



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

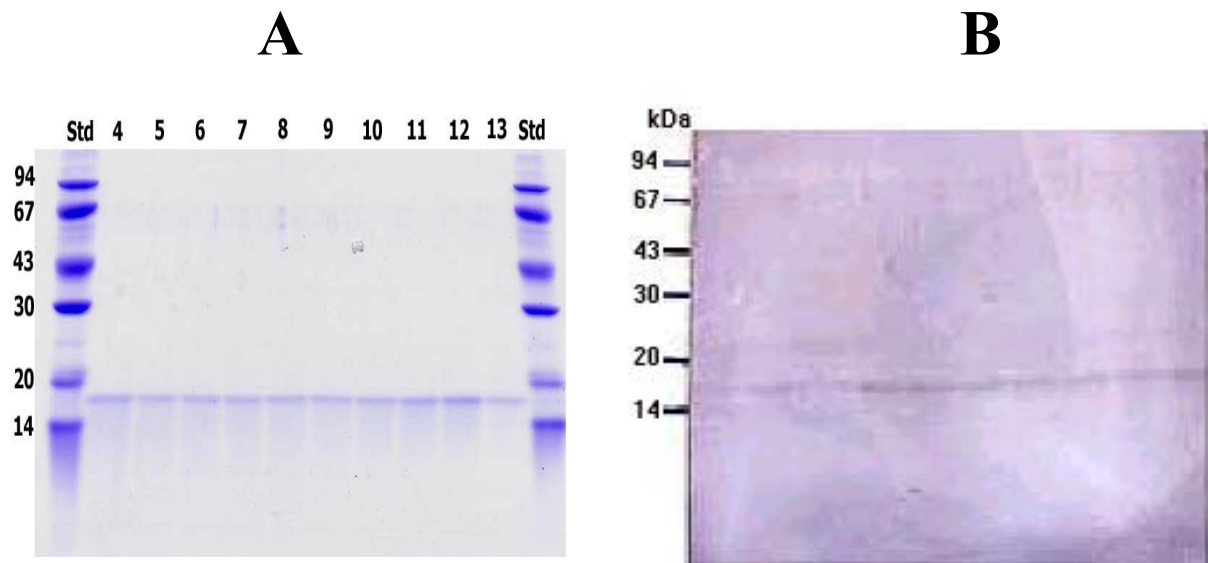
แล้ววางทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำการแยกส่วนของชั้นบนซึ่งจะได้ proteolipid ที่ละลายได้ใน methanol หรือ BMPL/M ซึ่งจะประกอบไปด้วยโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ขนาด 30 kD และส่วนชั้นล่างสามารถเตรียมเป็นไขของ proteolipid fluff หรือ BMPL/f ซึ่งจะประกอบไปด้วยโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ขนาด 17 kD และจะลอยอยู่ระหว่างชั้น chloroform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

c) การทำ IgE immunoblot

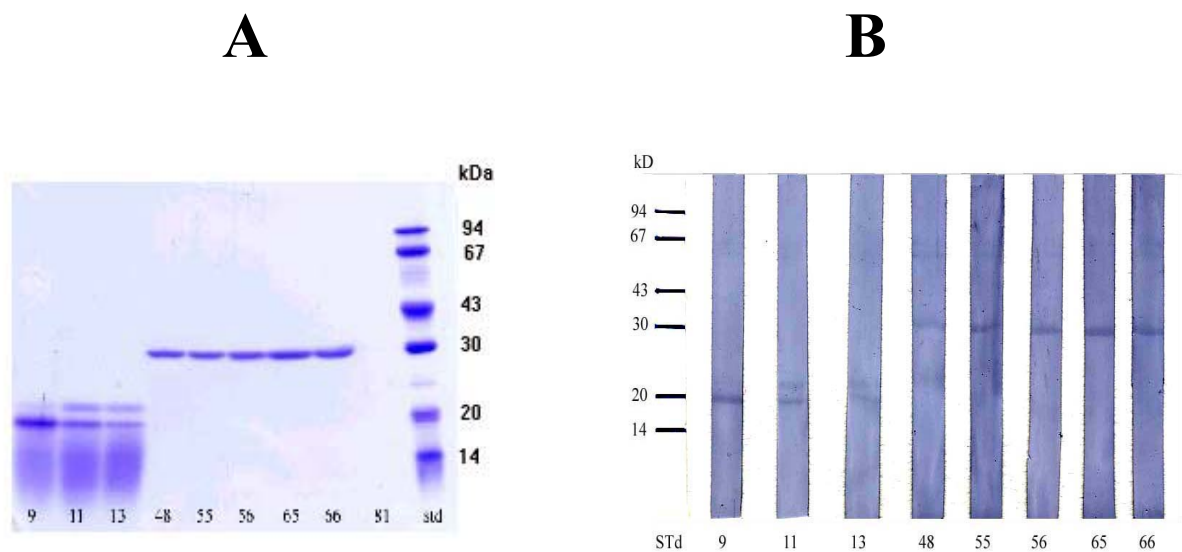
นำโปรตีนซึ่งละลายน้ำได้ที่เตรียมได้จาก BF ในรูป BMPL/m และ BMPL/f ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำไม่ได้ไปทำการแยกด้วย SDS-PAGE ด้วยการถ่ายโปรตีนดังกล่าว ลงในแผ่น nitrocellulose แล้วทำ immunoblot จะใช้ serum ที่ได้จากผู้แพ้โปรตีนจากยาง พร้อมด้วยการทำย้อมให้เห็นแถบ IgE binding protein ด้วยการใช anti human IgE 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) ของโปรตีนใน fraction 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, κ 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>	<u>Blank</u>	<u>C5</u>	<u>C13</u>	<u>C21</u>	<u>C29</u>	<u>C37</u>	<u>C44</u>	<u>C52</u>	<u>C60</u>	<u>C68</u>	<u>C76</u>	<u>C84</u>
<u>B</u>	<u>Blank</u>	<u>C6</u>	<u>C14</u>	<u>C22</u>	<u>C30</u>	<u>C105</u>	<u>C45</u>	<u>C53</u>	<u>C61</u>	<u>C69</u>	<u>C77</u>	<u>C85</u>
<u>C</u>	<u>NC</u>	<u>C7</u>	<u>C15</u>	<u>C23</u>	<u>C31</u>	<u>C38</u>	<u>C46</u>	<u>C54</u>	<u>C62</u>	<u>C70</u>	<u>C78</u>	<u>C86</u>
<u>D</u>	<u>PC</u>	<u>C8</u>	<u>C16</u>	<u>C24</u>	<u>C32</u>	<u>C39</u>	<u>C47</u>	<u>C55</u>	<u>C63</u>	<u>C71</u>	<u>C79</u>	<u>C87</u>
<u>E</u>	<u>C1</u>	<u>C9</u>	<u>C17</u>	<u>C25</u>	<u>C33</u>	<u>C40</u>	<u>C48</u>	<u>C56</u>	<u>C64</u>	<u>C72</u>	<u>C80</u>	<u>C88</u>
<u>F</u>	<u>C2</u>	<u>C10</u>	<u>C18</u>	<u>C26</u>	<u>C34</u>	<u>C41</u>	<u>C49</u>	<u>C57</u>	<u>C65</u>	<u>C73</u>	<u>C81</u>	<u>C89</u>
<u>G</u>	<u>C3</u>	<u>C11</u>	<u>C19</u>	<u>C27</u>	<u>C35</u>	<u>C42</u>	<u>C50</u>	<u>C58</u>	<u>C66</u>	<u>C74</u>	<u>C82</u>	<u>C90</u>
<u>H</u>	<u>C4</u>	<u>C12</u>	<u>C20</u>	<u>C28</u>	<u>C36</u>	<u>C43</u>	<u>C51</u>	<u>C59</u>	<u>C67</u>	<u>C75</u>	<u>C83</u>	<u>C91</u>

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 ($OD_{450} > 4.00$) and 39 clones with $OD_{450} > 3.00$. 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 k 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.

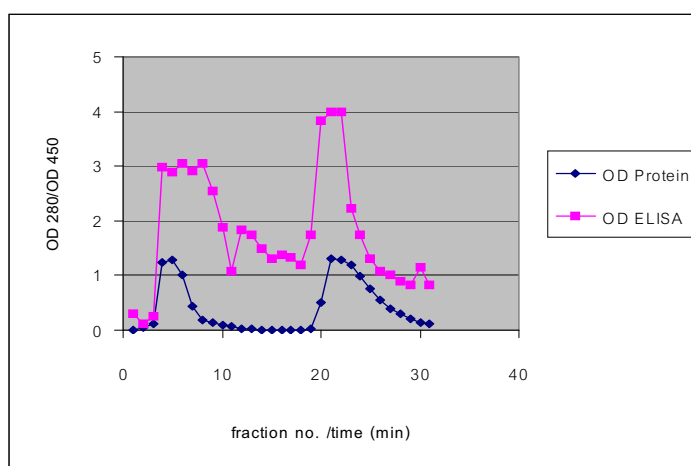


Figure A.3 Column profiles on protein absorbance (OD_{280}) and anti- 30 kD antibody specificity (OD_{450}) of fractions eluted from Protein A column.

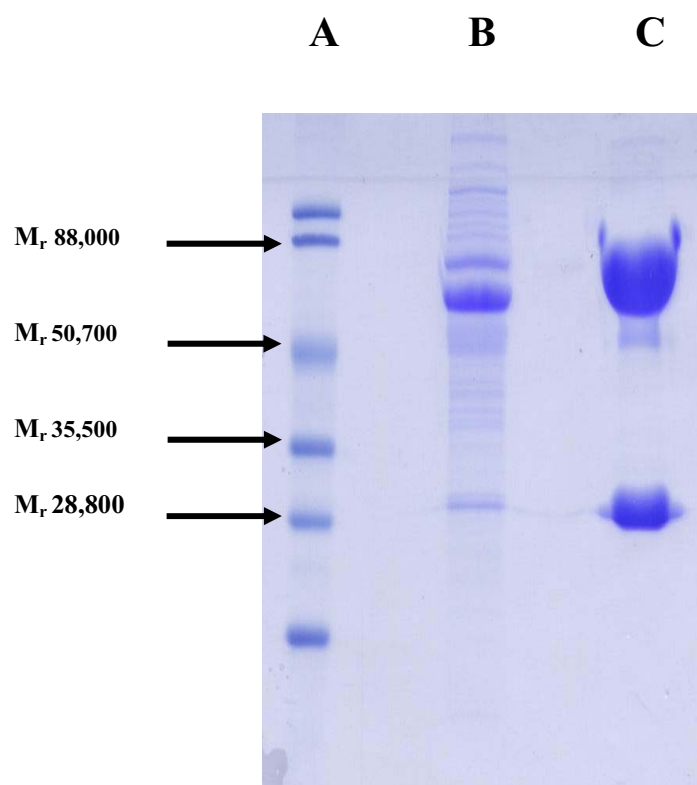


Figure A.4 SDS-PAGE of anti-30 kD monoclonal antibodies.

