ชื่อวิทยานิพนธ์ เมมเบรนของอนุภาคใน bottom fraction ของน้ำยางพารา: บทบาทต่อการก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้

ผู้เขียน นายภัทธาวุธ จิวตระกูล

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2547

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้พบว่า เมมเบรนของอนุภาคใน bottom fraction (BF) ของน้ำยางพาราสดที่ได้จากการปั่นแยกด้วยความเร็วสูง เป็นแหล่งโปรตีนแหล่งใหม่ที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งที่มีบทบาทต่อการก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ นอกเหนือจากแหล่งโปรตีนอื่นๆ อันได้แก่ อนุภาคยาง C-serum และ B-serum ซึ่งเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีและได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางมาก่อนหน้านี้แล้ว เมมเบรนของอนุภาคใน BF ที่เตรียมได้จากการศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วยโปรตีนชนิดต่างๆคล้ายคลึงกับที่พบในเมมเบรนของอนุภาคลูทอยด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ BF โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรนของอนุภาคใน BF จัดเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ สามารถสกัดออกจากเมมเบรนได้ด้วยน้ำแอมโมเนีย detergents (เช่น Triton X-100) และสารทำละลายอินทรีย์ (เช่น chloroform-methanol) อย่างไรก็ตาม ปริมาณและชนิดของโปรตีนที่สกัดได้ ยังขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมเมมเบรนของอนุภาคใน BF อีกด้วย จากการนำอนุภาคใน BF มาทำให้แตกในน้ำกลั่นและสกัดโปรตีนด้วย 0.2% Triton X-100 พบว่า เมมเบรนของอนุภาคใน BF ประกอบด้วยโปรตีนประจุบวกและประจุลบที่มีค่า pI ระหว่าง 4.3-9.5 โปรตีนเหล่านี้ เมื่อนำมา incubate กับเซรั่มของเลือดผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ยางด้วยวิธี Western-immunoblot ปรากฏว่า โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลย่อยขนาด 17 22 30 33 35 43 58 65 และ 94 กิโลดาลตัน มีความสามารถที่จะจับกับ IgE ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลย่อยขนาด 17 และ 30 กิโลดาลตัน มีแนว

โน้มที่จะเป็นโปรตีนสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคภูมิแพ้ ทั้งนี้เนื่องจากพบปฏิกิริยาระหว่าง IgE และโปรตีนดังกล่าวกับผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ยางส่วนใหญ่ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

เมื่อนำเมมเบรนของอนุภาคใน BF มาแช่ในสารละลายด่าง โปรตีนส่วนใหญ่ที่อยู่ในเมมเบรนจะหลุดออกมาอยู่ในสารละลายด่าง โปรตีนที่หลุดออกมานี้ เมื่ออยู่ในสารละลายด่างที่นานขึ้น บางส่วนของโปรตีนจะถูกย่อยด้วยด่าง มากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน ต่างจากโปรตีนที่ยังคงอยู่ในเมมเบรน จะมีความทนทานต่อด่างได้ดีกว่า และพบในปริมาณที่แน่นอนหลังจากนำเมมเบรนมาแช่ในสารละลายด่างเป็นระยะเวลาต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนจากส่วนต่างๆของน้ำยาง พบว่า โปรตีนจากเมมเบรนของอนุภาคใน BF อนุภาคยาง และ B-serum มีความทนทานต่อด่างได้ดีกว่าโปรตีนที่ได้จาก C-serum โปรตีนจาก C-serum จัดได้ว่าเป็นโปรตีนที่ไม่ทนต่อด่างเป็นอย่างมาก กล่าวคือ เมื่ออยู่ในสารละลายด่างนาน 15 วัน เกือบทั้งหมดของโปรตีนจะถูกย่อยด้วยด่าง จากการใช้แอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่มีความทนทานต่อด่างซึ่งสกัดได้จากน้ำยางแอมโมเนีย 60 วัน มาใช้วินิจฉัยแหล่งที่มาของโปรตีนดังกล่าวโดยวิธี Western-immunoblot ก็ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาข้างต้นที่ว่า เมมเบรนของอนุภาคใน BF อนุภาคยาง และ B-serum เป็นแหล่งที่มาหลักของโปรตีนที่มีความทนทานต่อด่าง อย่างไรก็ตาม เมื่อนำส่วนผสมของส่วนที่ไม่ใช่ยางของน้ำยางมาศึกษาเกี่ยวกับความทนทานต่อด่างของโปรตีน ให้ผลการศึกษาที่ชี้แนะได้ว่า โปรตีนที่มีความทนทานต่อด่างซึ่งพบใน B-serum ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่หลุดออกมาจากเมมเบรนของอนุภาคใน BF ระหว่างการเตรียม B-serum โดยวิธี freeze-thawing ดังนั้น เมมเบรนของอนุภาคใน BF และอนุภาคยาง น่าจะเป็นแหล่งที่มาหลักของโปรตีนที่มีความทนทานต่อด่างของน้ำยางพารา

