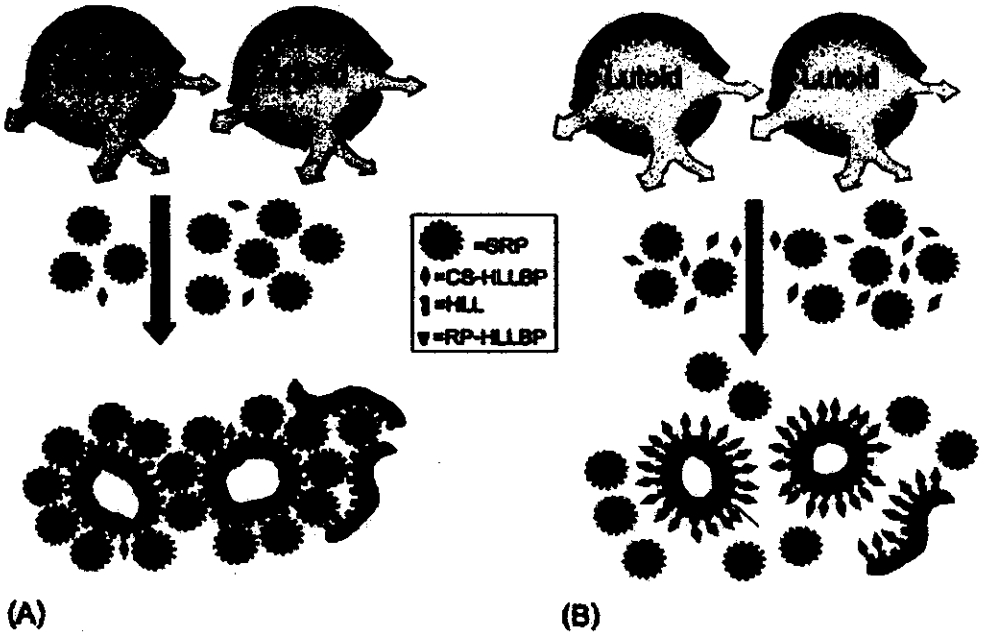
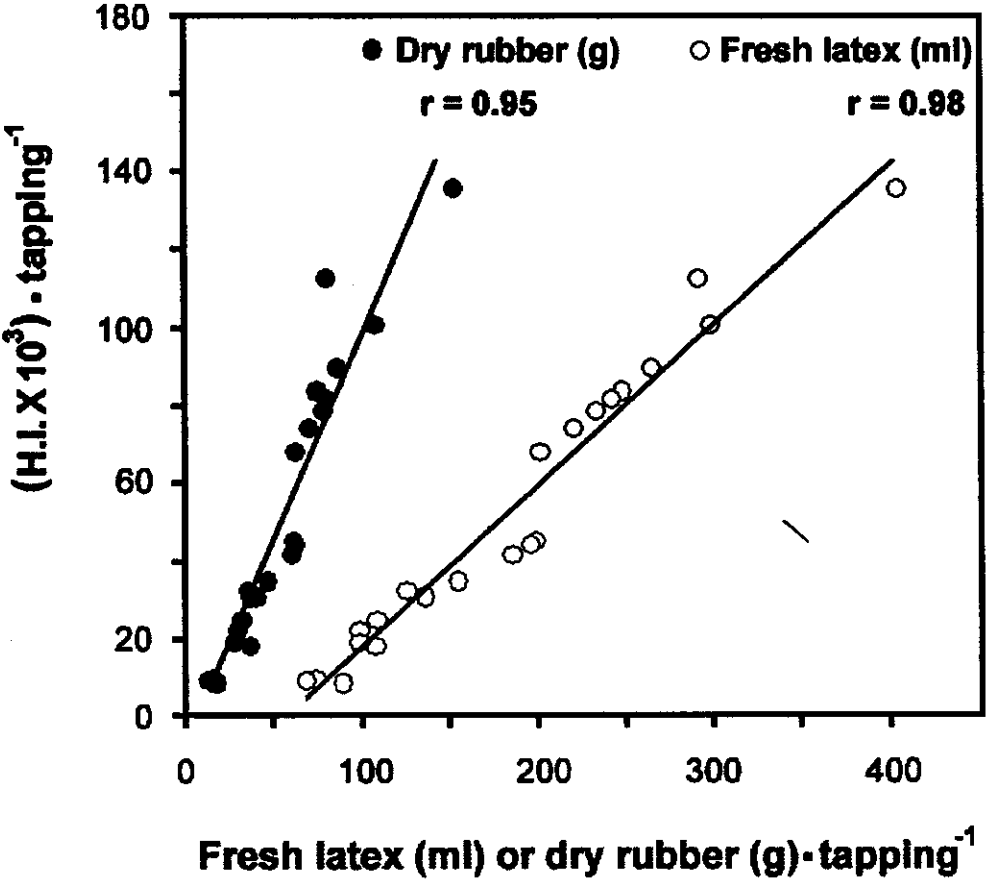
# โครงการย่อย F
# การพัฒนาชุดทดสอบ ELISA เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การไหลของน้ำยาง

