27 JUN 2001

RUBBER PARTICLES AGGLUTININ IN LATEX

DARANEE TONG -IN

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2001

ISBN 974-665-656-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
D 213 ร
2001
C.2

Copyright by Mahidol University

4036413 SCBC/M : MAJOR : BIOCHEMISTRY ; M.Sc. (BIOCHEMISTRY)
KEY WORDS : RUBBER TREES (*HEVEA BRASILIENSIS*)/ *HEVEA* RUBBER LATEX/LECTIN/RUBBER PARTICLES/ AGGLUTINATION/ CHAMPAADA (*ARTOCARPUS INTEGER*)
DARANEE TONG-IN : RUBBER PARTICLES AGGLUTININ IN LATEX THESIS ADVISORS : DHIRAYOS WITITSUWANNAKUL, Ph.D., RAPEPUN WITITSUWANNAKUL, Ph.D., PRANEE PHINYOCHEEP, Ph.D. 111 P.
ISBN 974-665-656-2

Hevea rubber latex (*Hevea brasiliensis*) and Champaada (*Artocarpus integer*) root latex lectin were studied and compared. Lectin from Champaada was purified to homogeneity by Sephadex G-200 column and DEAE-Sepharose column chromatography, respectively. The purification was 7.84 fold with 16 % yield. The native MW of the lectin was determined with standard protein markers by Sephadex G-200 column chromatography to be 120 kD. The subunit MW of the native lectin molecule was analyzed by SDS-PAGE to be of 20 kD. The results indicated that this lectin was composed of 6 identical homomeric subunits as the hexameric protein. This lectin was quite thermostable up to 70°C. After heating at 80°C for 15 min, 50% hemagglutination activity still remained. The pI value was determined by isoelectric focusing to be 5.2 while the pH stability had broad ranges from pH 4-10 with no loss of hemagglutination activity under these pH ranges. The hemagglutination activity of this lectin was not affected by Ca^{2+}, Mg^{2+} and Mn^{2+}. It was also found not to be inhibited by cations chelators (EDTA and/or EGTA). This lectin was glycoprotein as determined by PAS and Alcian Blue differential staining of SDS-PAGE. This Champaada root lectin was highly specific for rabbit red blood cell with no activity on other red blood cells in hemagglutination assay. The inhibitors determination showed that this lectin was strongly inhibited by asialomucin. The hemagglutination activity increased 2 fold when the rabbit red blood cell was treated with pronase in a study of the proteolytic effect. This lectin causes aggregation of its rubber particles. This effect was observed by staining the aggregation with Fuchsin dye and examining it under a microscope (400x). This lectin could also aggregate the rubber particle of *Hevea brasiliensis* which was of different species. The cross-reaction results indicated that this root lectin was similar or identical to the *Hevea* latex lectin that has been previously studied. Both rubber particle agglutinations could be completely inhibited by asialomucin with no rubber particle agglutination occurring in the presence of this asialomucin glycoprotein.

The results from these various experiments showed that this lectin is quite unique in its characteristics as well as the structural and molecular properties. Comparison between the Champaada root latex lectin and the *Hevea* latex lectin revealed that they are closely related. However, this is the first study and report on the Champaada root latex lectin. These results can lead to more detailed and further valuable investigations from this original and pioneer study.

Copyright by Mahidol University

4036413 SCBC/M : สาขาวิชา : ชีวเคมี ; วท.ม. (ชีวเคมี)

ดาราณี ทองอินทร์ : การเกาะกลุ่มของอนุภาคยางโดยโปรตีนจำเพาะในน้ำยาง (RUBBER PARTICLES AGGLUTININ IN LATEX). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล, Ph.D., รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล, Ph.D., ปราณี ภิญโญชีพ, Ph.D. 111 หน้า. ISBN 974-665-656-2

จากการศึกษาน้ำยางของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) และเลคตินจากน้ำยางของรากจำปาดะ (*Artocarpus integer*) ถึงคุณสมบัติตลอดจนเปรียบเทียบความแตกต่าง หลังจากที่ทำบริสุทธิ์เลคตินโดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200 และ DEAE-Sepharose ตามลำดับ พบว่าค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 7.84 เท่า และปริมาณเลคตินสุดท้ายเท่ากับ 16% เมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลจากคอลัมน์ Sephadex G-200 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 120 กิโลดาลตัน และน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยจาก SDS-PAGE มีค่า 20 กิโลดาลตัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเลคติน ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน เลคตินสามารถทนความร้อนได้ถึง 70 องศาเซลเซียส และเมื่อนำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าการเกาะกลุ่มของเลคตินกับเม็ดเลือดแดงลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหาค่า pI ด้วยไอโซอิเลคตริคโฟกัสซิ่ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 5.2 เลคตินสามารถทนต่อสภาวะกรด-ด่างในช่วงที่กว้างคือ pH 4-10 นอกจากนี้ยังพบว่า Ca^{2+} Mg^{2+} และ Mn^{2+} ไม่มีผลต่อการเกาะกลุ่มของเลคตินกับเม็ดเลือดแดง อีกทั้ง EDTA และ EGTA ก็ไม่มีผลเช่นกัน เลคตินนี้เป็นไกลโคโปรตีนซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีการย้อมที่ต่างกันคือ แบบ PAS และ Alcian Blue และจากการทดสอบการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงกับเลคติน พบว่ามีความจำเพาะสูงกับเม็ดเลือดแดงของกระต่ายโดยไม่จำเพาะกับเม็ดเลือดแดงชนิดอื่น ส่วนการตรวจสอบตัวยับยั้งพบว่า asialomucin สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มได้เป็นอย่างดี เมื่อใช้เอนไซม์ pronase ย่อยโปรตีนบนเม็ดเลือดแดงของกระต่าย พบว่าการเกาะกลุ่มมีค่าสูงขึ้น 2 เท่า นอกจากนี้เลคตินยังสามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกับอนุภาคยางของจำปาดะและของยางพารา ซึ่งย้อมด้วย Fuchsin dye โดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (400x) ซึ่งเป็นพืชต่างชนิดกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเลคตินทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกัน การเกาะกลุ่มของเลคตินกับอนุภาคยางทั้งสองชนิดสามารถถูกยับยั้งได้โดยเติม asialomucin จากผลการทดลอง พบว่าเลคตินมีลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติที่ค่อนข้างต่างจากเลคตินชนิดอื่น และเมื่อเปรียบเทียบกับเลคตินจากน้ำยางพารา พบว่าทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันมาก การศึกษาเลคตินจากน้ำยางของรากจำปาดะนี้เป็นครั้งแรก เพราะฉะนั้นผลการทดลองที่ได้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในรายละเอียดแง่มุมต่าง ๆ รวมทั้งความเข้าใจในระดับโมเลกุลและหน้าที่ของเลคตินนี้

Copyright by Mahidol University