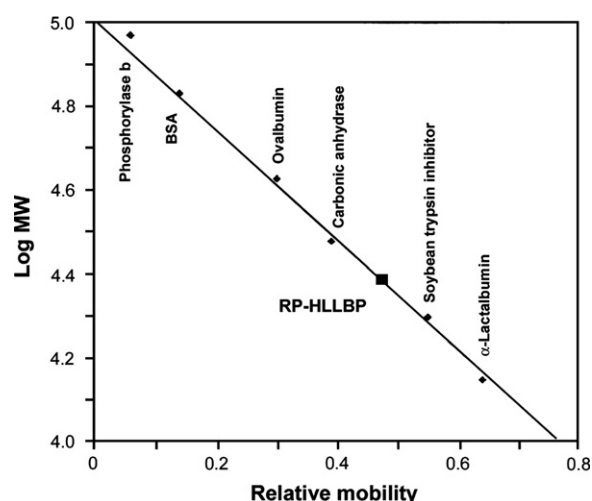


Fig. 5. Calibration curve for subunit molecular weight determination of RP-HLLBP on SDS-PAGE.

Table 1
Purification protocol of RP-HLLBP

Step	Total activity (HI titre unit ^a)	Total protein (mg)	Specific HI titre ^b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Yield (%)
Acetone precipitate	1.79×10^5	574	3.20	100
Heat treatment	8.32×10^4	241	2.89	46
Sepharose 6B	1.02×10^5	170	1.75	57
DEAE-Sephacel	1.60×10^4	22	1.37	9

^a Hemagglutination inhibition (HI) titre unit is defined as the reciprocal of the lowest dilution that gives detectable inhibition of agglutination of rabbit erythrocytes.

^b Minimal concentration of RP-HLLBP required for detectable HI.

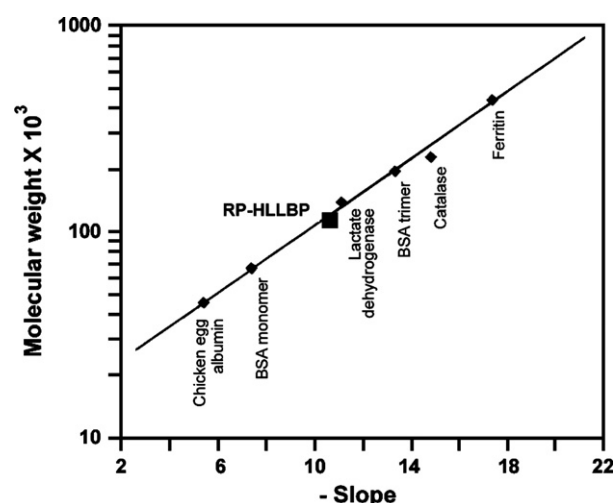


Fig. 6. Calibration curve of standard marker proteins for native molecular weight determination of RP-HLLBP on native-PAGE.

depending on the affinity of subunit association. The 24-kDa protein had been previously identified as an RP associated intrinsic protein (Wititsuwannakul et al., 2004), but with no assigned function. The findings of RP-HLLBP activity indicated a possible role for this protein in latex

coagulation. Based on protein identification by peptide mass fingerprinting data (Fig. 7), this 24 kDa protein is confirmed to be the same as that previously identified (Oh et al., 1999) as SRPP and as the Hev b 3 latex allergen (Yeang et al., 1996, 1998). However, these reports did not provide any convincing evidence for a specific role. Our finding of RP-HLLBP activity might resolve this issue (see Table 2).