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

B: Unbound fraction or washed peak;

C: Eluted peak fractions (30 μ g)

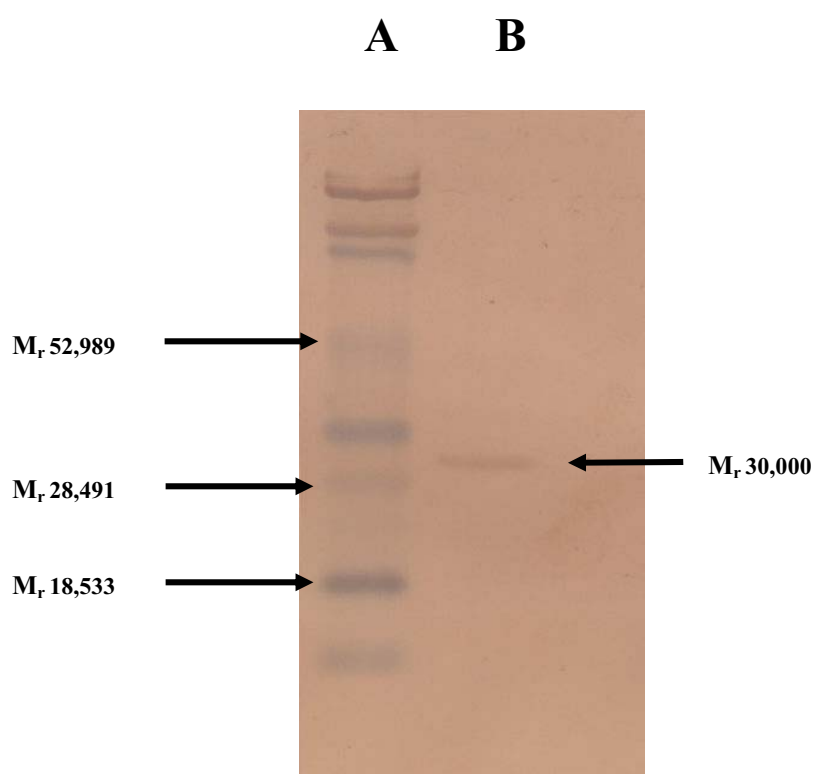


Figure A.5 Western-blotting analysis of 30 kD antigen against anti-30 kD mAb

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 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน 17 kD

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgG ซึ่งมีความจำเพาะต่อโปรตีน 17 kD ได้มีอยู่ในรายงาน progress report No.1 (Appendix 1) ที่ได้ส่งให้ บริษัท BarrierMed แต่โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgM ซึ่งเหมาะกับการใช้ทำ agglutination test เท่านั้น จึงได้ปรับปรุง condition ในการฉีดหนูพร้อมทั้งพยายามเลือกหนูในชวอายุที่เหมาะสม แต่ก็ยังได้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะทั้ง 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 การฉีดกระตุ้นหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี 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 ที่สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (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 เทียบกันระหว่าง 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 ผลสุดท้ายได้คัดเลือกโมโนโคลนไว้จำนวน 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 ก่อนข้างต่ำ 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

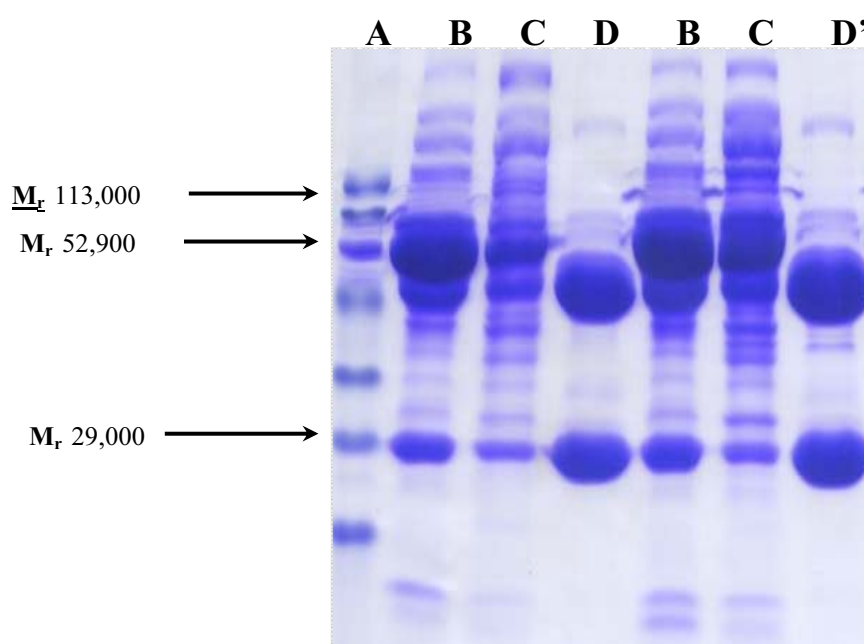
b) การทำบริสุทธิ์โมโนโคลนอลแอนติบอดี

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

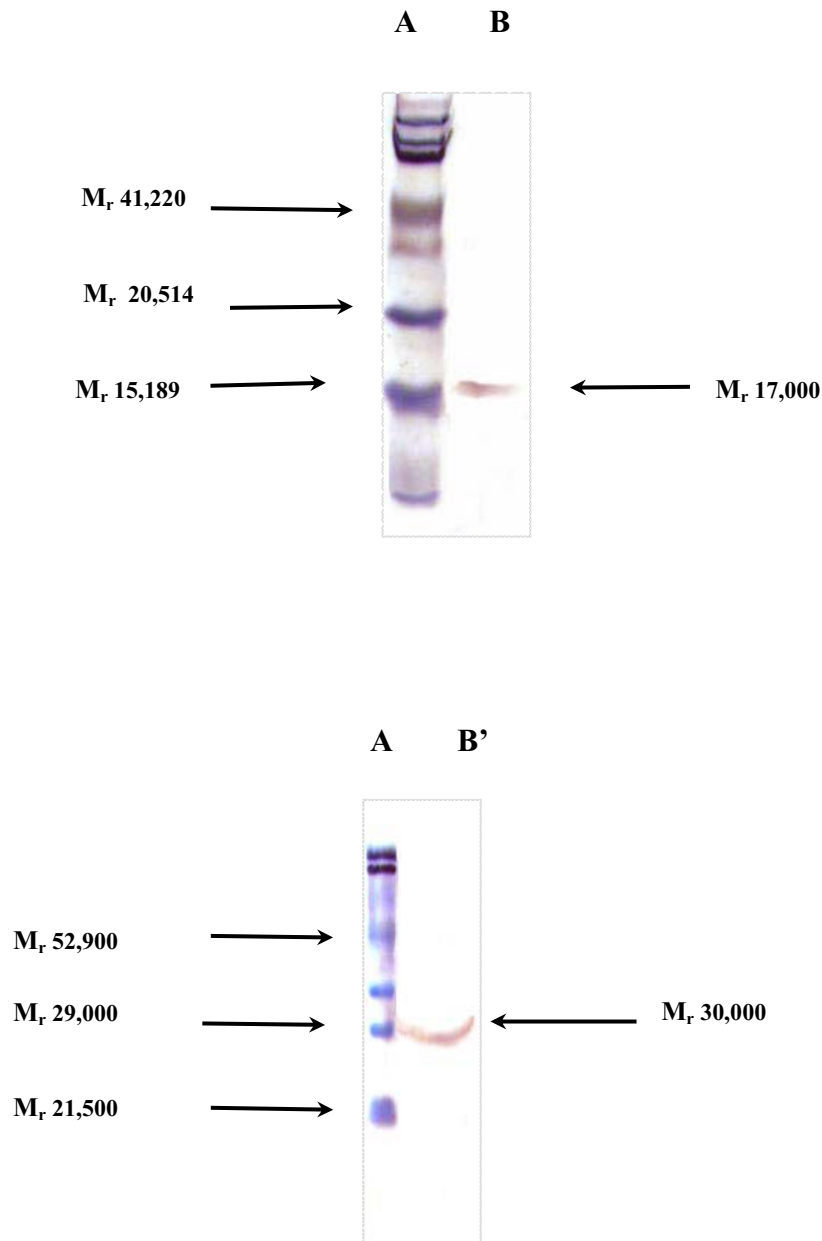
กับบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมและทำการ dialysis ก่อนที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ต่อไป โดยจะมีขั้นตอนการ equilibrate และ wash column ด้วย 0.02 M sodium phosphate buffer pH 7.0 และขั้นตอนการ elute โมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วย 0.1 M citrate buffer pH 3.0 จากนั้นจึงนำ fraction ที่เก็บจากการ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

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

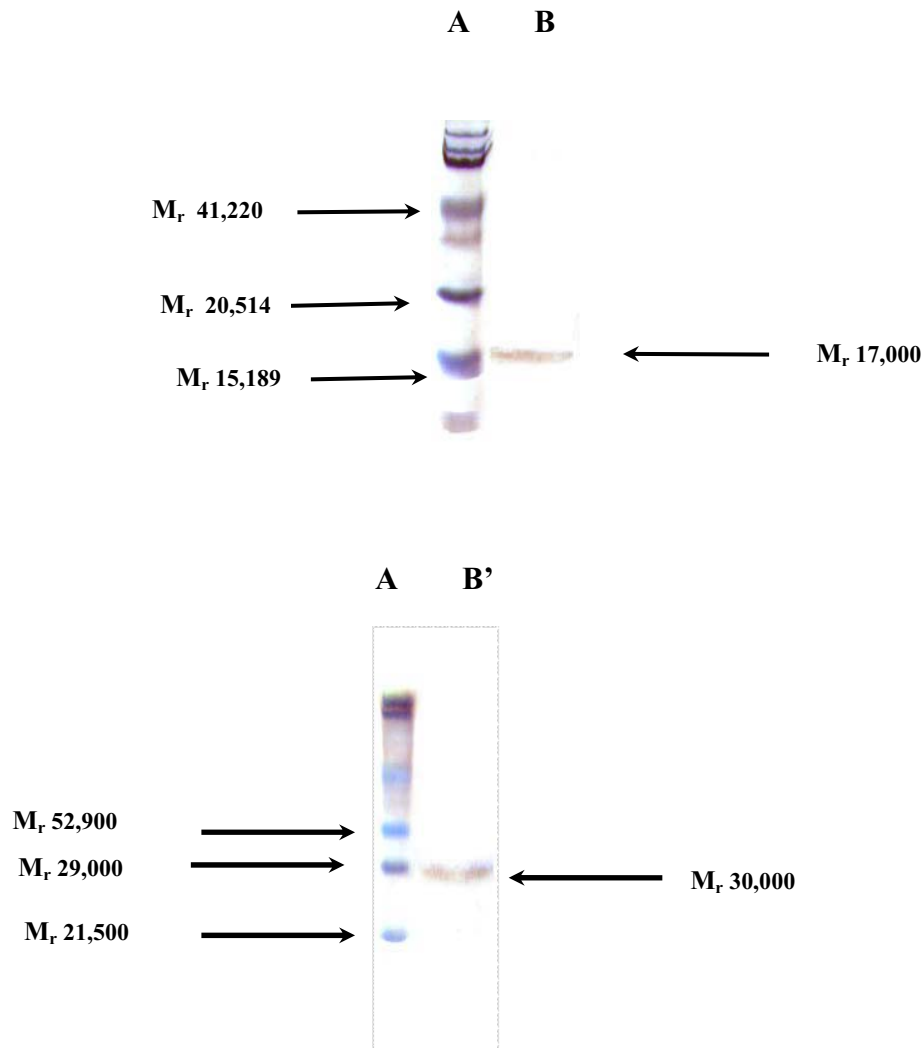
การเพิ่มจำนวนโมโนโคลนอลแอนติบอดีในช่องท้องหนู ได้ปริมาณ ascitic fluid ปริมาณ 30 และ 35 ml จากหนูชุดละ 10 ตัว ที่ฉีดด้วยโคลน 87 และ 131 ตามลำดับ ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ได้โมโนโคลนอลบริสุทธิ์ปริมาณ 6.42 และ 32 mg/ml หรือ 0.1926 และ 4.192 ตามลำดับ โดยสามารถยืนยันความบริสุทธิ์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีดังกล่าวได้จากแถบโปรตีน 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.