โปรตีนที่มีศักยภาพในการใช้เป็นตัวบ่งชี้การไหลของน้ำยางนั้น ได้ค้นพบมาจากการศึกษาวิจัยกระบวนการทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอุดตันของท่อน้ำยาง โดยคณะวิจัยได้พบว่าในกระบวนการดังกล่าวมีโปรตีนหลักอยู่ 3 ชนิดที่เกี่ยวข้อง ดังโมเดลในรูปที่ F.1 โดยชนิดที่ 1 เป็นเมมเบรนโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเลคติน (Wititsuwannakul et al, 2008b, Appendix 9) ที่เรียกว่า Hevea latex lectin (HLL) ที่ฝังตัวอยู่บริเวณเยื่อเมมเบรนด้านในของอนุภาคลูทอยด์ของน้ำยาง โดยเมื่อลูทอยด์แตกออก เลคตินดังกล่าวก็จะทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการจับกลุ่มกับอนุภาคยางขนาดเล็ก (small rubber particle, SRP) ทั้งนี้ เพราะมันมีความสามารถเกาะจับจำเพาะกับกลุ่มคาร์โบไฮเดรทที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนชนิดที่ 2 ที่อยู่บนผิวของอนุภาคยาง (Wititsuwannakul et al, 2008c, Appendix 10) โดยเรียกไกลโคโปรตีนดังกล่าวว่า HLL binding protein ของอนุภาคยาง (RP-HLLBP) ผลทำให้เกิดการรวมกลุ่มระหว่างเมมเบรนของลูทอยด์กับอนุภาคยาง กลายเป็นก้อนยาง (rubber coagulum) ที่มีขนาดใหญ่พอที่จะก่อให้เกิดการอุดตันของท่อน้ำยาง นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยยังพบว่า HLL ยังมีความสามารถเกาะจับจำเพาะกับสารคาร์โบไฮเดรทที่ประกอบขึ้นเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนชนิดที่ 3 ซึ่งละลายอยู่ในส่วนของ cytosolic serum (CS) หรือ ซีรั่มน้ำยางพารา (Wititsuwannakul et al, 2008a, Appendix 1) โดยเรียกไกลโคโปรตีนชนิดนี้ว่า CS-HLLBP พร้อมทั้งได้พบว่าปริมาณของน้ำยางที่ได้ต่อครั้งกรีดจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณ CS-HLLBP (รูปที่ F.2) และ CS-HLLBP ทำหน้าที่เป็น anti-coagulating factor ในกระบวนการเกิด rubber latex coagulation ตามโมเดลใหม่ที่เสนอไว้ (รูปที่ F.1) ดังนั้นโปรตีน CS-HLLBP จึงถูกนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ (biomarker) ศักยภาพในการไหลของน้ำยาง ในการพัฒนาเป็นชุดทดสอบ indirect ELISA เพื่อวัดปริมาณ CS-HLLBP ในน้ำยาง




รูปที่ F.1 Proposed model for rubber latex coagulation: the intrinsic latex lectin (HLL) on the lutoid membrane vs. its insoluble or surface-bound rubber particle ligand (RP-HLLBP) and soluble C-serum binding protein ligand (CS-HLLBP). The bursting of lutoid particles will lead to the exposure of HLL that can bind to either RP-HLLBP on the rubber particles, leading to the formation of a rubber coagulum, as depicted in process A or to the soluble CS-HLLBP, forming no coagulum, as depicted in process B. The coagulation of rubber latex will take place whenever process A exceeds B (i.e. at the distal open-end of the latex vessel upon tapping).

(Wititsuwannakul et al, 2008a, Appendix 1)




รูปที่ F.2 Correlation between rubber yield and CS-HLLBP activity (H.I.) per tapping (n = 22 ) (Wititsuwannakul et al, 2008a, Appendix 1)

*อุปกรณ์และวิธีการ*

a) การเตรียม CS-HLLBP บริสุทธิ์

เพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CS-HLLBP โดยนำไปฉีดกระต่าย และใช้สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน CS-HLLBP โดยวิธี indirect ELISA วิธีการเตรียมเริ่มจากนำน้ำยางสดมาปั่นให้แยกออกเป็นส่วนต่างๆโดยเครื่องปั่นความเร็วสูง (ultracentrifuge) ที่ความเร็ว 59,000 g เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นใช้ autopipette ดูดเอาเฉพาะส่วนของ C-serum เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับทำบริสุทธิ์โปรตีน CS-HLLBP การทำบริสุทธิ์เริ่มจากนำ C-serum ที่รวบรวมได้มาตกโปรตีนด้วยเกลือ ammonium sulfate ที่ระดับความเข้มข้น 70-80% นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายในบัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH7.4 จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้มาตกโปรตีนอีกครั้งหนึ่งด้วย cold acetone ปริมาตร 2 เท่า เก็บตะกอนโดยใช้เครื่องปั่นแล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ในครั้งแรกแต่ใช้ในปริมาตรที่น้อยกว่าทั้งนี้เพื่อให้สารละลายมีความเข้มข้นของโปรตีนสูง ขั้นต่อไปก็จะคัดแยกโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีน CS-HLLBP โดยนำสายละลายโปรตีนไปผ่านคอลัมน์ gel infiltration (Bio-Gel P300) และเก็บรวบรวมเฉพาะ fraction ที่มี activity ของ CS-HLLBP สูงๆ สารละลายโปรตีนหลังจากผ่านคอลัมน์ gel infiltration แล้วจะเหลือโปรตีนไม่กี่ชนิด วิธีการที่จะได้มาซึ่งโปรตีน CS-HLLBP เพียงชนิดเดียวในขั้นต่อไปสามารถกระทำได้ 2 วิธีคือ วิธีแรก นำสารละลายโปรตีนไปผ่านคอลัมน์ ion-exchange (DEAE-Sepharose) วิธีที่2 ย้ายโปรตีนที่อยู่ในสารละลายให้อยู่บนเมมเบรนแล้วแยกเฉพาะโปรตีน CS-HLLBP ออกจากเมมเบรน ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธีที่2 ซึ่งมีวิธีการโดยสังเขปดังนี้คือ นำสารละลายโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ gel infiltration ไปแยกแถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE จากนั้นย้ายแถบโปรตีนที่อยู่ในเจลให้มาอยู่บนเมมเบรน PVDF (immobilon) โดยวิธี electroblotting แล้วตัดแยกเมมเบรนเฉพาะที่เป็นแถบโปรตีนCS-HLLBP สกัดโปรตีน CS-HLLBP ให้หลุดออกจากเมมเบรนโดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH9.5 ที่มี 1% TritonX-100 เป็นส่วนผสม

b) การเตรียมแอนติบอดี (polyclonal antibody)

ในการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน CS-HLLBP ใช้กระต่ายจำนวน 5 ตัว การฉีดกระต่ายแต่ละตัวในครั้งแรกใช้โปรตีน CS-HLLBP ปริมาณ 200 µg ที่อยู่ใน phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากับ complete Freuds'adjuvant ปริมาตร 0.5 ml ฉีดที่กลางหลังและต้นคอ เพื่อให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่ดีขึ้น ฉีดเพิ่มอีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งใช้โปรตีน CS-HLLBP ปริมาณ 100 µg ที่อยู่ใน phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากับ incomplete Freuds'adjuvant ปริมาตร 0.5 ml เมื่อกระต่ายสร้างแอนติบอดีแล้ว เจาะเลือดจากกระต่ายมาแยกเก็บเฉพาะส่วนของซีรัม ซีรัมที่ได้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

c) การตรวจวัดปริมาณ CS-HLLBP

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี indirect ELISA เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก มีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้คือ เคลือบโปรตีนในหลุมของ ELISA plate (Nunc, Denmark) ปริมาตร100µl โดยให้โปรตีนเจือจางในบัฟเฟอร์คาบอเนต pH 9.6 โปรตีนที่ใช้เคลือบหลุมได้แก่โปรตีน CS-HLLBP ที่บริสุทธิ์ (สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน) และโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ในส่วน C-serum (สำหรับหาปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ในน้ำยาง) ปล่อยให้โปรตีนจับกันหลุมเป็นระยะเวลาหนึ่ง จากนั้น block กันหลุมด้วย 1%BSA+0.05Tween-20 ที่อยู่ใน PBS เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบกำหนด ล้าง plate 3 ครั้งด้วย PBS ที่มี 0.05%Tween-20(PBS-T) เติมซีรัมเลือดกระต่ายซึ่งเจือจางใน PBS-T ลงในหลุม ปริมาตร 100µl ต่อหลุม แล้วปล่อยให้แอนติบอดีจับกับแอนติเจน เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบกำหนด ล้างplate 3 ครั้งด้วย PBS ที่มี0.05%Tween-20 (PBS-T) ทั้งนี้เพื่อชะล้างแอนติบอดีที่ไม่ได้จับกับแอนติเจน เติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งมีเอมไซม์เปอร์ออกซิเดสเชื่อมติด (goat anti-rabbit IgG-HRP, Sigma Chemical Co.) ลงในหลุม ปริมาตร 100µl ต่อหลุม โดยที่แอนติบอดีตัวที่สองนี้ถูกเจือจางใน PBS-T ปล่อยทิ้งไว้ให้แอนติบอดีตัวที่สองจับกับแอนติบอดีตัวแรกเป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 37° C ตามด้วยล้าง plate 5 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายที่เป็น developer (hydrogen peroxide และ O-phenylenediamine dihydrochloride) ลงไปหลุมละ 100µl แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลาไม่เกิน 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 2 M หลุมละ 50µl อ่านค่าความเข้มข้นสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น(ค่าO.D)ในแต่ละหลุมของ ELISA plate โดยใช้ spectrophotometer plate reader (Bio-Tex , $EL_x808$) ที่ความยาวคลื่นแสง 492 นาโนเมตร

d) การเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณ CS-HLLBP โดยวิธี indirect ELISA กับ วิธี hemagglutination inhibition หรือการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

การศึกษาครั้งนี้ได้เก็บผลผลิตต้นยางพันธุ์ RRIM 600 เป็นรายต้น จำนวน 30 ต้น สุ่มตัวอย่างน้ำยางของแต่ละต้นมาปั่นด้วย ultracentrifuge (ความเร็ว 30,000 rpm นาน 30 นาที) ทั้งนี้เพื่อแยกเอาส่วน C-serum ของน้ำยางมาวิเคราะห์หาปริมาณ CS-HLLBP ในการวิเคราะห์โดยใช้วิธี indirect ELISA นำ C-serum มาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) 640 เท่า แล้วนำไปเคลือบในหลุมของ ELISA plate โดยเจือจางกับ coating buffer อีก 10 เท่า จากนั้นปฏิบัติตามขั้นตอนตามที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้ ค่า O.D. ของตัวอย่างที่อ่านได้จะนำไปแปลงเป็นค่าน้ำหนักจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการนำ CS-HLLBP มาเคลือบหลุมที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 0.31-20 µg/ml สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธียับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เริ่มจากนำ C-serum มาทำ serial dilution (2 เท่า) กับ isotonic buffer ในหลุมของ microtiter plate จากนั้นเติม HLL ที่มีระดับ titer ของ activity เท่ากับ $2^2$ ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที แล้วเติมเม็ดเลือดแดงกระต่ายที่มีความเข้มข้น 2% ปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. แล้วอ่านผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