The RP-HLLBP is an acidic protein. Isoelectric focusing resolved a single major component (pI ca. 5.2), and a minor component (pI ca. 6.0) (Fig. 8). These pI values obtained are in agreement with pH stability ranges of 5–8 for the active RP-HLLBP (Fig. 9). The heterogeneity of the (native) intact protein on isoelectric focusing may reflect a tendency for associating among itself into either pentameric (major) or hexameric (minor) forms, similar to those observed under the non-denaturing PAGE (Fig. 4). The native active form of RP-HLLBP was heat-stable up to 60 °C. Above 60 °C up to 80 °C, the HI activity dropped sharply to 50% remaining and at 90 °C and 100 °C only 20% remained (Fig. 10). Among all the proteins extracted from RP by Triton X-100, the 24-kDa RP-HLLBP was the only glycoprotein. On SDS-PAGE analyses of the separated proteins, the 24-kDa protein band was the only one that was stained by PAS and Alcian blue dyes (Fig. 11).

The purified 24-kDa glycoprotein, RP-HLLBP, had a 4.25% (w/w) neutral sugar content as determined by the phenol-sulfuric acid method that is commonly employed for neutral sugar analyses. Treatment of the glycoprotein

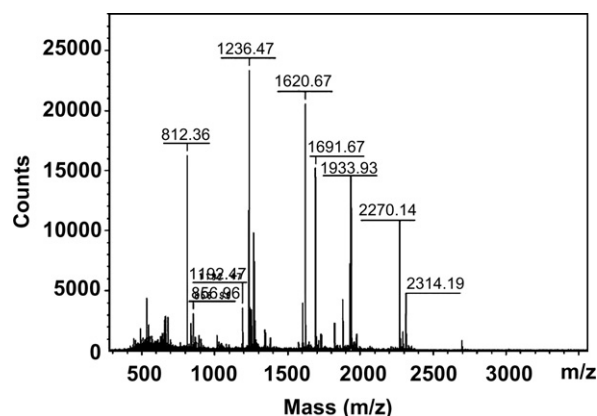


Fig. 7. RP-HLLBP tryptic digest mass spectrum from peptide mass fingerprinting analysis by MALDI-TOF mass spectrometry.

Table 2
Effect of glycosidase treatments on HI activity of RP-HLLBP

Treatment	HI activity (% control)
1. RP-HLLBP ^a (control)	100
2. As 1 + galactosidase (30 U)	100
3. As 1 + glucosidase (30 U)	100
4. As 1 + neuraminidase (0.15 U)	100
5. As 1 + chitinase (0.15 U)	0

^a The amount of RP-HLLBP was 40 µg in a total assay volume of 30 µl.

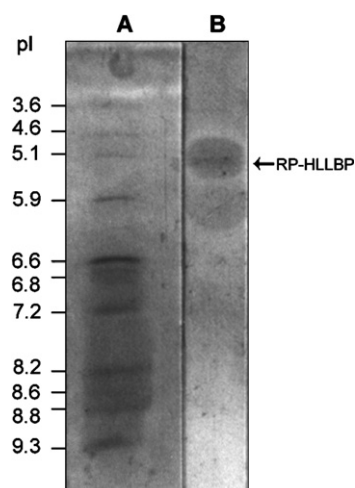


Fig. 8. Isoelectric focusing of RP-HLLBP. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R 250.

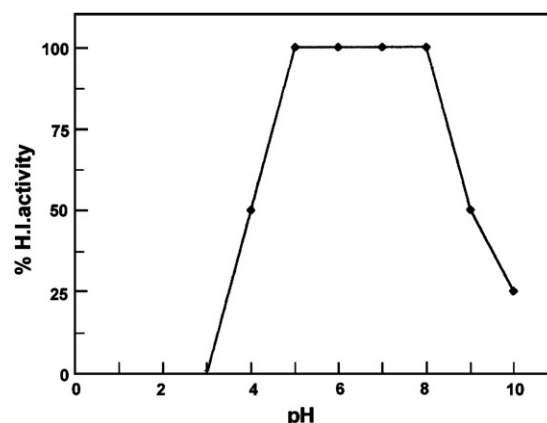


Fig. 9. pH stability of RP-HLLBP.

