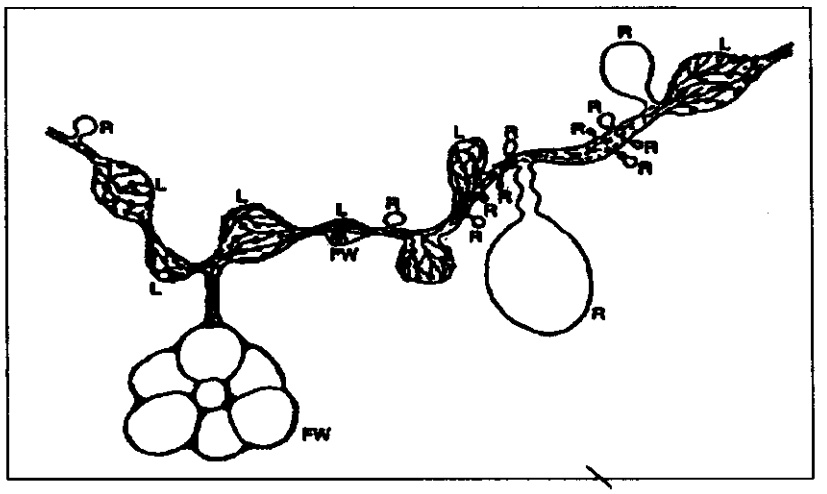
โครงการย่อย B
การศึกษาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยาง

ถึงแม้ว่าได้มีการศึกษาเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยางธรรมชาติ มาเป็นระยะเวลากว่า 50 ปีแล้ว ตั้งแต่ปี คศ. 1950 แต่ความรู้ที่ได้ ก็ยังห่างไกลจากความสมบูรณ์อยู่มาก ปัจจุบันยังไม่เป็นที่รู้ชัดว่ามี โปรตีนใดบ้าง ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำชีวสังเคราะห์ยาง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรตีนดังกล่าวมักเป็น hydrophobic proteinหรือ อยู่กับเมมเบรน ซึ่งยากแก่การทำบริสุทธิ์ ด้วยวิธีมาตราฐานทางชีวเคมีทั่วไป นักวิทยาศาสตร์ปัจจุบันจึงพยายามแก้ปัญหาดังกล่าว โดยอาศัยเทคนิคทาง proteomics และ genomics เข้าช่วย อย่างไรก็ตาม การที่จะใช้ประโยชน์สูงสุดจากผลงานวิจัยที่ได้ จำเป็นต้องอาศัยหลักความรู้พื้นฐานทางด้านกระบวนการชีวสังเคราะห์ยางธรรมชาติเป็นเกณฑ์

พอลิเมอร์ยางธรรมชาติประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น *cis*-isoprene เกือบทั้งหมด โดยขั้นตอนเริ่มแรก(initiation) ของการทำชีวสังเคราะห์ยางจะมีการใช้ allylic diphosphate เป็น priming co-substrate แล้วตามด้วยขั้นตอน elongation หรือ prenyl chain extension เพื่อการสร้างเป็นพอลิเมอร์ยาง(Archer and Audley, 1987; Madhavan et al., 1989; Cornish and Backhaus, 1990). การสังเคราะห์ allylic prenyl diphosphates จะต้องอาศัยเอนไซม์ *trans*-prenyl transferase ซึ่งได้พบเอนไซม์ดังกล่าวมีอยู่ทั้งในส่วนของอนุภาคกันหลอดและส่วนของ C-serum ที่ได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสด (Tangpakdee et al., 1997; Wititsuwannakul and Wititsuwannakul, 2001) และได้พบว่ากิจกรรมการสังเคราะห์ยางจะสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย allylic diphosphates ที่มีความยาวจาก C_5-C_{20} โดยยิ่งสั้นยิ่งกระตุ้นได้น้อยลง เช่น $C_5 < C_{10} < C_{15} < C_{20}$ (Archer and Audley, 1987). ซึ่งต่อมาการศึกษาโดยอาศัยเทคนิคทาง ^{13}C-NMR พบว่ากลุ่มหน่วยย่อยไอโซพรีนที่ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้น (initiating species) ในการต่อเติมหน่วยย่อย IPP แบบ *cis* addition ไปเรื่อยๆ จนเป็น rubber polymer (*cis*-1,4-polyisoprene) เป็น trans-allylic diphosphate จำพวก farnesyl pyrophosphate (Tanaka et al., 1996). ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบว่าอนุภาคยางเป็นแหล่งที่สร้าง initiating species ด้วยหรือไม่ มีการควบคุมการสร้าง initating species พร้อมทั้งความยาวของพอลิเมอร์ยาง อย่างไร