หลังจากที่ได้นำน้ำยางที่เก็บรวบรวมจากสวนมาแปรรูปเป็นน้ำยางข้นโดยใช้วิธีที่ปฏิบัติกันในปัจจุบัน รวมถึงการเก็บรักษาน้ำยางข้นในสภาพที่มีแอมโมเนียระดับความเข้มข้น 0.7% ไว้นาน 2 เดือน พบว่า น้ำยางข้น ประกอบด้วยองค์ประกอบหลักสองส่วน คือ อนุภาคยาง (ส่วนใหญ่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น zone1) และชิ้นเมมเบรนของอนุภาคใน BF ซึ่งเกาะติด

กับอนุภาคยาง ดังนั้น เมมเบรนของอนุภาคใน BF จึงเป็นแหล่งที่มาของโปรตีนของน้ำยางข้นอีกแหล่งหนึ่งนอกเหนือจากอนุภาคยาง จากการใช้แอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่สกัดได้จากถุงมือยางประเภทที่มีปริมาณโปรตีนต่ำมากซึ่งใช้น้ำยางข้นเป็นวัตถุดิบมาทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่สกัดได้จากส่วนต่างๆของน้ำยางสด ก็พบว่าโปรตีนที่มีแหล่งกำเนิดจากเมมเบรนของอนุภาคใน BF แสดงปฏิกิริยาในการจับกับแอนติบอดี้ดังกล่าวมากกว่าโปรตีนที่มีแหล่งกำเนิดจาก C-serum และอนุภาคยาง

Thesis Title Bottom Fraction Membrane: Involvements in Natural Rubber Latex Allergy

Author Mr. Patthavuth Jewtragoon

Major Program Biochemistry

Academic Year 2004

Abstract

Bottom fraction membrane (BFM) prepared from centrifuged fresh latex was found to be an important new source of latex proteins for identifying latex allergens besides those already known in rubber particles (RP), C-serum and B-serum. The protein composition of BFM was similar to those in the membrane of lutoid particles, the main constituents of bottom fraction (BF). The BFM proteins are hydrophobic and extractable by ammonia water, detergent (such as Triton X-100) and organic solvent (such as chloroform-methanol). The amount of extractable proteins was shown to be dependent on methods employed in BFM preparation. The BFM, if isolated after hypotonic bursting the BF organelles in a presence of distilled water and extracted with 0.2% Triton X-100, was found to consist of many different cationic and ionic proteins with pI ranging from 4.3 to 9.5. Upon Western-immunoblot, the BFM proteins with molecular weights of 17, 22, 30, 33, 35, 43, 58, 65 and 94 kDa were shown to be recognized by IgE antibodies in the serum sample from subjects allergic to natural rubber latex. Among them, the 17 and 30's kDa proteins have tendency to be the most prominent or frequently detected allergens.

When BFM was suspended in ammonia solution, most of the BFM proteins

were released into the alkaline medium. An increasing degradative fragments of the alkaline-labile BFM proteins was obtained upon prolonging alkaline treatment. However, certain remaining portion of alkaline-stable BFM proteins was also observed. Among various isolated fresh latex proteins, the proteins from BFM, RP and B-serum were shown to be relatively more alkaline-stable than those in the C-serum fraction. The C-serum proteins were very alkaline sensitive and almost all completely degraded after 15 days of alkaline treatment. A Western-immunoblot, using anti alkaline-stable proteins in 60-day-ammoniated latex, also confirm similar finding that BFM, RP and B-serum were the major sources of alkaline-stable proteins. However, the results obtained from the alkaline stability studies on a mixture containing non-rubber fractions suggested that most of the alkaline-stable proteins found in B-serum were those released from the BFM during the alternative freeze-thawing treatment. Therefore, BFM and RP may represent major source of alkaline-stable proteins in *Hevea* latex.

When latex concentrate was prepared from field latex by conventional process including 2-month aging under 0.7% ammonia solution, the main composition of latex concentrate was found to compose of the rubber particles (mainly zone 1) and the certain portion of BFM associated with RP. The BFM is, therefore, another leaching protein source in latex concentrate beside RP. In the extract of latex concentrate finished products such as latex glove, the BFM proteins were shown to be more reactive towards anti-glove IgG as compared to those of C-serum and RP.

Acknowledgement

I would like to express my sincere gratitude and deepest appreciation to my advisor, Dr. Rapepun Wititsuwannakul, for her kindness, encouragement, valuable advice, suggestions, constructive and intensive supervision throughout the laboratory work and the preparation of this thesis. I would like to express my sincere appreciation and gratitude to my co-advisor, Dr. Dhirayos Wititsuwannakul, for his valuable guidance, especially on the scientific papers and thesis preparations, as well as his encouragement given throughout this work.

I would like to thank Dr. Prakit Vichayanond (Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok) and Dr. Pasuree Sangsupawanich (Songklanagarind Hospital, Prince of Songkla University, Hat Yai) for providing the patients'sera.

I wish to express my deep appreciation to the members of Pr. 436, Biochemistry Department, Faculty of Science, Prince of Songkla University and also especially to my friends for their helps and best friendship.

My appreciation is also extended to all members of the Biochemistry Department, Faculty of Science, Prince of Songkla University.

I would like to thank Rubber Research Institute of Thailand for granting study leave which enabled me to complete this thesis. The scholarship from the Centre of International Cooperation, Ministry of Foreign Affairs, State of Israel for the training of International Course-Desert Agrobiology at Ben-Gurion University of the Negev, Sede Borqor, is also appreciated.

Finally, love, understanding, encouragement and support from my family will be eternally remembered.

Patthavuth Jewtragoon