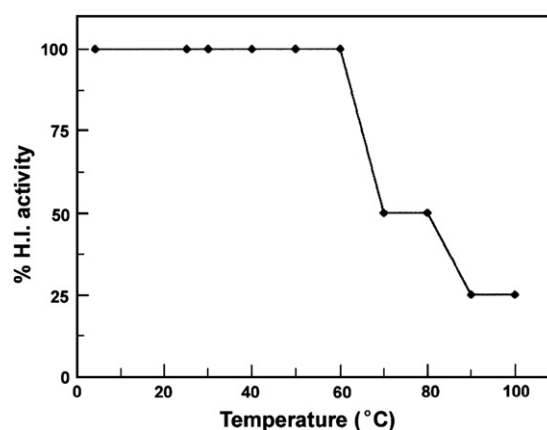


Fig. 10. Temperature stability of RP-HLLBP determined by the HI activity.

with different glycosidase or glycohydrolase enzymes (galactosidase, glucosidase, neuraminidase and chitinase) followed by assaying for remaining HI activity showed that only chitinase completely abolished HI activity. The

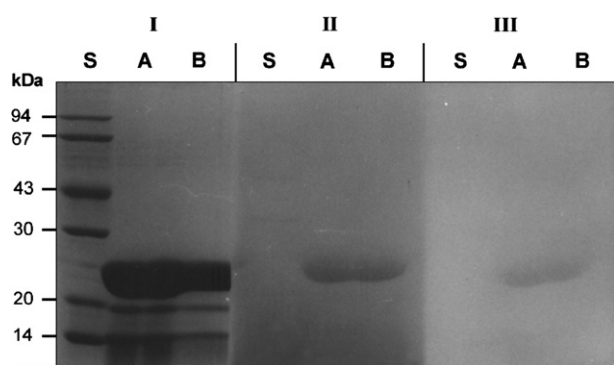


Fig. 11. SDS-PAGE of RP-HLLBP, stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (I), PAS (II) and Alcian blue reagent (III). Lane S: standard proteins; Lane A and B contained 150 and 100 μ g of partially purified RP-HLLBP obtained after heat-treatment.

decrease in HI activity was proportional to either the concentration or units of the chitinase enzyme levels applied for treatment (Fig. 12). Hence, the RP-HLLBP contains *N*-acetylglucosamine residues involved in the binding recognitions by the *Hevea* latex lectin-like protein which can now be referred to as *Hevea* latex lectin. The purified RP-HLLBP has a specific HI titre of $1.37 \mu\text{g ml}^{-1}$ in the specific HA inhibition assays. The minimum concentration of RP-HLLBP required for detectable hemagglutination inhibition is much lower than those reported for glycoproteins from non-latex origin (Wititsuwannakul et al., 2008). Perhaps this is another illustration of the high specificity that can exist in biologically important specific recognition phenomena and biochemical specific interactions. Normally these specific reactions between a ligand and its receptor are signaling events leading to some specific cellular response. In this case it would seem that the intrinsic RP-HLLBP ligand reacts with its natural latex lectin receptor to facilitate latex coagulation and plugging of the latex vessels.

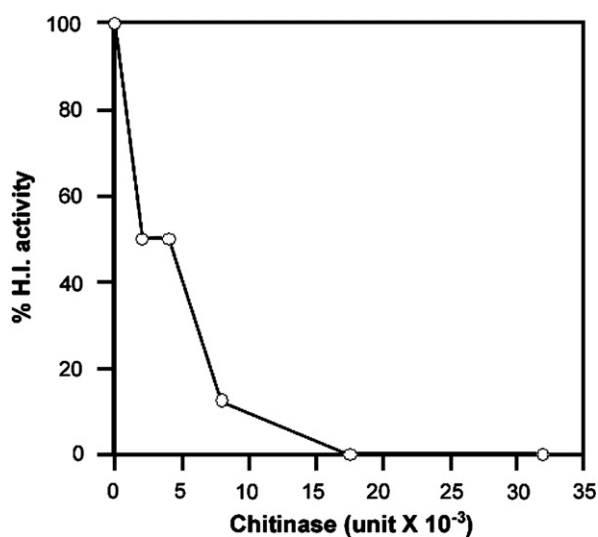


Fig. 12. Effect of chitinase on RP-HLLBP activity.