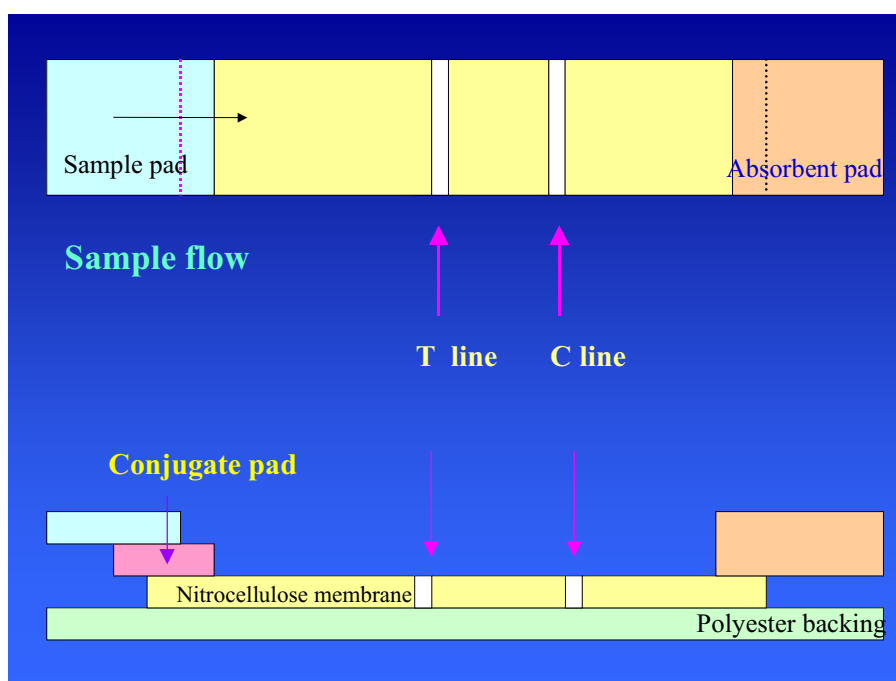
รูปที่ A.7. ผลการวิเคราะห์ปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ (โคลน 87) ต่อโปรตีนแอนติเจน 17 และ 30 kD โดยวิธี Western-Blot. A: แถบโปรตีนมาตรฐาน (तालतन)ขนาด low range (BIO-RAD); B, B': โมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ ซึ่งทำปฏิกิริยากับโปรตีน 17 และ 30 kD ตามลำดับ



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 µl/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 หยอดลงไปใน 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	+

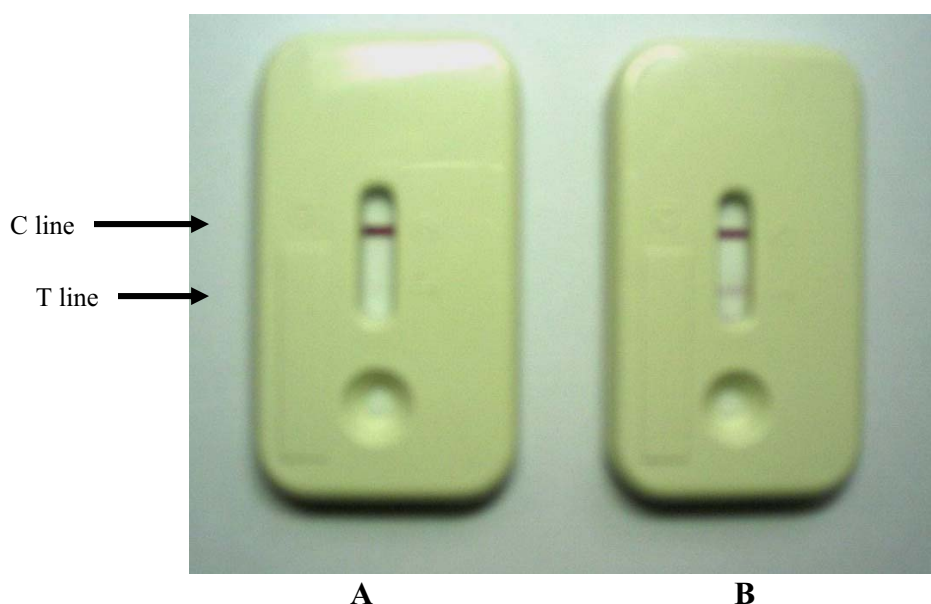
ND = ไม่ได้ทำการทดสอบ

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

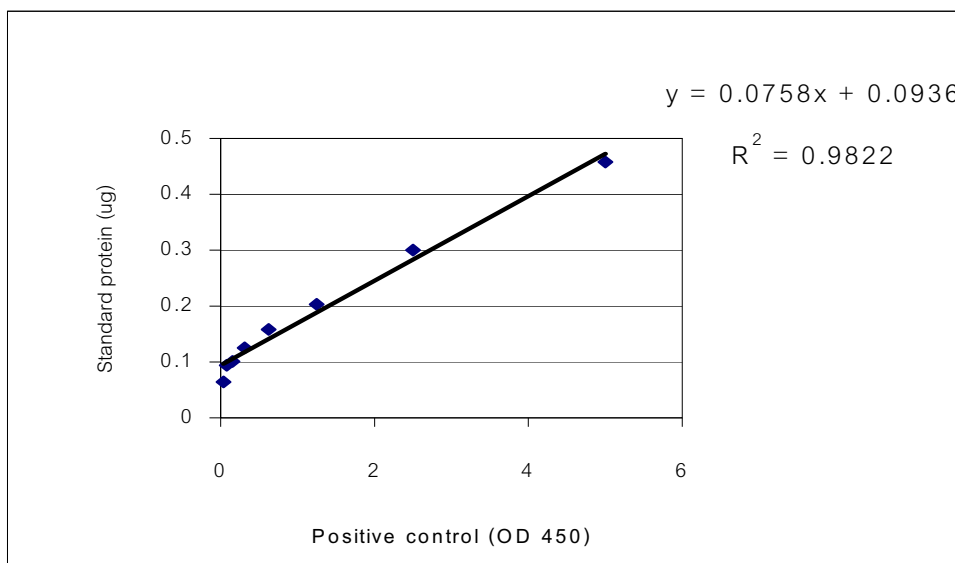
b.2) ขั้นตอนการตรวจหาโปรตีน 17 และ 30 kD โดยวิธี ELISA จากการศึกษาลักษณะที่เหมาะสมสำหรับหาโปรตีน 17 และ 30 kD ผลข้างต้นโดยใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 0.1 $\mu\text{g}/100 \text{ ul/well}$ ในการเคลือบเพลท บ่มที่ 4°C 1 คืน ล้าง 3 ครั้ง ด้วย PBS-T และใช้ 1 % BSA in PBS-T เป็น blocking solution 200 μl /well 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 เติมน้ำ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ 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 เติมน้ำ TMB substrate 100 μl /หลุม บ่มที่มืด 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 ซึ่งได้แก่กลุ่มเมมเบรนโปรตีนของอนุภาคยางและอนุภาคกันหลอด(อนุภาคลู

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 µg/ml) ปริมาตร 50 µl ไป coat ลงบนหลุม microplate ทำการอบ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการล้างแอนติเจนส่วนที่ไม่จำกับหลุมหรือที่เหลืออกโดยการล้าง 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 ต่อไปเติมตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจสอบไปหลุม 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) แล้วอบในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 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

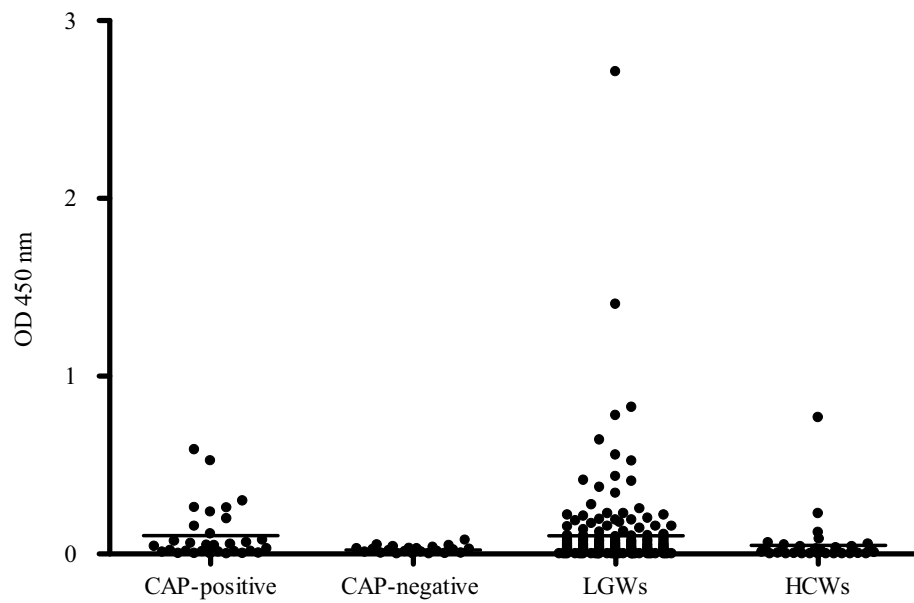
ค่า BFM specific IgE จากการใช้กลุ่มเลือดตัวอย่างจากคน 4 กลุ่ม (รูปที่ B.1) พบว่าค่าเฉลี่ย allergen specific IgE จากตัวอย่างซีรัมเลือดคนงานโรงงานถุงมือยาง (Latex glove worker, LGW) จำนวน 170 คนเท่ากับ 0.10 ± 0.26 OD โดยมีคนงานเพียง 38 คนที่มีค่า BFM specific IgE สูงกว่าค่าเฉลี่ย สำหรับค่าเฉลี่ย BMF specific 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⁻ ($0.02 + 0.07 = 0.09$) ในการตัดสินใจ 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 หากใช้เกณฑ์การตัดสินใจทำนองเดียวกับจากค่าเฉลี่ย SD ที่ได้จากกลุ่ม CAP⁻

