การศึกษาตัวเร่งของเอนไซม์ ไฮดรอกซี เมทิลกลูตาริล โคเอนไซม์เอรีดักเทสในน้ำยางพันธุ์ต่าง ๆ

Studies on Activator of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase from Various Rubber Clones

PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY CENTRAL LIBRARY

สุดชฎา ดำคง

Sudchada Dumkong

เลขหมู่ QK898 L3ส73 2531
เลขทะเบียน 027035
3 พ.ค. 2532

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences
Prince of Songkla University
2531

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาตัวเร่งของเอนไซม์ ไฮดรอกซี เมทิลกลูทาริล โคเอนไซม์เอรีดักเทส ในน้ำยางพันธุ์ต่าง ๆ

ผู้เขียน นางสาวสุดชฎา ดำคง

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2531

บทคัดย่อ

โปรตีนที่ทนต่อความร้อนจาก C-Serum สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซี เมทิลกลูทาริล โคเอนไซม์เอ รีดักเทส (HMGR) ในชั้น bottom จากน้ำยางหลังการปั่นแยกแล้ว เมื่อใช้ C-serum ที่เตรียมจากต้นยางที่ให้ผลผลิตสูง กลาง และต่ำ ของยางพันธุ์ RRIM 600 และ KRS 208 ไปกระตุ้นความว่องไวของ HMGR ในชั้น bottom พบว่ามีเปอร์เซนต์การกระตุ้นเป็นสูงกลาง และต่ำสัมพันธ์โดยตรงกับผลผลิตยาง คือ สูง กลาง และต่ำ ตามลำดับ

การทำบริสุทธิ์ตัวเร่งของเอนไซม์ HMGR จากน้ำยางพันธุ์ RRIM 600 โดยใช้วิธีที่ปรับปรุงมาจากการทำบริสุทธิ์ calmodulin (Lin et al., 1974; Wallace et al., 1979) ตัวเร่งที่ทำบริสุทธิ์จะปรากฏโปรตีน 1 แถบที่ย้อมติดสีน้ำเงินของสี cationic carbocyanide ชื่อ stains-all ในการทำ เจล อิเลคโตรฟอเรซิส และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโซเดียมไดเดซิลซัลเฟต โพลีอครีลาไมด์ เจล อิเลคโตรฟอเรซิส (SDS-PAGE) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 17,500 ดาลตัน EGTA ซึ่งเป็นสารจับกับ Ca^{2+} โดยเฉพาะสามารถยับยั้งความว่องไวของเอนไซม์ HMGR แต่ผลการยับยั้งอันนี้

จะหมดไปโดยการเติม Ca^{2+} ลงไป ดังนั้น Ca^{2+} จะช่วยสนับสนุนการทำงานของตัวเร่ง trifluoperazine ซึ่งเป็น calmodulin antagonist สามารถยับยั้งการทำงานของตัวเร่งของเอนไซม์ HMGR เช่นกัน และผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMGR โดย $ATP\text{-}Mg^{2+}$ สามารถย้อนกลับโดยการเติมตัวเร่งแต่ไม่สามารถย้อนกลับได้ถ้ามี NaF อยู่ในปฏิกิริยา

ต่อมาได้ศึกษาพบว่าตัวเร่งไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของ HMGR ที่ได้จากชั้น bottom ซึ่งได้ทำละลายและทำบริสุทธิ์บ้างแล้ว ตัวเร่งสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ NAD kinase จากชั้นของ bottom และ NAD kinase จากตับ เช่นเดียวกันกับการกระตุ้นโดย calmodulin จากสมองวัว ผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าตัวเร่งมีลักษณะคล้ายกับ calmodulin นั้นน่าจะมีการกระตุ้นการทำงานเป็นแบบทางอ้อมและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างน้ำยางในยางพารา (Hevea brasiliensis)

Thesis title Studies on Activator of - 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase from Various Rubber Clones.

Author Miss Sudchada Dumkong

Major Biological Sciences

Academic year 1988

Abstract

The heat-stable protein from C-serum fraction was able to activate 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) in the bottom fraction of centrifuged latex. When C-serum prepared from high, medium and low yielding trees of clone RRIM 600 and KRS 208 were used to activate HMGR in the bottom fraction, high, medium and low percentages of HMGR activation were observed with corresponding C-serum from high, medium and low yielding tree respectively.

The HMGR activator was purified from fresh latex of clone RRIM 600 by modifying the procedure used for calmodulin purification (Lin et al., 1974; Wallace et al., 1979). The purified activator revealed a single protein band stained in blue color with cationic carbocyanide dye "stains-all" upon a nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight

of HMGR activator, as calibrated from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was 17,500 daltons. It was found that ethyleneglycol - bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), a specific calcium chelator, could inhibit the HMGR activation by its activator. The EGTA inhibition could be reversed by the addition of Ca^{2+}. This result suggests the involvement of calcium ion in promoting the activation by the activator. Trifluoperazine, a calmodulin antagonist, was found to be an inhibitor of HMGR activator. The inhibition of HMGR activity due to the presence of ATP-Mg^{2+} can be overcome by addition of HMGR activator, but not with the presence of NaF in the reaction mixture. Subsequent studies showed that the activator failed to activate solubilized and purified HMGR as prepared from bottom fraction. Moreover, the HMGR activator could activate the enzyme NAD kinase obtained from latex bottom fraction as well as from liver source. The result on NAD kinase activation was similar to that observed by calmodulin from bovine brain. These results suggest an involvement of calmodulin-like activator in the regulation of polyisoprene biosynthesis in latex of Hevea brasiliensis.