2.3. Inhibition of latex coagulation by purified RP-HLLBP

A complete latex coagulation process occurred after mixing appropriate amounts of washed lutoid membrane with RP, as indicated (Fig. 13, tube C). The protein content ratio, ca. 1:54, of lutoid membrane debris to RP found in the rubber coagulum were similarly shown in earlier report (Wititsuwannakul et al., 2008). This indicates a single lutoid membrane complexing several rubber particles. Accordingly, from an electron microscopic study of latex vessel in *Hevea* bark, the destabilized lutoids had been shown to have numerous small rubber particles zone 2 variety adhering to their surfaces (Yeang et al., 1995). All the lutoid membrane debris disappeared from the bottom fraction due to their rapid aggregation with the RP. However, a prior incubation of the lutoid membrane with purified RP-HLLBP was found to reduce the extent of their ability in aggregating the RP. The higher the amounts of the soluble RP-HLLBP added to the pre-incubation mixtures, the higher were the remaining amounts of unaggregated lutoid membrane in the bottom fraction (Fig. 13, tubes D–F). These results indicate that HLLBP, in either soluble or surface-bound forms was specifically recognized by the lutoid membrane HLL while the surface-bound HLLBP was necessary for the latex coagulation.

2.4. RP-HLLBP as the latex coagulating factor

The assay developed to monitor the HLL induced aggregation of RP (Fuchsin staining) (Wititsuwannakul et al., 2008) was used to test the possibility that the specific function of RP-HLLBP, the lectin binding protein, was associated with latex coagulation. HLL was preincubated with various amounts of purified RP-HLLBP followed by addition of the washed small RP. RP-HLLBP inhibited the HLL-induced RP aggregation in a dose dependent manner (Fig. 14). The amount of stained RP aggregate without the RP-HLLBP was sequentially reduced as the BP level increased until it was completely abolished by the BP. However, when RP-HLLBP was pretreated with chitinase, but not by other glycosidase enzymes, there was no reduction of the stained RP aggregate (Fig. 15). These results indi-

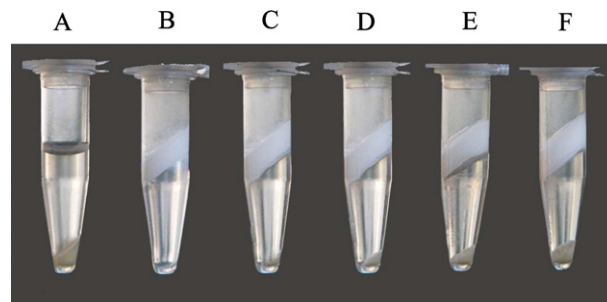


Fig. 13. Centrifugation of suspensions A–H, 0.5 ml each. A: washed lutoid membrane, containing 1.2 mg protein; B: washed rubber particle, with 64 mg protein; C: A + B; D–F: (A + RP-HLLBP) + B, the total amounts of purified RP-HLLBP in D–F were 15, 45, and 90 μ g, respectively.

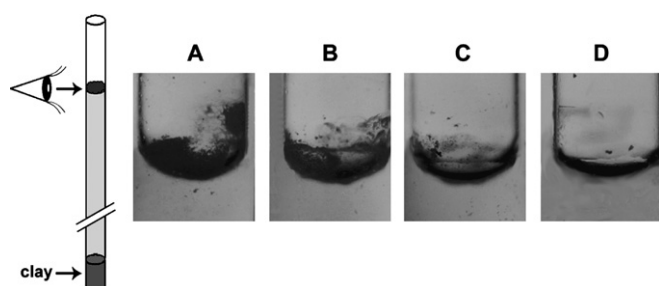


Fig. 14. Inhibitory effect of RP-HLLBP on HLL-induced rubber particle aggregation. The HLL (2.5 µg) was preincubated with either assay buffer only (A) or buffer solution containing 5 (B), 20 (C) or 40 (D) µg of RP-HLLBP before testing in the rubber particle aggregation assay as described Section 4.