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

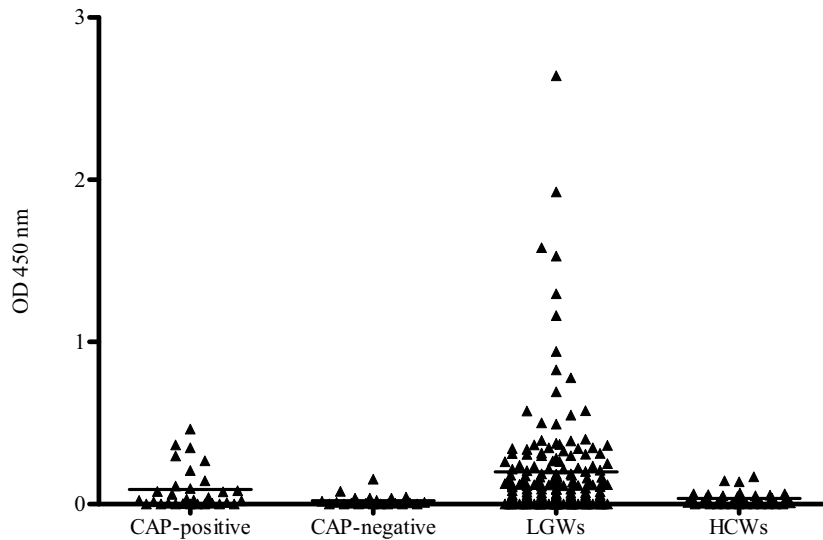
นอกจากนี้จาก plot แบบ scatter format (รูปที่ B.3) พบว่าค่า correlation ระหว่าง BFM specific IgE และ IgG ระหว่างซีรัมหมายเลข 4, 248 และ 253 มีระดับสูงสุด และโดยค่า OD สำหรับ specific IgG เท่ากับ 2.64, 1.16 และ 1.53 ตามลำดับ (ตารางที่ B.1) โดยที่ LGW หมายเลข 4 เท่านั้นที่พบว่ามีอาการแพ้โปรตีนจากยาง และผลจากการทำ skin prick test ก็เป็นลบทั้งหมด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าระดับ IgG มีอิทธิพลต่อการตอบสนองต่อการแพ้ หาก FcγRIIB ไปรวมเกาะกลุ่มหรือ co-aggregated กับ FcεRI 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 โดยเมื่อใช้ซีรัมจาก 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) แต่เมื่อใช้ซีรัมจาก CAP⁺ หมายเลข P1396 ก็ไม่พบว่า BFM โปรตีน 55 kD เป็น immunoreactive allergen ทั้งๆที่ซีรัม CAP⁺ จะมีระดับ IgE ที่สูง (รูปที่ B.4 A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในชุดทดสอบ CAP ยังขาดโปรตีน 55 kD ซึ่งหากเพิ่มโปรตีนตัวนี้ลงไปด้วยในชุดทดสอบ ด้วยก็จะทำให้สามารถวินิจฉัยการแพ้โปรตีนจากยางพาราได้แม่นยำขึ้น

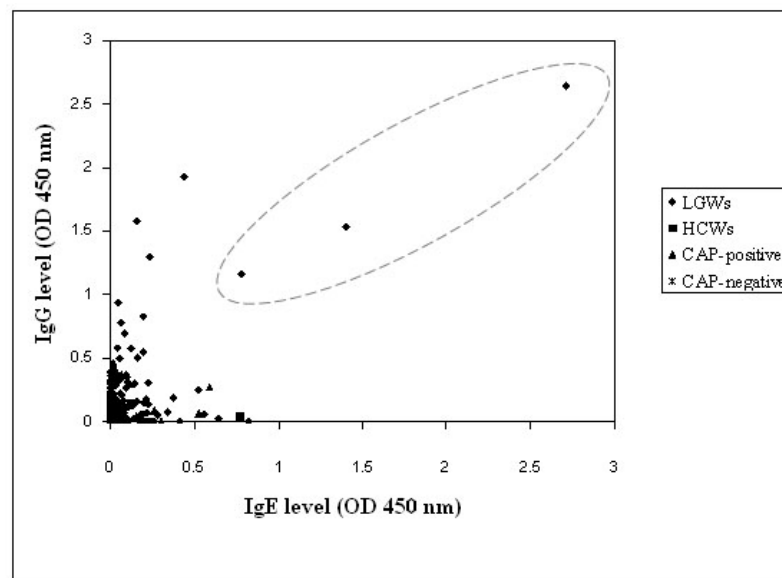
ถึงแม้โปรตีน BFM ขนาด 55 kD มีขนาดใกล้เคียงกับ Hev b 4 (50-57 kD) แต่ Hev b 4 เป็น latex allergen ชนิดที่ละลายน้ำได้ดีโดยอยู่ใน B-serum ดังนั้นโปรตีน BFM ขนาด 55 kD จึงน่าจะเป็นโปรตีนไม่ละลายน้ำชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดการแพ้ ซึ่งยังต้องทำการยืนยันโดยเทคนิคทางการโคลนนิ่งและแสดงออกต่อไป แต่เนื่องจากปริมาณโปรตีน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



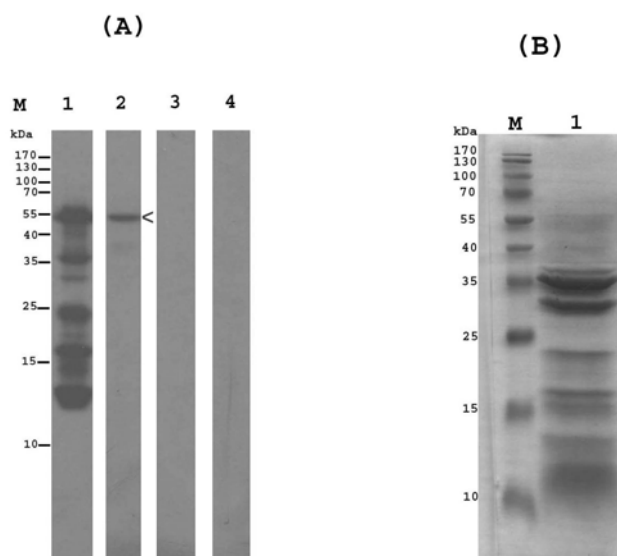
รูปที่ B.1 Relative comparison of specific IgE level from 31 CAP⁺, 22 CAP⁻, 170 LGW and 35 HCW samples by indirect ELISA. Each data point represents the specific IgE level in relation to the absorbance value at OD 450 nm. Solid horizontal lines represent the means of individual categories. These data 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

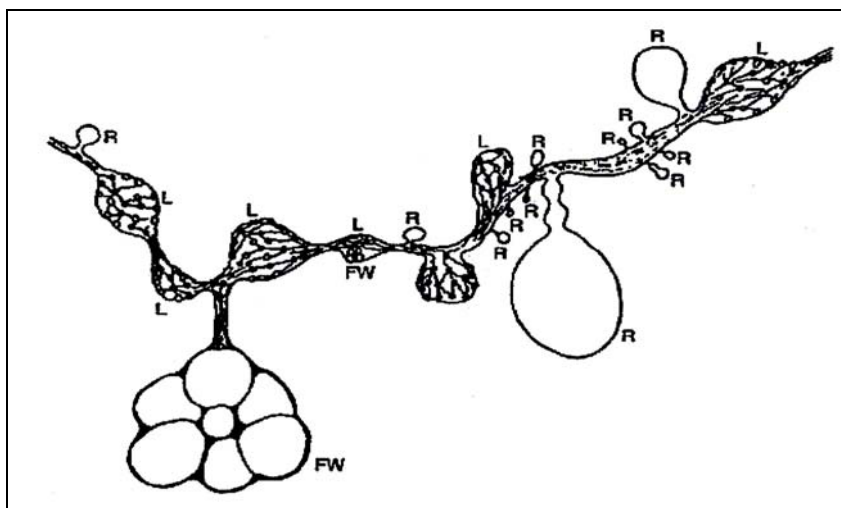
การศึกษาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยาง

ถึงแม้ว่าได้มีการศึกษาเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยางธรรมชาติ มาเป็นระยะเวลากว่า 50 ปีแล้ว ตั้งแต่ปี ค.ศ. 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 ซึ่งได้พบเอนไซม์ดังกล่าวมีอยู่ทั้งในส่วนของอนุภาคกันหloed และส่วนของ 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

คณะผู้วิจัยได้พบว่าของอนุภาคกันหloed (ซึ่งไม่ใช่จากอนุภาคยาง) (Wititsuwannakul et al., 2003) และเมมเบรนของอนุภาคกันหloed (Wititsuwannakul et al., 2004, Appendix 4) ที่สามารถเตรียมได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge ก็มีประสิทธิภาพในการสร้างพอลิเมอร์ยางเช่นกัน จึงทำให้น่าคิดว่ารายงานการศึกษาชีวสังเคราะห์ยางบนอนุภาคยางที่มีมาในอดีตนั้น เป็นการศึกษาบนอนุภาคยางบริสุทธิ์จริงๆ หรือเป็นอนุภาคยางที่ปนเปื้อนด้วยเมมเบรนโปรตีนจากอนุภาคกันหloed ที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์ยาง ที่หลุดออกไปหรือค้ำยเมมเบรนร่างแห ซึ่งได้มีการสาธิตไว้เป็นภาพวาด (ดั่งรูปด้านล่าง) โดย Southorn (1961) โดยจะเห็นได้ว่าอนุภาคในน้ำยางที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง (rubber) อนุภาคลูทอยด์

(lutoid) และ อนุภาค เฟรียส์ลิ่ง (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 อนุภาคยางจะลอยขึ้นไปอยู่ชั้นบนสุดโดยบริเวณใต้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟรียส์ลิ่งเกาะติดอยู่ด้วย เล็กน้อย ส่วนใหญ่ของอนุภาคลูทอยด์และเฟรียส์ลิ่งจะถูกเหวี่ยงไปอยู่บริเวณก้นหลอด 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 เฟรียส์ลิ่งซึ่งเป็นสมาชิกของ 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 โดยผสมอยู่ในบัฟเฟอร์ (50 mM Tris-HCl, pH 7.7) 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 assay mixture แล้วปั่นแยกตะกอนที่ 12000g นาน 45 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายในสารละลาย hexane:toluene (1:1) แล้วปั่นแยก

เอาส่วนที่ละลาย ไประเหยเพื่อลดปริมาตรลงแล้วตกตะกอน radiolabeled rubber บริสุทธิ์ ด้วยอะซิโตนหรือเอทานอล นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน toluene ปริมาตร 150 μ l ทำบริสุทธิ์ radiolabeled rubber ด้วยการตกผลึก ด้วยอะซิโตนแห้งเย็นปริมาตร 750 μ l 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 μ l 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

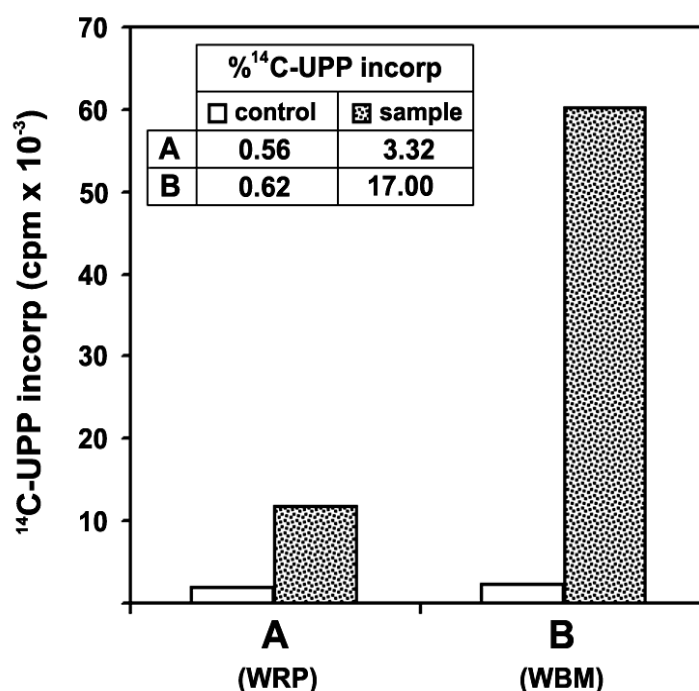
นำสารละลายใน tetrahydrofuran (THF) ที่มี 14 C-rubber บริสุทธิ์ละลายอยู่ไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel permeation chromatography (GPC) โดยใช้ซีรีของคอลัมน์ TSK gel (Tosho) ที่ต่อเนื่องกัน 4 คอลัมน์ มีค่า exclusion limit ดังนี้ 1.01×10^6 , 1.72×10^5 , 1.13×10^4 และ 1.30×10^3) การทำ GPC ใช้อุณหภูมิ 35°C และ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