คณะผู้วิจัยได้พบว่าของอนุภาคกันหลอดซึ่งปราศจากจากอนุภาคยาง (Witisuwannakul et al., 2003) และเมมเบรนของอนุภาคกันหลอด(Wititsuwannakul et al, 2004, Appendix 3) ที่สามารถเตรียมได้หลังการปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge ก็มีประสิทธิภาพในการสร้างพอลิเมอร์ยางเช่นกัน จึงทำให้น่าคิดว่ารายงานการศึกษาชีวสังเคราะห์ยางบนอนุภาคยางที่มีมาในอดีตนั้น เป็นการศึกษาบนอนุภาคยางบริสุทธิ์จริงๆ หรือเป็นอนุภาคยางที่ปนเปื้อนด้วยเมมเบรนโปรตีนจากอนุภาคกันหลอดที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ยาง ที่หลุดออกไปเครือค่ายเมมเบรนร่างแห ซึ่งได้มีการสาธิตไว้เป็นภาพวาด (ดังรูปด้านล่าง)โดย Southorn (1961) โดยจะเห็นได้ว่าอนุภาคในน้ำยางที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง (rubber) อนุภาคลูทอยด์ (lutoid) และ

อนุภาค เฟรวีสลิ่ง (Frey Wysling) นั้นในสภาพธรรมชาติในท่อน้ำยาง จะเชื่อมโยงกันเป็นเครือข่ายร่างแห (reticulum) แขวนลอยอยู่ในส่วนของของเหลว (cytosol) ในน้ำยาง แรงเหวี่ยงของเครื่อง ultracentrifuge ทำให้น้ำยางสดที่นำมาศึกษามีการสูญเสียความเสถียรของเครือข่ายเมมเบรนร่างแหดังกล่าว นอกจากนั้น Southorn (1961)ยังได้สันนิฐานไว้ว่าเครือข่ายร่างแหเหล่านี้น่าจะเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่สร้างพอลิเมอร์ยาง



รูป B.1 รูปสาธิตถึงความเป็นไปได้ของการเชื่อมโยงของอนุภาคต่างๆในท่อน้ำยาง โดย Southorn , 1961

เมื่อทำการแยกน้ำยางสด โดยการปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 49,000g นาน 45 นาที อนุภาคต่างๆที่ประกอบเป็นเครือข่ายร่างแหจะถูกแรงเหวี่ยงแยกออกจากกัน โดยอนุภาคยางจะลอยขึ้นไปอยู่ชั้นบนสุดโดยบริเวณใต้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟรวีสริ่งเกาะติดอยู่ด้วยเล็กน้อย ส่วนใหญ่ของอนุภาคลูทอยด์และเฟรวีสริ่งจะถูกเหวี่ยงไปอยู่บริเวณก้นหลอด ดังนั้นการค้นพบถึงประสิทธิภาพของอนุภาคก้นหลอดว่าเกี่ยวข้องกับการทำชีวสังเคราะห์ยางโดยคณะผู้วิจัย [Wititsuwannakul et al., 2003, Wititsuwannakul et al, 2004 (Appendix 3) ; Rattanapittayaporn et al. 2004 (Appendix 4)] จึงเป็นการเสริมข้อสันนิฐานของ Southorn (1961)

การศึกษาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยางในรายงานนี้ จึงเป็นการศึกษาต่อเนื่องจากที่เคยทำไว้ โดยจะทำการวิเคราะห์ขนาดของพอลิเมอร์ยางที่สร้างโดยอนุภาคต่างๆของร่างแหเมมเบรน พร้อมทั้ง จะศึกษาหาคุณสมบัติของอนุภาค เฟรวีสลิ่งซึ่งเป็นสมาชิกของเครือค่ายร่างแหเพิ่มเติม เพราะในอดีตแถบไม่มีข้อมูลการศึกษาก่อน