*ผลการทดลองและวิจารณ์ผล*

a) CS-HLLBPบริสุทธิ์ที่เตรียมได้

ในการทำบริสุทธิ์ CS-HLLBP เริ่มจากการนำ C-serum ที่ปั่นแยกได้จากน้ำยางสด ไปตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ cold acetone จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ gel infiltration เก็บเฉพาะสารละลายโปรตีนที่มี activity ของ CS-HLLBP สูง แล้วนำไปแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE จากนั้นถ่ายแถบโปรตีนจาก acrylamide gel ลงบนเมมเบรน immobilion ด้วยวิธี electrblotting เพื่อตัดเอาเฉพาะแถบโปรตีน CS-HLLBP ซึ่งมีขนาด 40 kD มาทำการชะ แล้วนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ด้วย SDS-PAGE ปรากฏว่าได้ CS-HLLBP บริสุทธิ์แถบเดียว (รูปที่ F.3) อนึ่ง โปรตีน CS-HLLBP ที่สกัดได้ในครั้งนี้จะไม่อยู่ในสภาพเดิม (native form) ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างเพื่อแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE อย่างไรก็ตาม โปรตีนในสภาพดังกล่าวสามารถใช้งานในการศึกษาครั้งนี้ได้เนื่องจากมีเป้าหมายเพื่อนำไปใช้ฉีดกระต่าย และเป็นแอนติเจนสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ด้วยวิธี indirect ELISA

b) แอนติบอดี ต่อโปรตีน CS-HLLBP ที่เตรียมได้

การสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CS-HLLBP ใช้กระต่ายจำนวน 5 ตัว ทำการฉีดโปรตีน CS-HLLBP 2 ครั้ง เพื่อกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดี คือ ฉีดครั้งแรก และหลังจากครั้งแรก 21 วัน เมื่อครบ 30 วันหลังจากฉีดครั้งแรก เก็บเลือดกระต่ายแต่ละตัวมาตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CS-HLLBP โดยใช้วิธี indirect ELISA ผลปรากฏว่ากระต่ายแต่ละตัวสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน CS-HLLBP ได้ไม่เท่ากัน (รูปที่ F.4) โดยที่กระต่ายตัวที่1 มี titer ต่ำสุด ดังนั้น การฉีดโปรตีน CS-HLLBP ในครั้งต่อไป (40 วันหลังจากฉีดครั้งแรก) ซึ่งเป็นการฉีดเพื่อหวังผลในการเก็บเกี่ยวแอนติบอดี จึงได้ตัดกระต่ายตัวที่1ออกไป ผลจากการเก็บเลือดกระต่ายแต่ละตัว (ตัวที่ 2-5) มาตรวจหาแอนติบอดีเมื่อ 7 และ 14 วันหลังจากฉีดโปรตีน CS-HLLBP ในครั้งสุดท้าย ผลปรากฏว่าซีรัมเลือดกระต่ายตัวที่ 4 มี titer ของแอนติบอดีสูงสุด รองลงมาได้แก่ซีรัมเลือดกระต่ายตัวที่ 3, 2 และ 5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเลือดที่เก็บเมื่อ 7 และ 14 วันหลังจากฉีดครั้งสุดท้าย มี titer โดยเฉลี่ยแล้วไม่แตกต่างกัน แต่ก็มี titer สูงกว่าเลือดที่เก็บทดสอบในครั้งแรกค่อนข้างมาก (รูปที่ F.5) โดยพบว่าความจำเพาะของแอนติบอดีที่มีต่อโปรตีน CS-HLLBP จากการทดสอบโดยใช้วิธี westernblots ปรากฏว่า แอนติบอดีที่ผลิตได้จากกระต่ายในครั้งนี้มีความจำเพาะต่อโปรตีน CS-HLLBP ค่อนข้างสูง (รูปที่ F.6)

c) การตรวจวัดปริมาณโปรตีน CS-HLLBP โดยใช้วิธี indirect ELISA

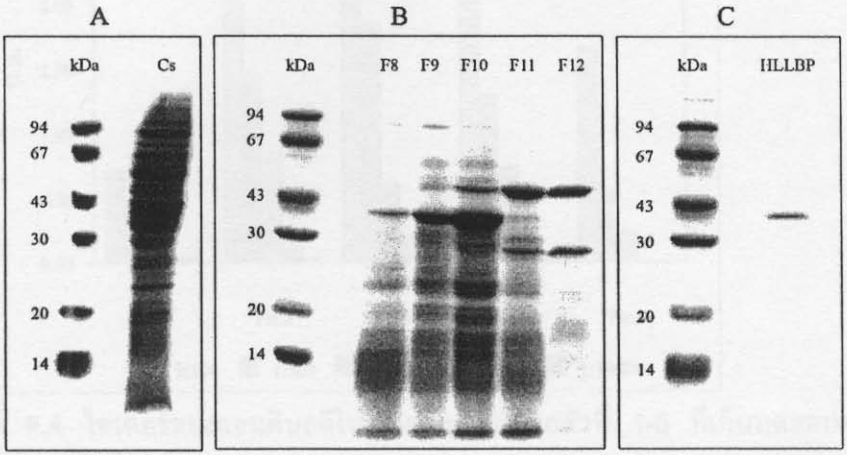
การตรวจวัดปริมาณโปรตีน CS-HLLBP โดยใช้วิธี indirect ELISA ในเบื้องต้นได้ดำเนินการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโปรตีน CS-HLLBP ที่จะนำมาใช้สร้างกราฟมาตรฐาน ความเจือจางของ C-serum ที่จะนำมาเคลือบหลุม และปริมาณ IgG ในซีรัมเลือดกระต่ายที่ใช้

จับกับโปรตีน CS-HLLBP นอกจากนี้ยังรวมไปถึงปัจจัยอื่นๆ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุม ระยะเวลาที่ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาสีหลังจากเติม developer เป็นต้น