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

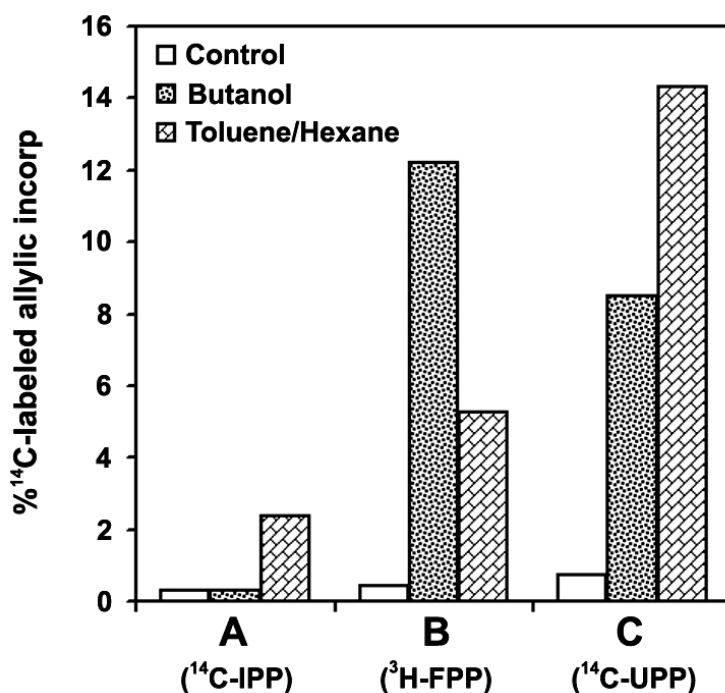
จากผลในรูปที่ C.1 จะเห็นว่าเมื่อใช้ 14 C-UPP เป็น allylic diphosphate initiator เมมเบรนโปรตีนของอนุภาคลูทอยด์และเฟรวิสร้าง หรือ อนุภาคมก้นหลอด (WBM) มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ยางได้มากกว่าอนุภาคขนาดเล็กถึง 5 เท่า โดยประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ยางของ WBM ที่ได้จากการใช้ 14 C-UPP เป็น allylic diphosphate initiator จะสูงกว่าที่ได้จากการใช้ 14 C-IPP และ 3 H-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) โดยน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ยางดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าหรือเพิ่มขึ้นเป็น 9×10^5 เมื่อนำไป incubate กับ WRP ที่มีการเติม 60 μ M IPP โดยมี MWD แบบ unimodal (รูปที่ C.5)

ผลของการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลยาง ที่สร้างโดยเมมเบรนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ของยางธรรมชาติ ทำให้ได้ความรู้พื้นฐานใหม่ที่สนับสนุนข้อสันนิษฐานของนักวิทยาศาสตร์ (Southorn, 1961) ยุคบุกเบิก ว่าโมเลกุลยางน่าจะถูกสร้างขึ้นในร่างแหเมม

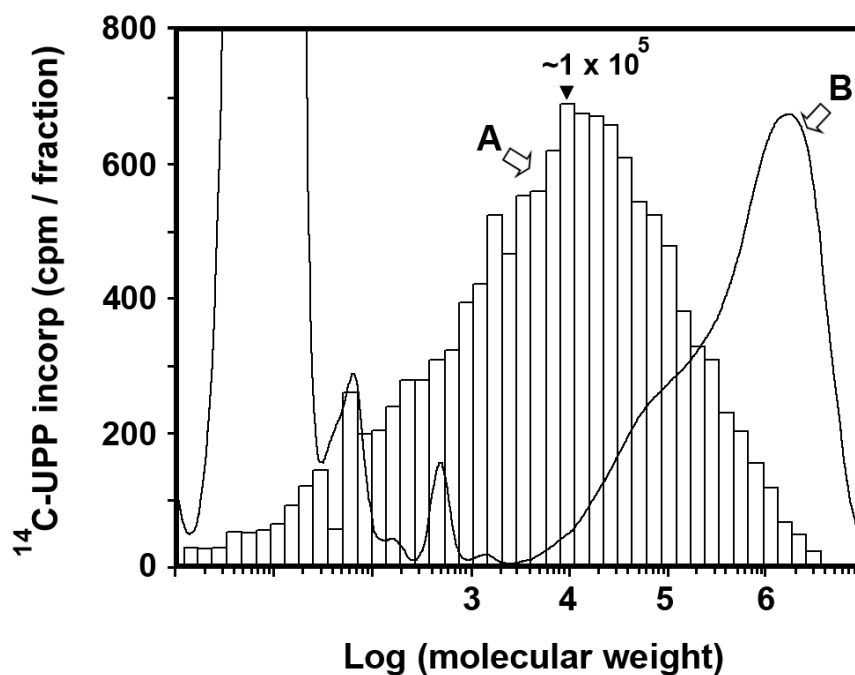
เบรนที่เชื่อมอนุภาคยาง อนุภาคลูทอยด์ และ อนุภาค เพรวีลิ่ง เข้าด้วยกัน โดยลำดับขั้นตอนการสร้างระดับ early elongation จะเริ่มจากอนุภาคกันหลุดซึ่งประกอบด้วยอนุภาคเพรวีลิ่งและอนุภาคลูทอยด์ ทำการสร้างได้พอลิเมอร์ที่มีขนาดเล็ก ($1 - 4 \times 10^5$) และมี MWD เป็นแบบ skewed unimodal หลังจากนั้นการสร้างระดับ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



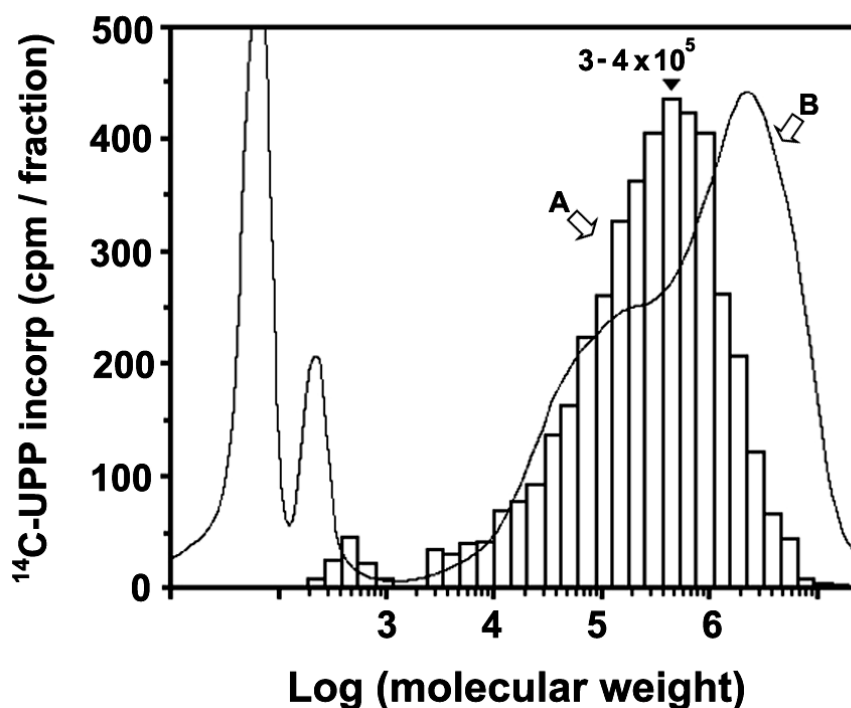
รูปที่ C.1 ชีวสังเคราะห์ยางโดย WRP (A) และ WBM (B) ซึ่งปริมาณที่ใช้เทียบเท่า น้ำหนักแห้งประมาณ 20 mg และมี ¹⁴C-UPP (354,000 cpm) เป็น allylic initiator โดยในปฏิกิริยาควบคุมจะใส่ 20 mM EDTA ระดับกิจกรรมแสดงในรูปของ % ¹⁴C-UPP ที่ถูก incorporate เข้าไปในโมเลกุลยางที่ได้จากการสกัด toluene/hexane (1:1, v/v).



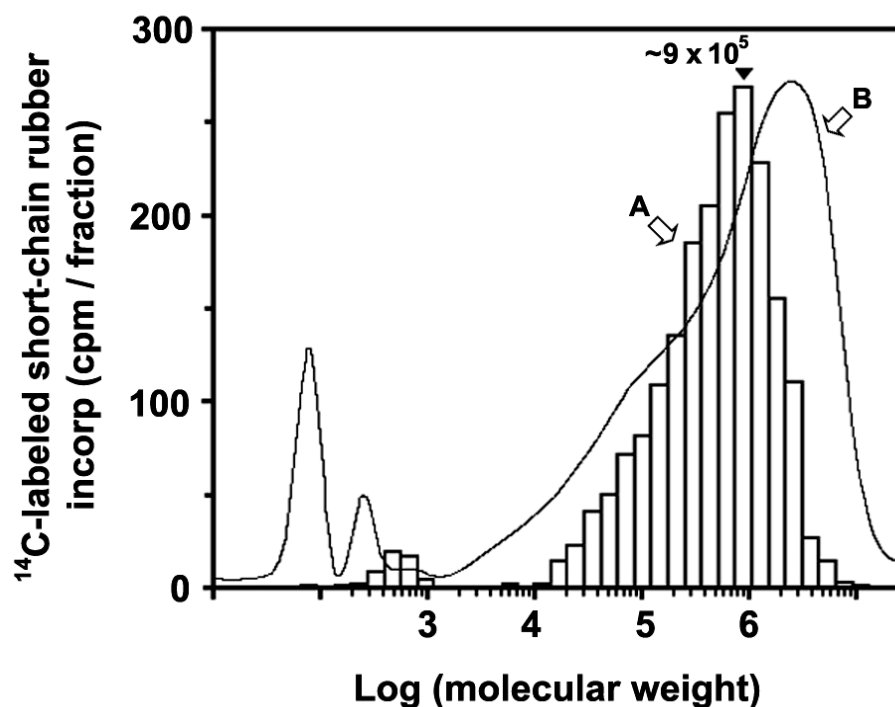
รูปที่ C. 2 อิทธิพลของ allylic isoprene ที่มีต่อชีวสังเคราะห์ยางโดย WBM (B) ปฏิกริยา ปริมาตร 200 μl ประกอบด้วย WBM (ปริมาณน้ำหนักแห้ง 20 mg), 60 μM IPP , radiolabeled allylic initiators [12.5 μM ^3H -FPP ,7 ci/mol(B) or 100,900 cpm ^{14}C -UPP] สำหรับปฏิกริยา (A)ไม่มี allylic initiator แต่มี 15 μM ^{14}C -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.

