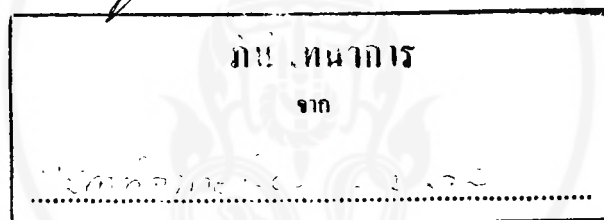


5 NOV 1993

PROPERTY AND FUNCTIONAL STUDY OF
RUBBER LATEX LECTIN

CHANCHAI SAKULBORRIRUG



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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1993

24231

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ของเลคตินในน้ำยางพารา

ผู้วิจัย ชาญชัย สกุลบริรักษ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 3 กันยายน พ.ศ. 2536

บทคัดย่อ

บี-ซีรัม เลคตินที่พบในน้ำยางจากต้นยางพารา มีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 38 กิโลดาลตัน ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน คือ 25.6 และ 15.7 กิโลดาลตัน เลคตินนี้มีความทนต่อ pH ได้ในช่วง pH 6 ถึง 10 และสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงจากสัตว์หลายชนิดจับกลุ่มกันได้ จากการทดสอบความจำเพาะต่อน้ำตาล พบว่า บี-ซีรัมเลคตินสามารถถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย น้ำตาล และไกลโคโปรตีนหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า เลคตินนี้ต้องอาศัยแคลเซียมไอออนในการเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงด้วย

เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสที่พบในสารละลายสกัดจากเปลือกยางพารา เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์เดี่ยว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 50 กิโลดาลตัน และเป็นเอ็นไซม์ที่มีความว่องไวจำเพาะสูงมาก เอ็นไซม์นี้ทำงานได้ดีในภาวะ pH ประมาณ 5.5 และทนทานต่ออุณหภูมิได้ถึง 50°C อาศัยการมีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน ทำให้เอ็นไซม์นี้ถูกสกัดให้บริสุทธิ์ได้ง่ายโดยการแยกด้วย ConA-Sepharose คอลัมน์

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง บี-ซีรัม และสารละลายสกัดจากเปลือกยางพารา พบว่ามีเลคตินในสารสกัดจากเปลือกยางพาราที่ทำให้ไกลโคโปรตีนในบี-ซีรัมเกิดการจับกลุ่มตกตะกอนได้ ไกลโคโปรตีน 3 ชนิดที่จำเพาะต่อเลคตินนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 31.6, 27.8 และ 18 กิโลดาลตัน เลคตินจากเปลือกยางพาราสามารถกระตุ้นการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้เพียงไม่กี่กลุ่ม ซึ่งแตกต่างจาก บี-ซีรัมเลคติน การทดสอบเลคตินด้วยเอ็นไซม์โปรตีเอส พบว่า ประสิทธิภาพของเลคตินหายไปเป็นการยืนยันถึงคุณสมบัติการเป็นโปรตีนของเลคตินนี้ ในการทดสอบความจำเพาะต่อ

น้ำตาลของเลคตินพบว่ามีเพียง fetuin และ asialofetuin เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเลคตินได้ เลคตินจากเปลือกยางพาราที่มีความทนทานต่ออุณหภูมิได้ถึง 60°C และทนต่อ pH ได้ในช่วงกว้างจาก pH 5 ถึง 11