จากการทดลองเคลือบหลุมด้วยโปรตีน CS-HLLBP และโปรตีนจาก C-serum ที่ระดับความเข้มข้นที่ลดลง 2 เท่า (serial dilution) โดยความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 16 µg/well และความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.25 µg/well เป็นระยะเวลานาน 1 ชม. ที่ 37°C จากนั้น incubate ด้วยซีรัมเลือดกระต่าย (ตัวที่ 4 เก็บเลือดครั้งที่ 3) ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ 2000, 4000 และ 8000 เท่า ผลจากการวัดปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นหลังจากได้ปฏิบัติครบขั้นตอนตามวิธีของ indirect ELISA ปรากฏว่า การใช้ซีรัมเลือดกระต่ายที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ 4000 เท่า มีความเหมาะสมที่สุดในการสร้างกราฟมาตรฐานและการวัดปริมาณของ CS-HLLBP ที่อยู่ใน C-serum เนื่องจากผลที่ได้อยู่ในช่วงของค่า O.D. ที่ไม่สูงหรือต่ำเกินไป นอกจากนี้ยังพบว่า การเคลือบหลุมด้วยโปรตีนจาก C-serum ที่ระดับความเข้มข้น 8 µg/well ให้ค่า O.D. สูงสุด ในทุกระดับความเจือจางของซีรัมเลือดกระต่ายที่ใช้ (รูปที่ F.7) โดยอิทธิพลระยะเวลาที่ใช้ในการเคลือบหลุม พบว่าจากการเคลือบหลุมด้วย C-serum ควบคู่กับโปรตีน CS-HLLBP ที่ระดับความเข้มข้นที่ลดลง 2 เท่า (serial dilution) โดยความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 16 µg/well และความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ 0.25 µg/well เป็นระยะเวลานานต่างกัน 3 เวลา คือ 1 ชม. (ที่ 37°C) 4 ชม. และ 24 ชม. (ที่ 4°C) จากนั้น incubate ด้วยซีรัมเลือดกระต่าย (ตัวที่ 4 เก็บเลือดครั้งที่ 3) ที่เจือจางด้วยบัฟเฟอร์ 4000 เท่า ผลจากการวัดปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นหลังจากได้ปฏิบัติครบขั้นตอนตามวิธีของ indirect ELISA ปรากฏว่า ระยะเวลาการเคลือบหลุมที่ยาวนานขึ้นมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่เกาะติดในหลุมมีมากขึ้น (มีค่า O.D. เพิ่มขึ้น) โดยเห็นได้ชัดเจนกับโปรตีน CS-HLLBP แต่ในกรณี C-serum พบว่า การเคลือบหลุมนาน 1 และ 4 ชม. ให้ผลไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า การเคลือบหลุมด้วยโปรตีนจาก C-serum ที่ระดับความเข้มข้น 8 µg/well ให้ค่า O.D. สูงสุดในทุกระยะเวลาที่ใช้เคลือบหลุม (รูปที่ F.8)

d) ปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ที่ตรวจวัดโดยวิธี indirect ELISA กับ ระดับของactivityที่ตรวจวัดโดยใช้วิธียับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง

จากการนำผลการวิเคราะห์ปริมาณ CS-HLLBP ที่ตรวจวัดในรูปของ g/tapping (สำหรับวิธี indirect ELISA) และ H.I. activity/tapping (สำหรับวิธียับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง) ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับผลผลิตยางแห้งของต้นยาง ปรากฏว่า นอกจากปริมาณ CS-HLLBP ที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีจะมีความสัมพันธ์ในระดับสูงกับผลผลิตยางแล้ว(รูปที่ F.9A และ F.9B) ยังพบว่าปริมาณ CS-HLLBP ที่วิเคราะห์ได้จากทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันในระดับสูงอีกด้วย (รูปที่ F.9C) ดังนั้น การวัด CS-HLLBP สามารถทำได้โดยวิธี indirect ELISA ขึ้นซึ่งจะสะดวกและง่ายกว่า แทนการวิธีวัดactivity จากการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก

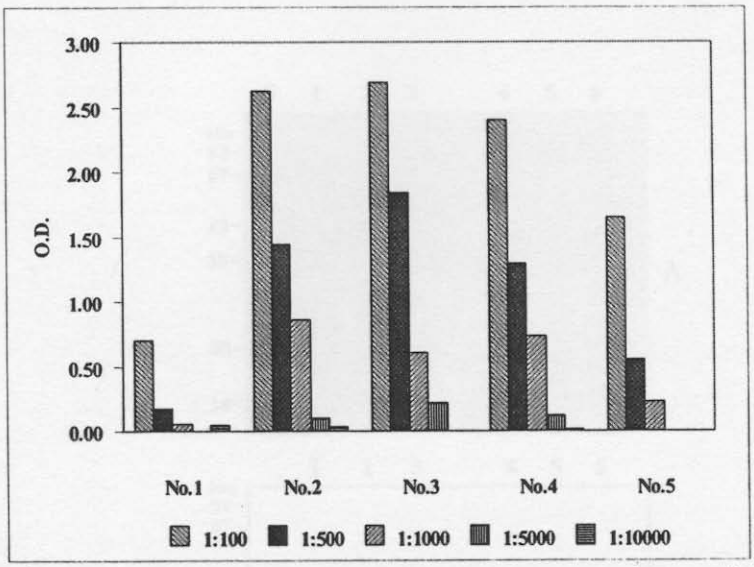



รูปที่ F.3. SDS-PAGE (12% gel) ของโปรตีนจากขั้นตอนต่างๆของการทำบริสุทธิ์ CS-HLLBP โดย lane kDa คือ standard protein marker