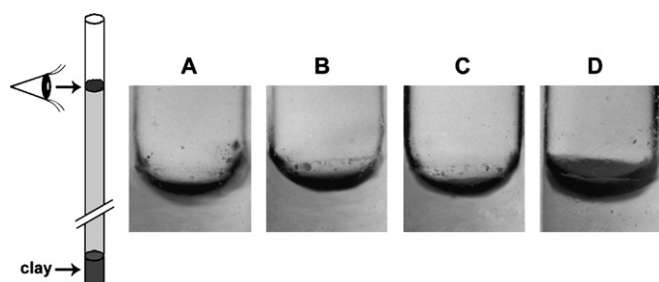


Fig. 15. Effect of various glycosidases on the inhibition of HLL-induced rubber particle aggregation by RP-HLLBP. The RP-HLLBP (40 µg) was preincubated with either (A) galactosidase, 15 U; (B) glucosidase, 1.5 U; (C) neuraminidase, 0.075 U or (D) chitinase, 0.075 U, before testing its inhibitory effect on HLL-induced rubber particle aggregation as described Section 4.

cated that *N*-acetylglucosamine on the RP-HLLBP was actively involved in the specific binding recognition. A similar role has been postulated for the *N*-acetylglucosamine sugar on the RP glycoprotein receptor, in mediating polyvalent bridging between hevein and RP (Gidrol et al., 1994). Although chitinase was demonstrated to have a negative effect on the HLL-induced RP aggregation, this effect was considerably reduced in the presence of Ca^{2+} , previously shown to promote the HLL agglutinating activity (Wititsuwannakul et al., 2008). The chitinase and Ca^{2+} are both lutoid vacuolar constituents and are concurrently released upon bursting of the lutoids. Hence, the contents and levels of the exposed HLL binding sites on the ruptured lutoid membrane might be key limiting factors in promoting latex coagulation. This agrees well with the reports of a high correlation between lutoid bursting and the latex vessel plugging indexes (Yeang and Paranjothy, 1982; d'Auzac, 1989). These findings indicate that the small RP with the intrinsic 24-kDa surface glycoprotein receptor acts as a coagulating factor in the rubber latex coagulation process.

3. Concluding remarks

This proposed physiological function for the RP-HLLBP or SRPP is strongly substantiated by previous

findings on the tight association of the 24-kDa protein with the small RP surface (Oh et al., 1999). Therefore, the logic of these findings is that the highly abundant small RP, less than 0.36 µm in size and accounting for ca. 95% of the total RP population in *Hevea* latex (van den Tempel, 1952; Gomez and Hamzah, 1989), has an important role in the latex coagulation process.

4. Experimental

4.1. Chemicals

DEAE-Sephacel, glycoproteins, sugars and chitinase were from Sigma. Biogel P-300 was from Bio-Rad (USA). All other chemicals were of reagent grade.

4.2. Purification of RP-HLLBP

The washed RP suspension, prepared as previously described (Wititsuwannakul et al., 2008), was extracted with 5× vol. of 0.2% Triton X-100 detergent. The mixture was stirred overnight at 4 °C and centrifuged to obtain the supernatant. Two volumes of cold acetone was added, mixed well and kept on ice for 10 min. The solution was then centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. The acetone precipitate was dissolved in 50 mM Tris–HCl, pH 7.4 (buffer A) and again centrifuged at 40,000g for 10 min to separate the supernatant. The first step for purifying the RP-HLLBP was to heat the resuspended acetone precipitated solution at 70 °C for 5 min followed by immediately placing it in an ice bath and centrifuging at 40,000g for 10 min to remove the precipitate. The supernatant was concentrated and subjected to further purification on a Sepharose 6 B column (1.4 × 70 cm) previously preequilibrated with buffer A at a flow rate of 12 ml/h at 4 °C. After loading the sample, the column was eluted with the same buffer. Fractions of 2 ml were collected and their absorbance measured at 280 nm. An HI assay was performed in all fractions. The fractions containing HI activity were pooled, concentrated and further purified on a DEAE-Sephacel column (1.8 × 8 cm), preequilibrated with buffer A. After loading the sample, the column was washed with the same buffer until the absorbance at 280 was below 0.005. The column was then eluted using the same buffer containing 0.3 M NaCl. The fractions containing high HI activity were pooled, desalted and concentrated for further characterization studies.