เปอร์ออกซิเดส-เลคตินเป็น bifunctional protein ที่พบในสารละลายสกัดจากเปลือกยางพารา โดยผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE และ Bio-gel คอลัมน์ ซึ่งพบว่า ทั้งเปอร์ออกซิเดสเอ็นไซม์ และเลคตินถูกสกัดออกมาด้วยกันเสมอ เป็นการยืนยันว่าทั้ง 2 คุณสมบัติขึ้นอยู่กับโปรตีนเดียวกัน โปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุลรวมเท่ากับ 141 กิโลดาลตัน ประกอบขึ้นด้วยหน่วยย่อย 4 หน่วยซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 36.5 กิโลดาลตัน ในการศึกษา Kinetic ของเปอร์ออกซิเดส-เลคติน พบว่า แตกต่างจากเปอร์ออกซิเดสเอ็นไซม์ อย่างไรก็ตามเอ็นไซม์ทั้งคู่ไวต่อการถูกยับยั้งด้วยไซยาไนด์ และ เอไซด์ได้เหมือนกัน แสดงว่าทั้งคู่เป็นโปรตีนที่มี Heme เป็นส่วนประกอบ ซึ่งความไวในการถูกยับยั้งด้วยไซยาไนด์ และเอไซด์ นี้พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่มี Heme เป็นส่วนประกอบทั้ง 2 นี้ไวต่อการยับยั้งได้เหมือนกัน แม้ว่าคุณสมบัติทางโมเลกุลต่างกันก็ตาม

Thesis Title Property and Functional Study of Rubber Latex Lectin.
Name Chanchai Sakulborrirug
Degree Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisor Committee
 Dhirayos Wititsuwannakul, Ph.D.
 Prapon Wilairat, Ph.D.
Date of Graduation 3 September B.E. 2536 (1993)

ABSTRACT

Lectin in B-serum of centrifuged rubber latex was purified to homogeneity with molecular weight of 38 kD dalton comprising two different subunits of 25.6 kD and 15.7 kD. The purified B-serum lectin was stable in the range of pH 6-10. The lectin showed wide spectrum of red blood cell hemagglutination. Sugar specificity study of B-serum lectin showed inhibition of hemagglutination by several monosaccharides and certain glycoproteins. It was also found to be a Ca²⁺-dependent lectin.

Peroxidase enzyme was found in *Hevea* bark extract and purified to homogeneity with molecular weight of 50 kD as monomeric protein. The *Hevea* peroxidase enzyme display a very high specific activity, up to several thousand folds higher than the commercial enzyme. Optimal pH of the enzyme was found to be around 5.5 with thermal stability up to 50°C. The glycoprotein nature of the enzyme made it possible to be easily purified with Con A-Sepharose affinity chromatography.

Study on interaction between B-serum and *Hevea* bark extract showed the presence of lectin in bark extract which induced aggregation and precipitation of B-serum glycoproteins. Three specific glycoproteins in B-serum of molecular weight 31.6, 27.8 and 18 kD were precipitated by bark lectin. The bark lectin showed narrow

range of red blood cell hemagglutination which was different from the B-serum lectin. The lectin activity was lost upon protease treatment, confirming the protein nature of bark lectin. Sugar specificity study showed only glycoprotein fetuin and asialofetuin could inhibit hemagglutination. The bark lectin was found to be heat stable up to 60°C and 50% activity remaining at 70°C. It was also found to be stable over a broad pH range of 5-11.

Peroxidase-lectin, a bifunctional protein, was found in *Hevea* bark extract upon purification by DEAE and Bio-gel column chromatography. The co-purification of peroxidase and lectin confirmed that the two activities were present in the same protein molecule. Peroxidase-lectin was purified to homogeneity with native molecular weight of 141 kD. It was a tetrameric protein composing of the same monomer of molecular weight 36.5 kD. Peroxidase-lectin as a bifunctional protein displayed dual functions on the same entity. This was the first report on the discovery of peroxidase-lectin, an enzymic lectin. Study on kinetics of peroxidase-lectin revealed that it had different kinetics parameters from peroxidase enzyme. However, they were both sensitive to inhibition by cyanide and azide which indicated that they were both the heme proteins. The sensitivity to cyanide and azide inhibition was about the same when considering the K_i values from the Dixon plots. The results reflected the fact that both heme proteins were subjected to similar degree of sensitivity to the effect of inhibitors despite the finding that they were of different molecular nature.