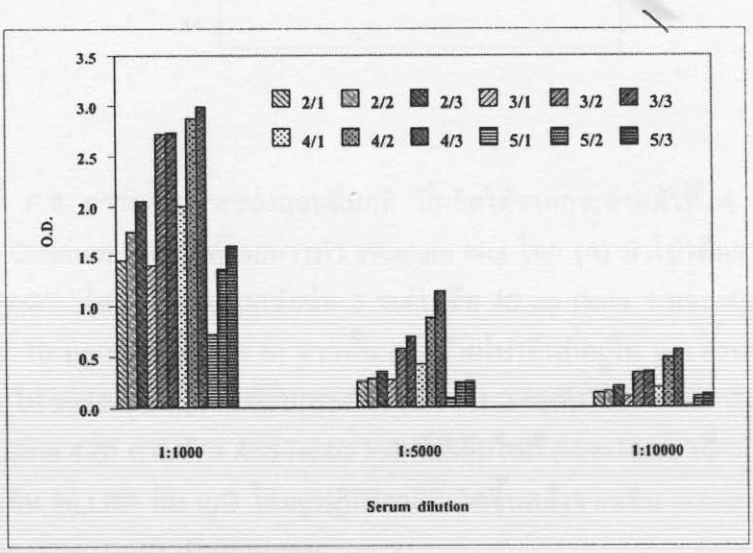
A: lane Cs คือโปรตีนของ C-serum ที่ใช้เพื่อแยก CS-HLLBP บริสุทธิ์

B : lane F8-F10 และ F11-F12 คือโปรตีน fraction ที่มีและไม่มี activity ของ CS-HLLBP ที่ได้หลังการแยกผ่านคอลัมน์ Bio-Gel P300

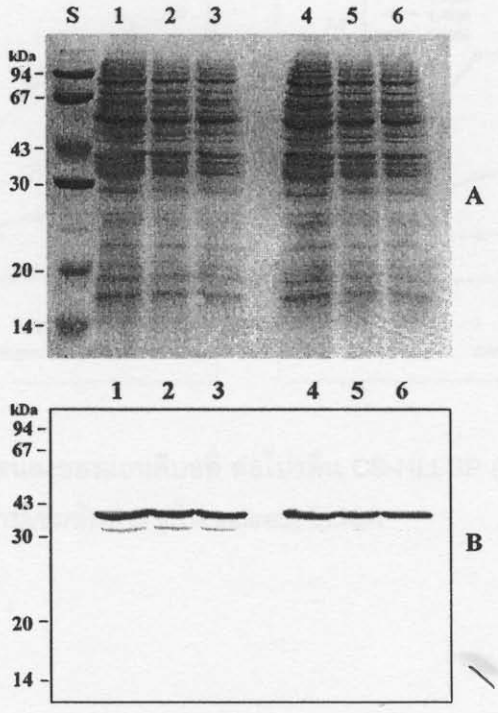
C: lane HLLBP คือ CS-HLLBPบริสุทธิ์ที่แยกตัดจากเมมเบรน PVDF



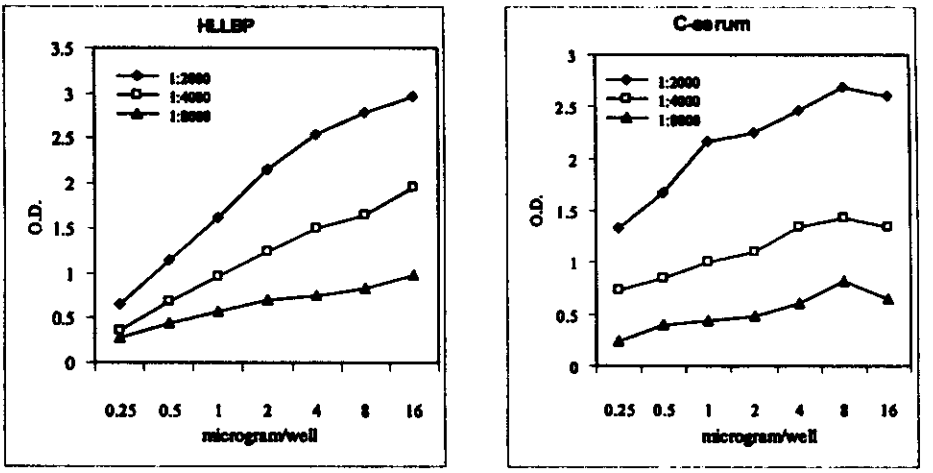

รูปที่ F.4 ไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรัมเลือดกระต่ายตัวที่ 1-5 ที่เก็บทดสอบครั้งแรก (30 วันหลังจากฉีดครั้งแรก) ทดสอบโดยใช้วิธี indirect ELISA (เคลือบหลุมด้วยโปรตีน CS-HLLBP ความเข้มข้น 5 µg/ml)



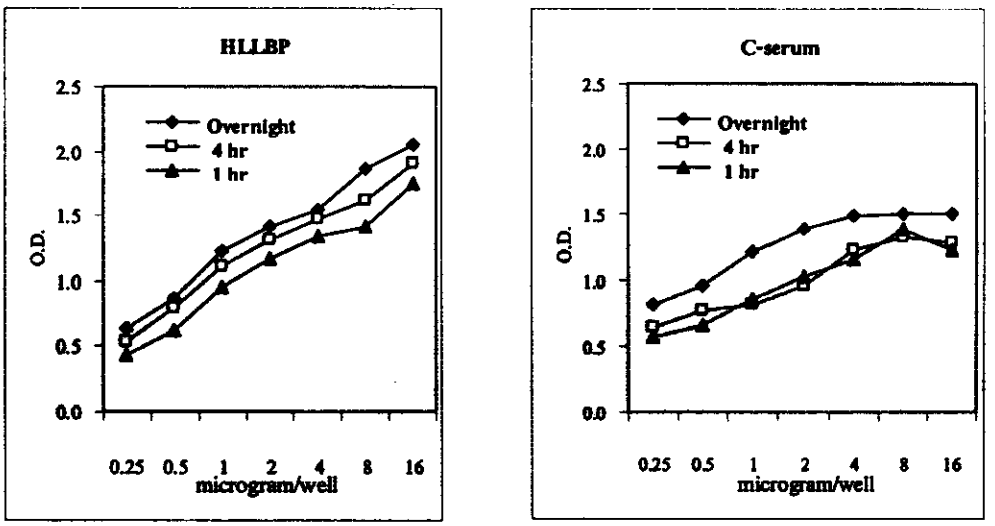

รูปที่ F.5 เปรียบเทียบไตเตอร์ของแอนติบอดีในซีรัมเลือดกระต่ายตัวที่ 2-5 ที่เก็บ 3 ครั้ง (30, 47 และ 52 วันหลังจากฉีดครั้งแรก) ทดสอบโดยใช้วิธี indirect ELISA (เคลือบหลุมด้วยโปรตีน CS-HLLBP ความเข้มข้น 5 µg/ml) ตัวเลขหน้าเครื่องหมาย / หมายถึงตัวกระต่าย ส่วนตัวเลขหลังเครื่องหมาย / หมายถึงครั้งที่เก็บเลือดกระต่าย