4.3. Assay of hemagglutination inhibition (HI) by RP-HLLBP

The activity of RP-HLLBP activity was measured by its ability to inhibit hemagglutination induced by HLL. Each 25 µl of RP-HLLBP sample was 2-fold serially diluted with hemagglutination buffer (TBS), containing 0.9% NaCl in 50 mM Tris–HCl buffer, in a microtitre U plate. This was

followed by the addition of HLL solution (25 μ l) that possessed a titre of 4 hemagglutination units. The solution was mixed and incubated at room temperature for 20 min before the addition of 50 μ l of a 2% (v/v) rabbit erythrocyte suspension into each well. Hemagglutination was recorded after incubation for 1 h at room temperature. The minimum concentration of inhibitors that caused 100% inhibition of hemagglutination activity of the HLL was calculated. The inhibition activity was expressed in term of hemagglutination inhibition (HI) unit or titre.

4.4. Effect of glycosidases on HI activity of RP-HLLBP

7.5 μ l aliquots each containing 40 μ g of partially purified RP-HLLBP were incubated with 7.5 μ l of glycosidase enzymes with various activity units (galactosidase, 30 U; glucosidase, 30 U; neuraminidase, 0.15 U and chitinase 0.15 U or as indicated) for 30 min at room temperature. After incubation, the HI activity of RP-HLLBP was determined in each reaction mixture as described above (see the previous section).

4.5. Effect of RP-HLLBP on HLL-induced rubber particle aggregation

A solution (15 μ l) containing 2.5 μ g of HLL, isolated and purified as described previously (Wititsuwannakul et al., Paper #1 in series), was incubated with 15 μ l of various amounts of the RP-HLLBP from 5 to 40 μ g. Incubation without the RP-HLLBP served as the control. After incubation for 30 min, the rubber particle aggregation assay was performed by adding 30 μ l of rubber particle suspension to the mixture. The rubber aggregate formed was separated and observed as described previously (Wititsuwannakul et al., 2008).

4.6. Effect of glycosidases treated RP-HLLBP on HLL-induced RP aggregation

Aliquots (30 μ l) containing partially purified RP-HLLBP, obtained after pretreatment with various glycosidases (galactosidase, 15 U; glucosidase, 1.5 U; neuraminidase, 0.075 U and chitinase, 0.075 U) as described above were incubated with 2.5 μ g of HLL for 30 min. After the incubation, a washed RP suspension (30 μ l) was added to the assay mixture and incubation was continued. The complete assay mixture was then stained with Fuchsin. The rubber aggregate formed was separated and observed as described previously (Wititsuwannakul et al., 2008).

4.7. Effect of pH and temperature

The effect of temperature on the HI activity of RP-HLLBP was determined by incubating a RP-HLLBP sample at various pHs (for 1 h) or temperature (for 30 min) as indicated. The mixtures were then adjusted back to pH 7.4 or 4 °C and assayed for HI activity.

4.8. Carbohydrate determination of RP-HLLBP

The neutral sugar content of the RP-HLLBP was determined in a scaled down version of the phenol–sulfuric acid method of Dubois et al. (1956).

4.9. Polyacrylamide gel electrophoresis

PAGE was performed either in the presence or absence of SDS by the method of Laemmli (1970) and stained as indicated.

