ชื่อวิทยานิพนธ์ **เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพาราและการประยุกต์ใช้**

ผู้เขียน **นางสาวชัชมณฑ์ แดงกนิษฐ์**

สาขาวิชา **ชีวเคมี**

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และอาจใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากพืช ในการศึกษานี้ได้สกัดเปอร์ออกซิเดส (RBP**) จากใบยางพาราและทำบริสุทธิ์โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุและแบบแยกตามขนาดโมเลกุลตามลำดับ เปอร์ออกซิเดสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น** 91 **เท่า มีปริมาณโปรตีนเป็น** 20% **ของสารสกัดหยาบเริ่มต้น จากนั้นทดสอบการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ การเตรียมเปอร์ออกซิเดส-แอนติบอดีคอนจูเกต โดยใช้** cross-linker 3 **ชนิด คือ** sodium periodate, glutaraldehyde **และ** Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) **พบว่า** sodium periodate **ใช้เตรียมเปอร์ออกซิเดส-แอนติบอดีคอนจูเกตได้ดีที่สุด** RBP-anti-rabbit IgG conjugate **และ** RBP-anti-human IgG conjugate **ที่เตรียมได้มีเปอร์ออกซิเดส** activity 68% **และ** 76% **ตามลำดับ โดยยังคงมี** immunological activity **ตลอดระยะเวลา** 8 **เดือน และใช้เป็นแอนติบอดีตัวที่สอง ในการทดสอบทางอิมมูโนวิทยาได้ดี ใกล้เคียงกับเปอร์ออกซิเดส-แอนติบอดีคอนจูเกตที่เตรียมจากหัวผักกาดหนูขาว** (horseradish peroxidase (HRP)-antibody conjugate) RBP-anti-rabbit IgG

conjugate สามารถใช้ได้ดีในการตรวจหา vitellogenin ในพลาสมาของปลากระบอก และ HMG-CoA synthaseใน C-serum ของน้ำยางพารา ส่วน RBP-anti-human IgG conjugate ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปโรซิสในตัวอย่างเลือดคนไข้ นอกจากนี้ได้ใช้เปอร์-ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ร่วมในการเตรียมสารทดสอบในการวัดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดคน

การศึกษายีนสำหรับ RBP เริ่มจากการนำเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วยคอลัมน์ G-75 มาแยกต่อโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบจับจำเพาะ (affinity chromatography) โดยใช้คอลัมน์ Con-A agarose และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้เจลอิเลกโตรโฟรีซีสแบบไม่แปลงสภาพ (ND-PAGE) จากนั้นนำเปอร์ออกซิเดสที่แยกได้สามพีค คือ RBPA, RBPB และ RBPC ไปย่อยเป็นเปปไทด์สั้น ๆ แล้ววิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโน พบว่าเปปไทด์ RBPA_K24, RBPA_K25, RBPA_K28, RBPB_K32, RBPB_K35, and RBPA_CN19 *มีความใกล้เคียงของลำดับกรดอะมิโนกับของเอนไ*ซม์เปอร์ออกซิเดสที่พบในพืชอื่น ๆ และใช้ลำดับกรดอะมิโน GAHTF ที่ได้จาก RBPA_K28 และเป็นบริเวณอนุรักษ์ ในการแปลเป็นลำดับนิว-คลีโอไทด์เพื่อเป็นไพรเมอร์ โดยมีอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบยางเป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR ครั้งที่หนึ่ง จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เป็นแม่แบบของไพรเมอร์จำเพาะในการทำ 3′ และ 5′ RACE พบว่ามียีน *rbp* ซึ่งเป็นรหัสสำหรับเ อ น ไ ซม์เปอร์ออกซิเดสอย่างน้อย 2 ยีน คือ *rbp 1* และ *rbp 2*

Thesis Title	Peroxidase from *Hevea brasiliensis* Leaves and its Applications
Author	Miss Chatchamon Daengkanit
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2005

Abstract

In this study, we report that rubber trees, the most important agro-economic plantation tree of Thailand, could possibly become a new source of plant peroxidase. Rubber peroxidase (RBP) was purified by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation, followed by ion exchange and by size exclusion chromatography, respectively, with 91 fold increase in purity and 20% protein yield. Its applications for clinical diagnosis were then investigated. An RBP-antibody conjugate was successfully prepared using sodium periodate as cross-linker in comparison with the use of glutaraldehyde and sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC). The RBP-antibody conjugate prepared with goat-rabbit IgG antibody and with goat-human IgG antibody retained 68% and 76% peroxidase activity, respectively. The RBP-antibody conjugate led high immunological activity and were stable for at least eight months. Both RBP-antibody conjugates could be used as secondary antibodies for indirect immunoassay equally well as commercial horseradish peroxidase (HRP)-antibody conjugate at the optimal dilution. The RBP-anti-rabbit IgG conjugate and the RBP-anti-human IgG conjugate were used to detect vitellogenin in mullet plasma and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) synthase in C-serum of rubber latex by the Western blot technique and leptospira

antibodies in human serum by the ELISA technique. RBP could be used to determine human serum cholesterol by using the RBP as a coupled enzyme as well.

The gene encoding RBP in rubber leaves was also studied. The RBP from Sephadex G-75 column was further purified by Con-A agarose affinity chromatography. Fractions with high peroxidase activity – RBPA, RBPB, and RBPC – were obtained and the results were confirmed in non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (ND-PAGE). Amino acid sequence analysis of digested RBP-A, RBP-B and RBP-C were performed. The peptide RBPA_K24, RBPA_K25, RBPA_K28, RBPB_K32, RBPB_K35, and RBPA_CN19 showed high similarity to known plant peroxidase sequences, and the GAHTF conserved region from the RBPA_K28 peptide was used to design degenerated primers for the first PCR with RNA from *Hevea* leaves as template. Then the second PCR was performed by 3′and 5′ rapid amplification of cDNA ends (RACE) with gene-specific primers. At least two cDNAs encoding RBP were determined from this study, namely *rbp1* and *rbp2*.