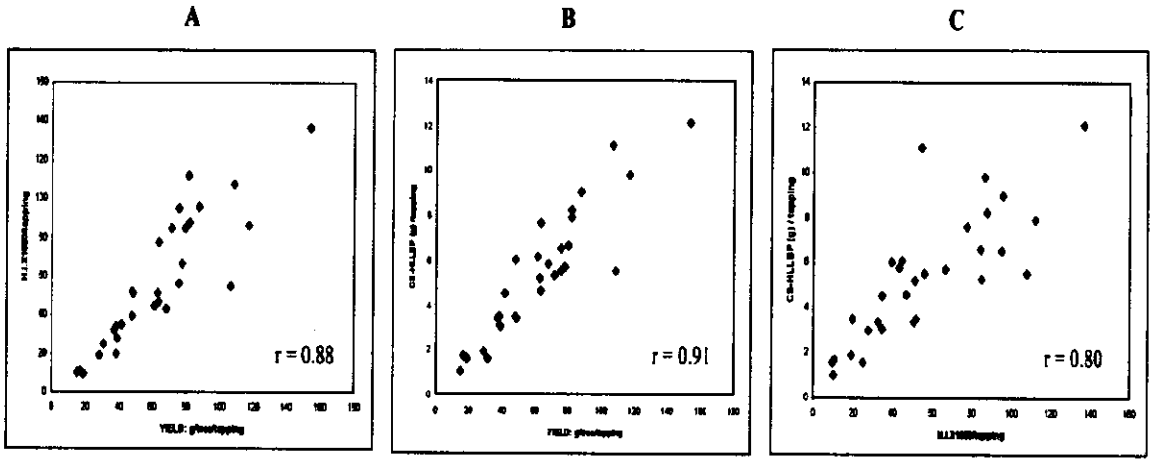

รูปที่ F.6 ความจำเพาะของแอนตีบอดี ที่ผลิตได้จากกระต่ายตัวที่ 4 ต่อโปรตีน CS-HLLBP ใน C-serum วิเคราะห์โดยการทำ Western blot โดย (A) นำโปรตีนจาก C-serum มา run SDS-PAGE โดยใช้ ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40 µg (lane 1 และ 4), 20 µg (lane 2 และ 5) และ 10 µg (lane 3 และ 6) จากนั้น (B) ย้ายโปรตีนที่อยู่ใน gel ลงบน nitrocellulose membrane ไป incubate ต่อด้วยซีรั่มกระต่ายที่เจือจาง 2 ระดับ คือ 1:500 (B, lane 1-3) และ 1:1000 (B, lane 4-6) ตามด้วย Anti-rabbit IgG ที่มีเอ็มไซม์ peroxidase เชื่อมติด ตรวจการจับระหว่างโปรตีน HLLBP กับ IgG โดยดูปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นหลังจากเติม substrate solution ที่มี diaminobenzidine (DAB) เป็นส่วนผสม




รูปที่ F.7. การตอบสนองของแอนติบอดี ต่อโปรตีน CS-HLLBP (HLLBP) บริสุทธิ์ และที่อยู่ใน C-serum ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ใน indirect ELISA




รูปที่ F.8. ผลของระยะเวลาการเคลือบหลุมด้วยโปรตีน CS-HLLBP (A) และโปรตีนจาก C-serum (B)ใน indirect ELISA โดยใช้ซีรัมของเลือดกระต่ายตัวที่ 4 (เก็บครั้งที่ 3) เจือจางด้วย buffer 4000 เท่า




รูปที่ F.9. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตยางแห้ง (กรัม/ต้น/ครั้งกรีด) ของต้นยางจำนวน 30 ต้นกับปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ที่ตรวจวัดโดยวิธี hemagglutination inhibition (A) และ indirect ELISA (B) และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน CS-HLLBP ที่ตรวจวัดโดยวิธีทั้งสอง (C)

*References:*

Wititsuwannakul, R., Pasitkul, P., Jewtragoon, P., Wititsuwannakul, D. (2008a) *Hevea* latex lectin binding protein in C-serum as an anticoagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation. Phytochemistry 69, 656-662.

Wititsuwannakul, R., Pasitkul, P., Kanokwiroon, K., Wititsuwannakul, D. (2008b) A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. Phytochemistry 69, 339-347.

Wititsuwannakul, R. Rukseree, K., Kanokwiroon, K., Wititsuwannakul, D. (2008c) A rubber particle protein specific for *Hevea* lectin binding involved in latex coagulation. Phytochemistry 69, 1111-1118.