4.10. Glycoprotein staining

SDS–PAGE of partially purified RP-HLLBP was subjected to PAS staining according to the method of Zacharius et al. (1969) and Alcian blue staining as described by Wardi and Michos (1972).

4.11. Polyacrylamide gel isoelectric focusing

Isoelectric focusing was performed on a 5% polyacrylamide gel with 2% Biolyte 3/10 ampholytes in Bio-Rad minigel IEF apparatus (Model 111 Mini IEF Cell). The potential difference was increased stepwise according to the manufacturer's instructions.

4.12. Latex coagulation inhibition assay

Fifty microliter aliquots each containing a washed lutoid membrane suspension with a total protein content of 1.2 mg, prepared as previously described (Wititsuwannakul et al., 2008), were mixed with 50–200 μ l of the purified RP-HLLBP with various amounts of protein as indicated and incubated for 1 h at room temperature. Two hundred microliter of a washed RP suspension with protein content of 64 mg or dry rubber content of 120 mg, prepared as previously described (Wititsuwannakul et al., 2008), was then added. The final volume of the mixture was maintained at 500 μ l by adding TBS buffer and thoroughly mixed. After additional 30 min incubation, the mixture was separated at 10,000 rpm for 20 min in a microcentrifuge. The amounts of the decrease in the size of rubber coagulum and increase in the size of remaining bottom lutoid membrane obtained after the final incubation were visualized and compared with the latex coagulation control tube. A mixture containing 50 μ l of washed lutoid membrane, 200 μ l of washed RP suspensions and 250 μ l of TBS was used in the latex coagulation assay control. The washed RP assay control contains 200 μ l RP suspension and 300 μ l TBS and the washed lutoid membrane control, 50 μ l lutoid membrane suspension and 450 μ l TBS.

4.13. Protein identification by mass spectrometry

The electrophoretic band corresponding to the 24 kDa RP-HLLBP was excised and digested with trypsin. A pep-

tide mass fingerprint (PMF) was produced by analysing the digested protein with a Bruker Biflex III MALDI-TOF mass spectrometer. The resulting PMF was compared with the calculated masses of all tryptic peptides that can be theoretically produced from the sequences corresponding to all *Hevea brasiliensis* proteins in SWISS-PROT and NCBI public protein databases. The protein that yielded the best match between the theoretical and experimental mass values was identified to be a small rubber particle protein. The MALDI-MS analysis was carried out, under a requested service, at The University of Minnesota Center for Mass Spectrometry and Proteomics.

4.14. Protein determination

Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a standard.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund. The authors thank Dr. Alan B. Hooper for his help on requesting the MS analysis service, Dr. Brian Hodgson for his critical reading of the manuscript and Dr. Atiya Rattanapittayaporn for her assistance in the graphical work.