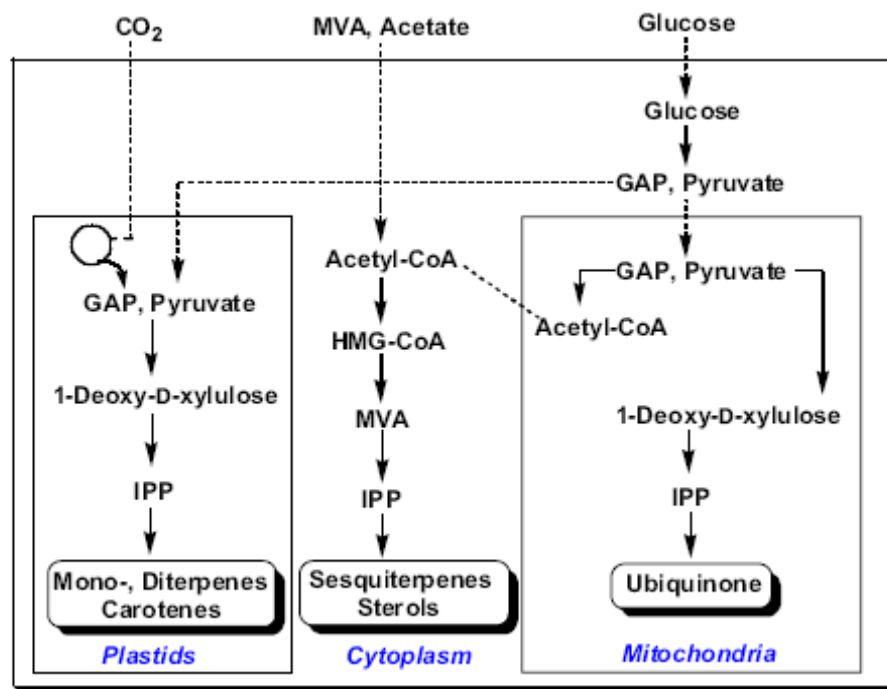


รูปที่ C.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ยางดังที่เพิ่มเมื่อนำพอลิเมอร์ยางที่สร้างโดย WBM (รูปที่ C.3) ไปincubate กับ WRP ที่มีการเติม $60 \mu\text{M}$ IPP โดยนำ radiolabeled rubber ที่แยกได้จาก origin spot หลังการทำ TLC ไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 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.

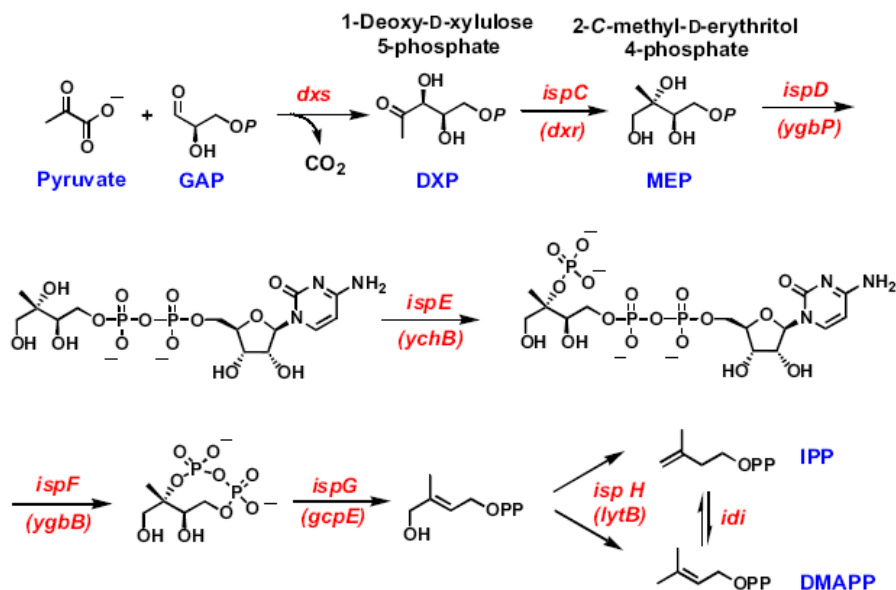
C.2) การ ศึกษาคุณสมบัติของอนุภาค เพรวิสสิ่งที่อยู่ในเครือข่ายร่างแห

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

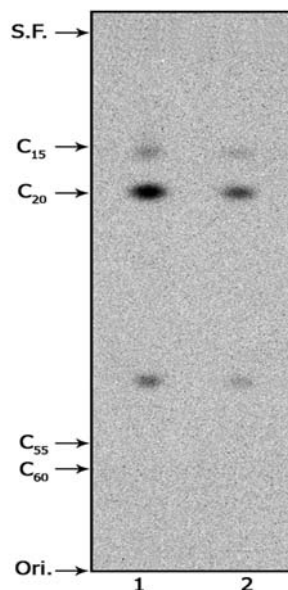
ทำการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR โดยการ amplify total RNA (1 กรัม) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วย primer ที่ออกแบบจำเพาะกับ DXR

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) และเนื่องจากการรายงาน 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 จากการใช้ 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-BAESKAISLDTSRF--NFIPKLSGGFSLRRNQGRGFGKGVKCSVKV---QQQQQPPFAWPGRA-VPEAPRQS-WDG	79
L. esculentum	1: MAENLIS-BAEIKSISLNSKSSYNLSHLFTFGGLSIRREKCSGAFKRVQCSA-----QLPPFAWPGRAVAEPGRQS--WDG	77
O. sativa	1: MAKKVVSPPGDLAAVSHLDSNRGG-AFNQKLVDFLQTRDRAVSL--RRTCCSM-----QQAPFAWPGRAVVEFGRRS--WDG	75
S. rebaudiana	1: MSLSYLS-PTQTNLITSDCKSQ--THLLKLGCGFCFKRKDVKLAG-KGIRCSA-----QPPFFFAWPGTALVDPGTKN--WDG	74
H. brasiliensis	1: MAENLIS-BAEIKSISLDTSKS--SHLTKLPGGFSKRRKDFGAAPGKKVQCSA-----QPPFFFAWPGRAFPDLGRKT--WDG	73
S. leopoliensis	1: -----	1
E. coli	1: -----	1

A. thaliana	80: PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVRRFKKALVAVRNESIVDELKALADLDYKLEIIPGEQGVIEV	167
L. esculentum	78: PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKALADMDKFEIIPGEQGVIEV	165
O. sativa	76: PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKALADCEWKEIIPGEQGVIEV	163
S. rebaudiana	75: PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKALADADYMEIIPGEQGVIEV	162
H. brasiliensis	74: PKPISIVGSTGSGIGTQTLDIVAENPKDFRVVALAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKALADVEEKEIIPGEQGVIEV	161
S. leopoliensis	1: MKAVTLIGSTGSGIGTQTLILEQYPPDFRIVGLAAGSNVTLIADVVKTFPKLVAVRNESIVDELKALADLDNPELHUTGEAGVIEV	88
E. coli	1: MKQLTLIGSTGSGIGTQTLIVRRHNPHEFRVVALVAGKNVVRVVEKLEESRYAVMDDASAKLKKIMLQQQSGRSRTEVLSGQCAACDM	88

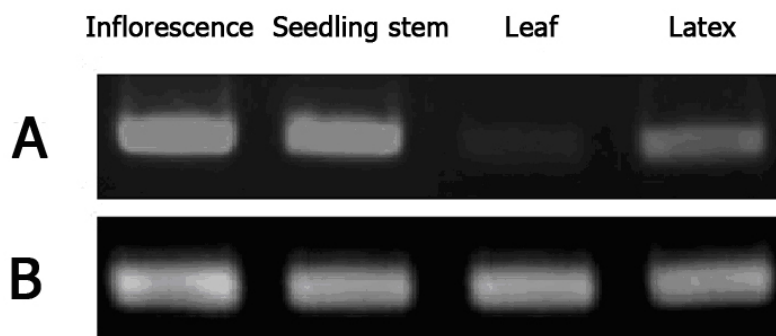
A. thaliana	168: ARHPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGF-FVLPIAKHKVNVKILFADSEHSAIFQCIQGLPE---GA-----	246
L. esculentum	166: ARHPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGF-FVLPIAKHKVNVKILFADSEHSAIFQCIQGLPE---GA-----	244
O. sativa	164: ARHPEAVTVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGF-FVLPIAKHKVNVKILFADSEHSAIFQCIQGLPE---GA-----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

A. thaliana	247: --LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFENNMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMTETQ	332
L. esculentum	245: --LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFENNMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMTETQ	330
O. sativa	243: --LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFENNMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMTETQ	328
S. rebaudiana	242: --LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFENNMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMTETQ	327
H. brasiliensis	241: --LRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFENNMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGAGYDDIEIVIH PQSI IHSMTETQ	326
S. leopoliensis	176: AGLRRRIILTASGGAFRDWPFVKLMEVKVADALKHFENNMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGLDYDDIEIVIH PQSI IHSMTETQ	263
E. coli	176: NGVVSILITSGGGPFRETEPLRDLATMTDPDCAERHFNNSMGKKITVDSATLENKGLEVIEAHYLFGLDYDDIEIVIH PQSI IHSMTETQ	263

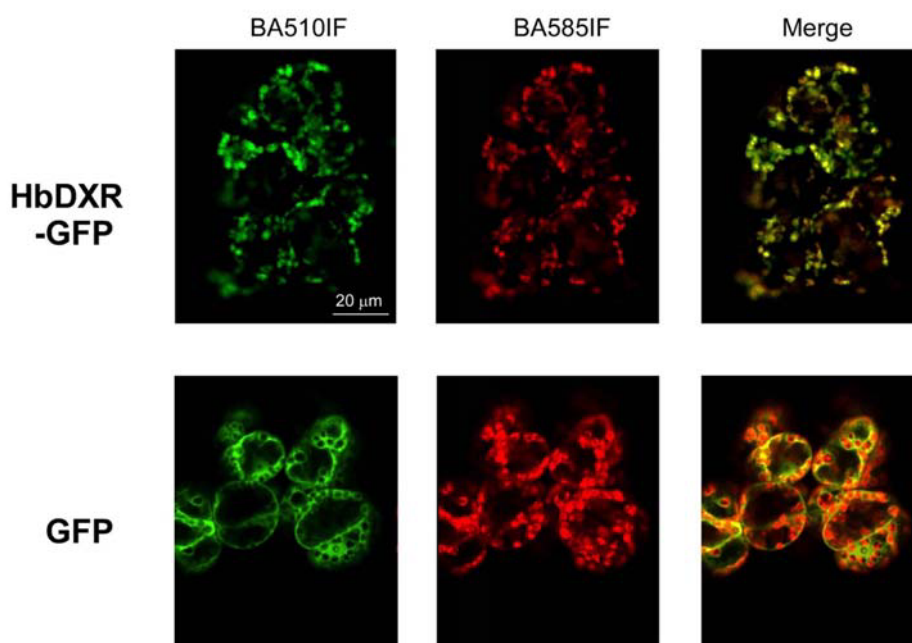
A. thaliana	333: DSSVLAQLGWPDMLRPILYITMSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID	420
L. esculentum	331: DSSVLAQLGWPDMLRPILYITMSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID	418
O. sativa	329: DSSVLAQLGWPDMLRPILYITMSWPDRIYCESEITWPRDLCKLGSITFRAPDNVVKYPSMDIAYAGRAGGTMTGVLSAANEKAVEMFID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

A. thaliana	421: EKIGYLDIFKIVELTCDHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVHA	477
L. esculentum	419: EKIGYLDIFKIVELTCDHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVHA	475
O. sativa	417: EKIGYLDIFKIVELTCDHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVFA	473
S. rebaudiana	416: EKIGYLDIFKIVELTCDHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVFA	473
H. brasiliensis	415: EKIGYLDIFKIVELTCDHHRNEIVTSPSLEEIVHYDLWARDYAASLQPSGL-SFVFA	471
S. leopoliensis	349: EKIHFSIPRLIERACDRHQTEWQQCPESIDDIHAYDWARDYQVFCASYCLESVV	402
E. coli	349: COIRFTDIAAIN-TEVLEKMEMREPOCV-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