## รายชื่อทีมวิจัยที่อยู่ในทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัยของ รศ.ดร. รพีพรรณ วิทิตสุวรรณกุล (15 สิงหาคม 2546 – 14 สิงหาคม 2549)

| ชื่อ-นามสกุล | ตำแหน่งวิชาการ | | ต้นสังกัด | | | ตำแหน่งในโครงการ | สถานภาพปัจจุบัน |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | เมื่อเข้าร่วมโครงการ | ปัจจุบัน | | | | | |
| 1. ดร. ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล | รศ. ระดับ 9 | ศ. ระดับ 10 | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.มหิดล | นักวิจัยร่วม | นักวิจัยร่วม |
| 2. ดร.เครือวัลย์ พลจันทร | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ 9 | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ 10 | หน่วยผลิตวัคซีนและชุดทดสอบ | กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ | กระทรวงสาธารณสุข | นักวิจัยร่วม | นักวิจัยร่วม |
| 3. ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา | รศ. ระดับ 9 | รศ. ระดับ 9 | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | นักวิจัยร่วม | ลาออกไปรับงานบริหาร |
| 4. ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ | รศ. ระดับ 8 | รศ. ระดับ 9 | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | นักวิจัยร่วม | ลาออกไปรับงานบริหาร |
| 5. พญ.ภาสุรี แสงศุภวานิช | อาจารย์ ระดับ 7 | อาจารย์ ระดับ 7 | ภาคกุมารเวชศาสตร์ | คณะแพทยศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | นักวิจัยร่วม | นักวิจัยร่วม |
| 6. ดร.รวี เถียรไพศาล | รศ. ระดับ 9 | รศ. ระดับ 9 | ภาคโอษฐ์วิทยา | คณะทันตแพทยศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | นักวิจัยร่วม | นักวิจัยร่วม |
| 7. ดร.อธิยา รัตนพิทธยาภรณ์ | อาจารย์ | อาจารย์ | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | น.ศ.ป.เอก (คปก.) | จบออกไปเป็นอาจารย์ |
| 8.ดร.นพแก้ว เจริญทิพากร | อาจารย์ | อาจารย์ | ภาควิชาเคมี | คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์, สุราษฎร์ | น.ศ.ป.เอก(UDC) | จบออกไปเป็นอาจารย์ |

| ชื่อ-นามสกุล | ตำแหน่งวิชาการ | | ต้นสังกัด | | | ตำแหน่งในโครงการ | สถานภาพปัจจุบัน |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | เมื่อเข้าร่วมโครงการ | ปัจจุบัน | | | | | |
| 9. ดร.ภัทธาวุธ จิวตระกูล | นักวิชาการเกษตร ระดับ 6 | นักวิชาการเกษตร ระดับ 7 | สถาบันวิจัยยางสงขลา | กรมวิชาการเกษตร | กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ | น.ศ.ป.เอก | จบกลับไปต้นสังกัด |
| 10. ดร.อดิพล พัฒิยะ | นศ.ดปก | อาจารย์ | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | น.ศ.ป.เอก (ดปก.) | จบออกไปเป็นอาจารย์ |
| 11. ดร.วรรณภา ศรีชัญรัตน์ | นศ.ดปก | สำเร็จการศึกษา | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.มหิดล | น.ศ.ป.เอก (ดปก.) | จบออกไปทำธุรกิจ |
| 12. ดร.กมลวรรณ กนกวิรุฬห์ | นศ.ดปก | สำเร็จการศึกษา | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | น.ศ.ป.เอก (ดปก.) | จบกำลังหางาน |
| 13. เกศจี แม่งอำพัน (วทบ) | นศ.ดปก | นศ.ดปก | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | น.ศ.ป.เอก (ดปก.) | กำลังจะจบ |
| 14. เครือวัลย์ ขุนรัมย์ (วทบ) | นศ.ดปก | นศ.ดปก | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | น.ศ.ป.เอก (ดปก.) | รอฟังผลผลงานตีพิมพ์เพื่อจบ |
| 15. เกษม อัศวตรีรัตนกุล | ผศ ระดับ 7 | ผศ ระดับ 7 | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม. ทักษิณ | ป.เอก (Ronpaku) | ลาออกไปรับงานบริหาร |
| 16. ฐณะวัฒน์ พิทักษ์พรปรีชา (ภบ) | นศ.ดปก | นศ.ดปก | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | น.ศ.ป.เอก (ดปก.) | น.ศ.ป.เอก (ดปก.) |
| 17. นายปัณณวิชช์ สุขประเสริฐ (วทม) | ผู้ช่วยวิจัย | นศ.ป.เอก | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | ผู้ช่วยวิจัย | น.ศ.ป.เอก (มอ.) |
| 18. นางสาว จิราพร ศิริรัตน์ (วทบ) | นศ.ป. โท | อาจารย์ | ภาควิชาเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลา | น.ศ.ป.โท | จบออกไปเป็นอาจารย์ |

| ชื่อ-นามสกุล | ตำแหน่งวิชาการ | | ต้นสังกัด | | | ตำแหน่งในโครงการ | สถานภาพปัจจุบัน |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | เมื่อเข้าร่วมโครงการ | ปัจจุบัน | | | | | |
| 19. หทัยรัตน์ หงษ์พฤกษ์ | ผู้ช่วยวิจัย | นศ.ป.โท | ภาควีวเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | ผู้ช่วยวิจัย | น.ศ.ป.โท (มอ.) |
| 20. วนิษฐี สร้อยสุวรรณ | ผู้ช่วยวิจัย | นศ.ป.โท | ภาควีวเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | ผู้ช่วยวิจัย | น.ศ.ป.โท (มอ.) |
| 21. วรรณนิภา มธุรส (วท.บ.) | ผู้ช่วยวิจัย | น.ศ.ป.โท(ม.มหิดล) | ภาควีวเคมี | คณะวิทยาศาสตร์ | ม.สงขลานครินทร์ | ผู้ช่วยวิจัย | น.ศ.ป.โท(ม.มหิดล) |
| 22 นางเจะนูรียะห์ มงคลประเสริฐ (วทม) | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ | กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ | | | ผู้ช่วยวิจัย | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |
| 23 นางสาวอุไร เพ็ชรเนตร (วทบ) | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ | - | กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ | | | ผู้ช่วยวิจัย | ลาออกไปทำอาชีพส่วนตัว |