References

- Alenius, H., Palosuo, T., Kelly, Y., Kurup, V., Reunala, T., Makinen-Kiljunen, S., Turjanmaa, K., Fink, J., 1993. IgE reactivity to 14-kD and 22-kD natural rubber proteins in latex-allergic children with spina bifida and other congenital abnormalities. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 102, 61–66.
- Barondes, S.H., 1986. Vertebrate lectins: properties and functions. In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (Eds.), *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, New York, pp. 438–452.
- Czuppon, A.B., Chen, Z., Rennert, S., Engelke, T., Meyer, H.E., Heber, M., Baur, X., 1993. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92, 690–697.
- d'Auzac, J., 1989. Factors involved in the stopping of flow after tapping. In: d'Auzac, J., Jacob, J.-L., Chrestin, J. (Eds.), *Physiology of Rubber Tree Latex*. CRC Press, Florida, pp. 257–285.
- Dickenson, P.B., 1969. Electron microscopical studies of the latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya* 21, 543–559.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Gidrol, X., Chrestin, H., Tan, H.-L., Kush, A., 1994. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J. Biol. Chem.* 269, 9278–9283.
- Gomez, J.B., Hamzah, S., 1989. Particle size distribution in *Hevea* latex – some observations on the electron microscopic method. *J. Nat. Rubber Res.* 4, 204–211.
- Gomez, J.B., Moir, G.F., 1979. The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. Malaysian Rubber Research and Development Board, Monograph No. 8. Rubber Research Institute Malaysia, Kuala Lumpur.
- Hamzah, S.B., Gomez, J.B., 1982. Electron microscopy of ultracentrifuged fractions of *Hevea* latex. I. Top-fractions. *J. Rubber Res. Inst. Malay.* 30, 161–173.
- Hasma, H., 1987. Proteolipids of natural rubber particles. *J. Nat. Rubber Res.* 2, 129–133.
- Ko, J.-H., Chow, K.-S., 2003. Transcriptome analysis reveals features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol. Biol.* 53, 479–492.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Moir, G.F.J., 1959. Ultracentrifugation and staining of *Hevea* latex. *Nature* 184, 1626–1628.
- Oh, S.K., Kang, H., Shin, D.H., Yang, J., Chow, K.S., Yeang, H.Y., Wagner, B., Breiteneder, H., Han, K.H., 1999. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*. *J. Biol. Chem.* 274, 17132–17138.
- Pan, Z., Durst, F., Werck-Reichhart, D., Gardner, H.W., Camara, B., Cornish, K., Backhaus, R.A., 1995. The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450: characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. *J. Biol. Chem.* 270, 8487–8494.
- Singh, A.P., Wi, S.G., Chung, G.C., Kim, Y.S., Kang, H., 2003. The micromorphology and protein characterization of rubber particles in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis* and *Hevea brasiliensis*. *J. Exp. Bot.* 54, 985–992.
- Southorn, W.A., 1969. Physiology of *Hevea* latex flow. *J. Rubber Res. Inst. Malay.* 21, 494–512.
- Southorn, W.A., Yip, E., 1968. Latex flow studies. III. Electrostatic considerations in colloidal stability of fresh *Hevea* latex. *J. Rubber Res. Inst. Malay.* 20, 210–2150.
- van den Tempel, M., 1952. Electron microscopy of rubber globules in *Hevea* latex. *Trans. Inst. Rubber Ind.* 28, 303–308.
- Wardi, A.H., Michos, G.A., 1972. Alcian blue staining of glycoproteins in acrylamide disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* 49, 607–609.
- Wititsuwannakul, R., Pasitikul, P., Kanokwiroon, K., Wititsuwannakul, D., 2008. *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. *Phytochemistry* 69, 339–347.
- Wititsuwannakul, D., Rattanapittayaporn, A., Koyama, T., Wititsuwannakul, R., 2004. Involvement of *Hevea* latex organelle membrane proteins in rubber biosynthesis activity and regulatory function. *Macromol. Biosci.* 4, 314–323.
- Yeang, H.Y., Cheong, K.F., Sunderasan, E., Hamzah, S., Chew, N.P., Hamid, S., Hamilton, R.G., Cardoso, M.J., 1996. The 14.6 kD rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98, 628–639.
- Yeang, H.Y., Paranjothy, K., 1982. Initial physiological changes in *Hevea* latex flow characteristics associated with intensive tapping. *J. Rubber Res. Inst. Malay.* 30, 31–36.
- Yeang, H.Y., Ward, M.A., Zamri, A.S., Dennis, M.S., Light, D.R., 1998. Amino acid sequence similarity of Hev b 3 to two previously reported 27- and 23-kDa latex proteins allergenic to spina bifida patients. *Allergy* 53, 513–519.
- Yeang, H.Y., Yip, E., Hamzah, S., 1995. Characterization of zone 1 and zone 2 rubber particles in *Hevea brasiliensis* latex. *J. Nat. Rubber Res.* 10, 108–123.
- Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., Woodlock, J.J., 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 30, 148–152.