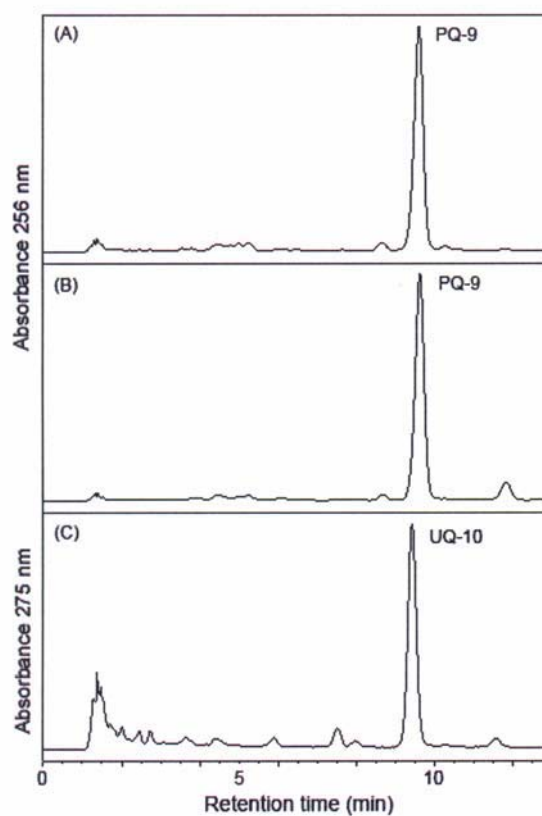
ทำการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR โดยการ amplify total RNA (1กรัม) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆด้วย primer ที่ออกแบบจำเพาะกับ HbSDS

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)

```

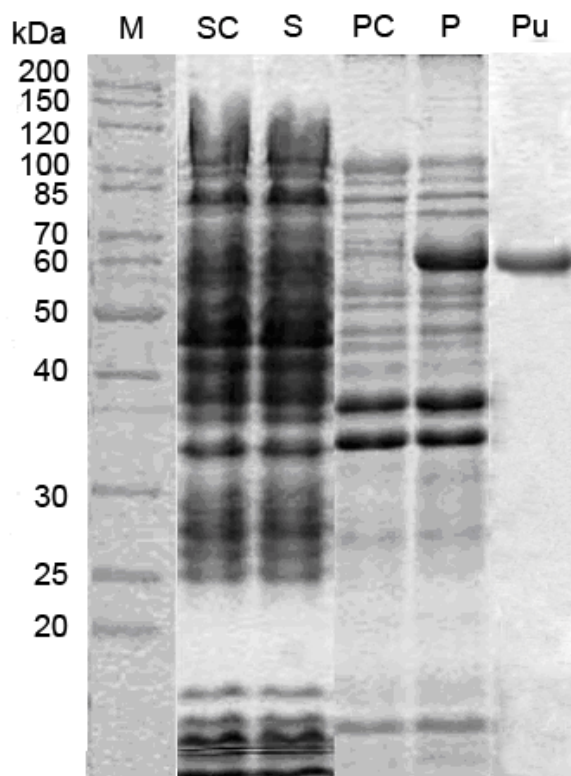
1  AATCACTGGCCTCAAACCTCAAACCTGATAAGAACTCCAAGACAAGACACGGTCTATGTGGGCTTATTGGATCCACGAGTGGAGAAGTCCCACTTCTGT
101 CGTCTGTGAAAGAGAACTTCTGAACCTGGAAAACCATTCGACTTCTTTTATTCTTTTGGATTCTTTCAAGTTTCCATCAGAAACCTGTTTTGTTTTTC
201 TTCTTTTCACTCTATTTTCTTGTCTGTTTGTGGCTTATGGCAATCTGAACGAGATTGCTATCTGGGTTTGGATTGGAAGTCAAATTTCTTTGCTTTCT
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 TTGGTGTGAGTTTCTTCGACCAAGGCCCTGAGACTTTACTTAACGGGGTGTAGTCAAGATCCTGCTGTAATTTGAAGAGTCAAGAGGCCAATTTCA
    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 CTGATCAGATATTTGGTGTGGTGGGAAAAGGATGCGACCAAGCTTTGGTATTCTAGTGTCAAGAGCCACAGCAGAAATAGTAGGGTTAAAAGAAGTCAAC
    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 TACGAAACATCGACGTTTAGCAGAGATCATTGAGATGATCCATCTGCAAGCTTAATTCATGATGATGACTAGATGAAAGTAACATGCGAAGAGGAAAA
    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 CTGTGATCAAGAGCTATTACAAAACCTGCCTCTTTAATTGCTGCAAGTACCAAGAGCTGCTATTTTGTGTTGACTGCGATGTTGAAGTCTGAGGAGTA
    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 TATGAATATGTAAGAACTTGGTCTGTCTTCCAAGTTGTTGACGAGCTACTGGATTTTACGAGTCAAGAGCAGCTGGGGAAGCCAGCTGGCAGTG
    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 GOCCAAACAGAAATAACTCCGCAATTTTCTGGTATACAGATTTTGTGGCCATCAATAATGTGAAGCTTCTTTATGTATTTTGTGATTTTCAAAAAA
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)

At SPS1	1 : M-M-TSCRNIDLGTMMA---CGCG--R-RQ---FPSLAKTVCKFT-SSNRSYGG-L-----VGSC-KAVPTKSKEISLLNGIGQSQT	70
At SPS2	1 : MMM---SCRNIDLGTSVLDHS-CSSSSTS-RRFLFGNSSKTVCMIG-G--RSCVGNLV-FLRRDLATC-RAVPAKSKEISLVNGIGQDQTV	81
Hb SPS	1 : M-MSMTUCYSLD FGRTVFDLAACGCSNA-SIDRCSVNRNARSVYR-TCNRDYAARRSPYCRDSAWC-RVSSSTKAPETLLN-GVSQDFAV	85
An SPS	1 : -----	1
Rc SPS	1 : -----	1
Ec OPS	1 : -----	1
Hb GGPS	1 : -----MSSV-NLGSWHTSYVLNQATRS-RSKSKS-FSLPFPNPLKSLAISFATRKSE-RPISVSIAITKEEETL	66
At SPS1	71 : SFDLKQESKQPSLVTLFELVAVDLQTLNDN-LLSI-VGAENPVLSAAEQIFG-AGGKMRPGLVFTV-SRATAELAGLKEITTEHRL	156
At SPS2	82 : MLNLRQESRKPISELTIFEVADDLQRLNDN-LLSI-VGAENPVLSAAEQIFS-AGGKMRPGLVFTV-SRATAELAGLKEITVEHRL	167
Hb SPS	86 : N--LKE SRG-PISLINVEAVAGDLQTLNQN-LRSI-VGAENPVLSAAEQIFG-AGGKMRPGLVFTV-SRATAELAGLKEITTKHRL	168
An SPS	1 : -----MTPATEL---ETPVEADLRILADN-LKQL-VGNRHILFAAAEHLFG-AGGKRIRPAIVLTI-SRATHLDQGI---TPRHRL	73
Rc SPS	1 : -----MAIDFKQDILAPVAQ-DFAAMDQF-INEG-ISSKVALVMSVSKHVVE-AGGKMRPIMCLIA-AYACGET-NLKHAQKLAAI-	76
Ec OPS	1 : -----MNLEK---INELTAQDMAGVNAA-ILEQ-LNSDVQLINQLGYIYS-GGKRIRPMIAVLA-ARAVGYEGNA-HVYIA-AL-	72
Hb GGPS	67 : QEEQNNPPP---SFD---GKSYMLQKNSINQAL-EAAIPLQEKAKIHESMRYSLAGGKRVRLALC-LAACELVGNDSS---NMPAACA	146
I		
At SPS1	157 : AEIDEMIHTASLIHDDV--LDESDMRRGKETVHELFCTRVAVLAGDF--MFAQASWYLANE--MLETELISQVIKDF-ASGEIK-QAS	238
At SPS2	168 : GEIDEMIHTASLIHDDV--LDESDMRRGKETVHELFCTRVAVLAGDF--MFAQASWYLANE--MLETELISQVIKDF-ASGEIK-QAS	249
Hb SPS	169 : AEIDEMIHTASLIHDDV--LDESDMRRGKETVHELFCTRVAVLAGDF--MFAQSSWYLANE--MLETELISQVIKDF-ASGEIK-QAS	250
An SPS	74 : AEIDEMIHTASLIHDDV--VDESEVRRGVPVHESLFGNRIALAGDF--MFAQSSWYLANE--MLETELISQVIKDF-ATGEIQ-QGL	155
Rc SPS	77 : --I-EMHTAILHDDV--VDESGVRRGVPVHESLFGNRIALAGDF--MFAQSSWYLANE--MLETELISQVIKDF-ATGEIQ-QGL	155
Ec OPS	73 : --I-EMHTAILHDDV--VDESDMRGKATANAAFGNAASVLGDE--IYTRAFQMMTSLG--SLKLEVMSEAVNVI-NECEVL-QLM	151
Hb GGPS	147 : V--EM-LHMSLIHDDLPCHNDNDLRRGKPTMIVFGEDVAVLAGDALLAFEFHIAVSTLNVSSARIVRAVGLAKAIGELVAGQVV	233
II III IV		
At SPS1	239 : SLFDGDTKLDEYLLRSFY---KTASLVAASTKGAAIFSRVPEPDVTEQMVEFKKNLGLSFQIVDDILDFQTQSTEOLGRPAESDLAKGNLT	324
At SPS2	250 : SLFDGDTVKLDDYMLRSFY---KTASLVAASTKGAAIFSKVESKVAEQMYQFCKNLGLSFQIVDDILDFQTQSTEOLGRPAANDLAKGNLT	335
Hb SPS	251 : SLFDGDTVELEVLLRSFY---KTASLVAASTKGAAIFSGVDSVAEQMYEYFKKNLGLSFQIVDDILDFQTQSAEOLGRPAESDLAKGNLT	336
An SPS	156 : NRPLASISIEYVLEYSFY---KTASLVANSSKAAAGLLSEVSPETABHLYAERHGLGAFQIVDDILDFQTQSTTDTLGRPVESDLKSGNLT	241
Rc SPS	156 : AQHQPDITTEDIYLQIING---KTSRLFELATEGAAILAGK-PEYREPLRRFAGHFGNAFOITDDILDWTSADATLGRNIGDLMGCKPT	240
Ec OPS	152 : NVMDPDITEENYMRVIYS---KTARLFEAAAQCSGLAGCTPEEEKGLQDYERYLGTAFOLIDDLDYNADGEOLGRNVGDDLMGCKPT	237
Hb GGPS	234 : D-INSEGSSEVDLELEFIHHTAKLLEGAVVLGALLGGGTDEEVEKLKRYARDIGLLFQVDDILDWTKSSQELGRTAKGDLVADKVT	322
V VI		
At SPS1	325 : APVIFALEREPRLEI-IESEFCEACS--LEEAIEAVTKGGGIKRAQELAREKADDAIK-MNQCLPRSGFRSAEDMVLYNLEID	406
At SPS2	336 : APVIFALENEPRLEI-IESEFCEPCS--LEEAIEIVNRGGGIKKAQELAKEKAELALK-MNQCLPRSGFRSAEDMVLFNLEID	417
Hb SPS	337 : APVIFALAEKPKLEI-IESEFCEPCS--LEEAIEIVNRGGGIKKAQELAKEKADLAIQ-MNQCLPRGVFQSHLKEMLVLYNLEID	418
An SPS	242 : APVIFALAEKPYLE-VLIEREFAQED--LEQAELIQDSGCIQSSRELAHHHTKLATE-HUATLPPSESHQALIKIAEYAISSLY	323
Rc SPS	241 : LPLIAMQNTQGEQDQLRRSIATGTSQLEQV-IAIVQNSGALDYCHKRATEETERALQALEILPESTYRQATVNLRLALDRIQ	325
Ec OPS	238 : LPLIAMHHGTPEQAQMTAIEQNGRHLLEPVLEAMNACGSLWTRQRAEEEDAKAIAAQVLDPTFWREALIGLAHIAVQRDR	323
Hb GGPS	323 : YPKLLG-----LEKSREFAEKLNRDAQ-----EQ-IA---GFD---PEKAA---PILALANYIAHNRQ	370
VII		

รูปที่ C.14 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. (Phatthiya et al, 2007. 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)

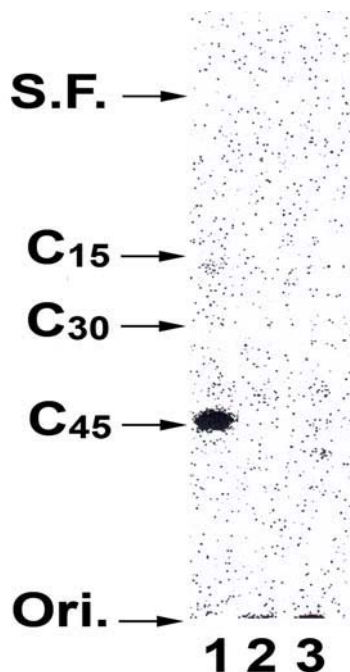


Fig.C.16 TLC autoradiogram of the prenol alcohols obtained by enzymatic hydrolysis of the products formed by the reaction with cell-free homogenate of IPTG induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 1), non-induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 2), and *E. coli* harboring pET-32 (lane 3). (Phatthiya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

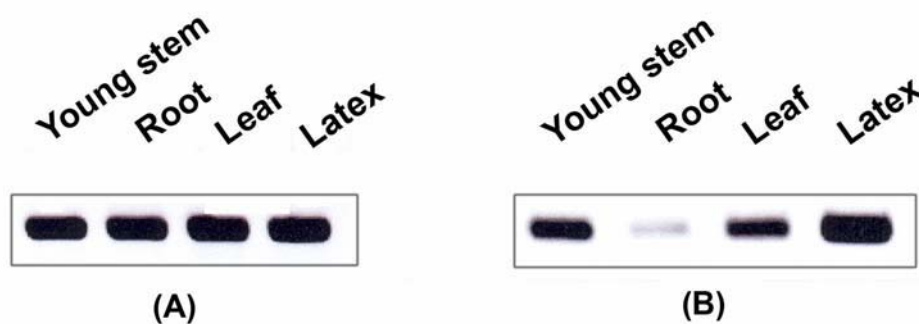


Fig.C.17 Analysis of mRNA expression patterns by RT-PCR. (A) Control (18S rRNA); (B) mRNA expression of HbSDS (35 cycles). (Phatthiya et al, 2007. Appendix 7)

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., Rattapittayaporn, 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)

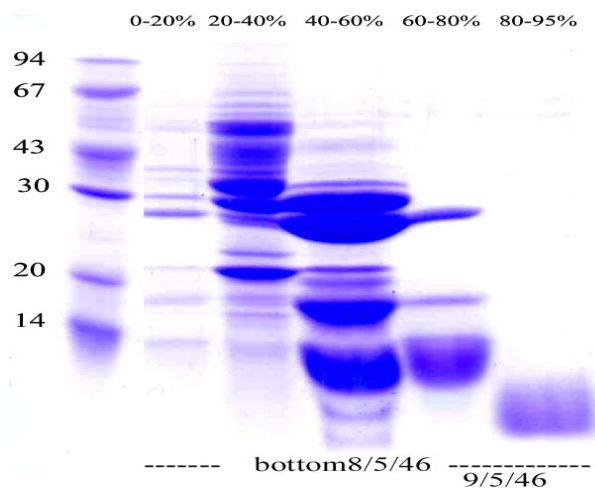
g) การทำบริสุทธิ์สาร anti-candida จาก B-serum

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

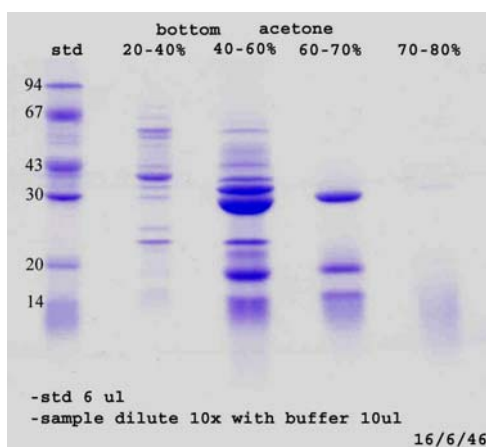
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

a) การทำบริสุทธิ์ และการวิเคราะห์มวลและกรดอะมิโนของ anti-candida protein

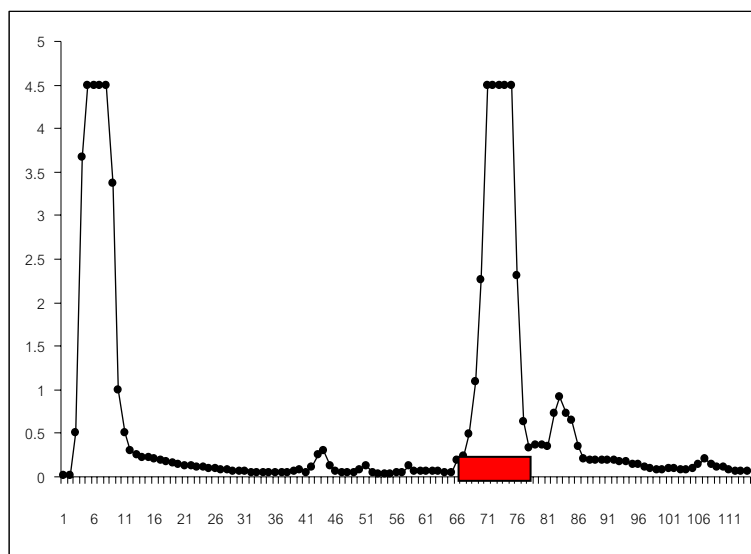
การทำบริสุทธิ์ anti-candida protein สามารถทำได้โดยการนำ bottom fraction ที่แยกได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสด ไปผ่านการทำ acetone fractionation ซึ่งพบว่าโปรตีนที่ตกตะกอนในช่วงความอิ่มตัวระหว่าง 60-80% จะมี anti-candida activity (รูปที่ D.1) เมื่อนำ active fraction นี้ไปทำ acetone fractionation ซ้ำใช้ถึงขั้น 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

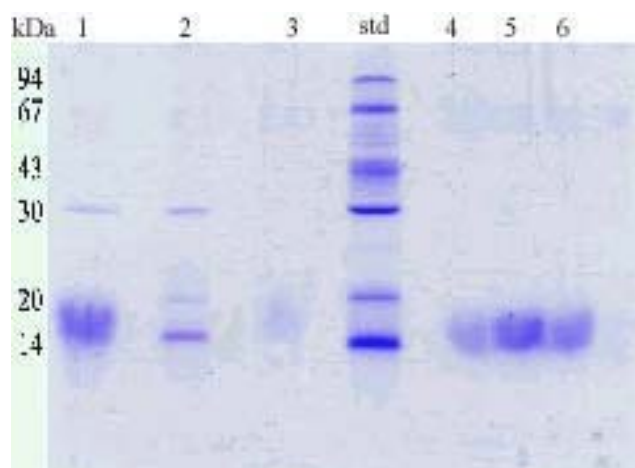


รูปที่ D.2 SDS-PAGE ของโปรตีนที่ได้หลังการนำ bottom fraction ไปตกตะกอนด้วย acetone ช่วงความอืดัว 20-40%, 40-60%, 60-70% และ 70-80% ตามลำดับ



รูปที่ D.3 การนำ anti-candida protein ที่ได้จากการตกตะกอนช่วงความอืดัวของ 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

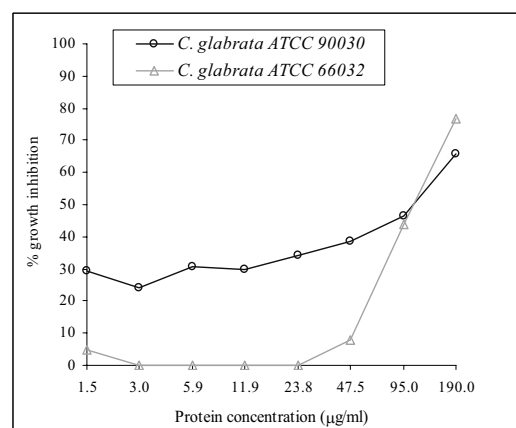
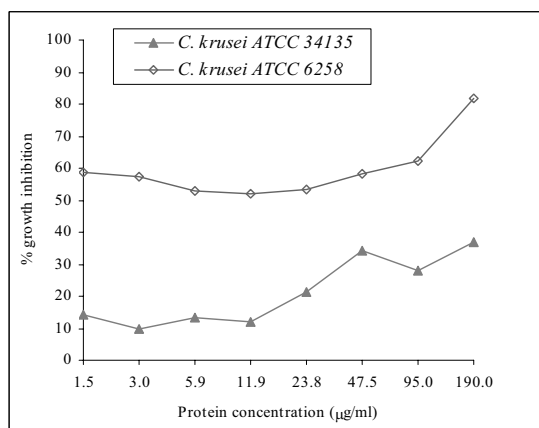
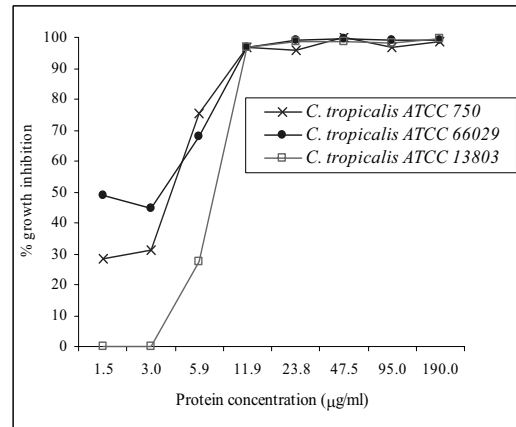
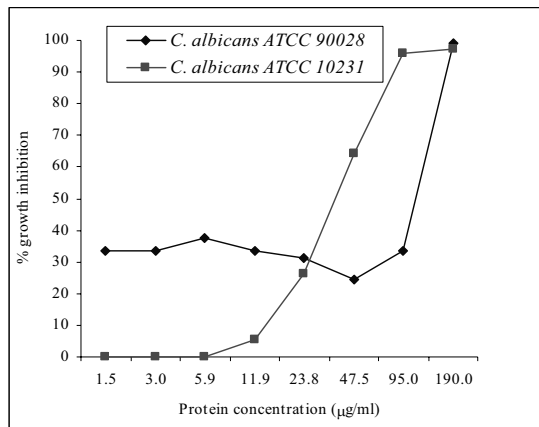
b) คุณสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งแคนดิดาของ anti-candida protein (hevein)

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 ตัวยับยั้งโปรตีนเอสบริสซูร์ที่แยกได้จากส่วนของ 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)