B.1) ทำการวิเคราะห์ดูความแตกต่างของขนาดของพอลิเมอร์ยางที่สังเคราะห์โดยเมมเบรนโปรตีนของอนุภาคต่าง ๆในเครือข่ายร่างแห

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมและล้างอนุภาคก้นหลอด

นำน้ำยางสดที่กรีดจากต้นยางพันธุ์ RRIM600 โดยรองรับด้วยภาชนะที่แช่ไว้ในน้ำแข็ง ไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 49,000g เป็นเวลา 40 นาที น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นบนสุดเป็นชั้นของอนุภาคยาง ชั้นกลางเป็นของเหลวใส cytosol (C-serum) และชั้นล่างสุดเป็นส่วนของอนุภาคก้นหลอด (bottom fraction, BF) แยกเอาส่วนของ BF ไปล้างด้วยสารละลายบัปเฟอร์ [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)]ที่ผสมด้วย 0.9% NaCl (w/v) จำนวน 3 ครั้ง และแยกส่วนของ BF ที่ผ่านการล้างสะอาดแล้ว (washed bottom particles, WBP) ด้วยการปั่นแยกที่ 4500g เป็นเวลา 30 นาที เก็บไว้ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง

b) การเตรียมเมมเบรนจากอนุภาคก้นหลอด

นำ WBP หรืออนุภาคก้นหลอดที่ผ่านการล้างแล้วไปทำให้แตกโดยไปผสมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 3 เท่าแล้วกวนโดยการใช้เครื่องกวน แยกส่วนของเมมเบรนออกโดยการปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 4500g นาน 60 นาที แล้วทำการล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายบัปเฟอร์ [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)]ที่ผสมด้วย 0.9% NaCl (w/v)] เก็บส่วนของเมมเบรนที่ผ่านการล้าง (washed bottom membrane, WBM) เก็บไว้ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง

c) การเตรียมและล้างอนุภาคยาง

แยกเอาส่วนของอนุภาคยางขนาดเล็ก หรือบริเวณ Zone 2 ตามที่ Moir (1950) ได้อธิบายไว้ หลังการปั่นแยกน้ำยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 49,000g เป็นเวลา 40 นาที นำไปล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายบัปเฟอร์ [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] ปริมาตร 5 เท่า นำอนุภาคยางที่ผ่านการล่าง (washed rubber particle, WRP) เก็บไว้ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็ง

d) การวิเคราะห์ปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง

Assay mixture ของปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยางประกอบด้วยสับเตรท IDP , allylic diphopshate initiator ^{14}C-IDP, ^{3}H-FPP หรือ ^{14}C-UPP ,เมมเบรนโปรตีนจาก WRP หรือ WBM โดยผสมอยู่ใน บัปเฟอร์ (50 mM Tris-HCl, pH7.7) ตามรายละเอียดที่บ่งกำกับไว้ได้รูปหรือตาราง พร้อมด้วย reagents เริ่มปฏิกิริยา (30 mM KF, 5 mM $MgCl_2$ และ10 mM DTT) และมีการเติม 20 mM EDTA ลงในปฏิกิริยาควบคุม โดยจะใช้การบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่น้ำแข็ง ก่อนนำไปสกัด radiolabeled rubber

e) การวิเคราะห์ radiolabeled rubber ที่ได้จากปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง

ทำการตกตะกอน radiolabeled rubber (^{3}H-rubber หรือ ^{14}C-rubber) ที่ได้จากปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง โดยการเติมเอททานอลลงไปใน assay mixture แล้วปั่นแยกตะกอนที่ 12000g นาน 45 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายในสารละลาย hexane:toluene (1:1) แล้วปั่นแยก

เอาส่วนที่ละลาย ไประเหยเพื่อลดปริมาตรลงแล้วตกตะกอน radiolabeled rubber บริสุทธิ์ ด้วยอะซิโตนหรือเอททานอล นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน toluene ปริมาตร 150 µl ทำบริสุทธิ์ radiolabeled rubber ด้วยการตกผลึก ด้วยอะซิโตนแช่เย็นปริมาตร 750 µl จำนวน 3 ครั้ง นำตะกอนที่ได้ไปละลายใน toluene ซึ่งบรรจุอยู่ในขวด scintillation แล้วนำไปใส่ในเครื่อง scintillation counter เพื่อวิเคราะห์คำนวณหาปริมาณสารรังสีของ radiolabeled rubber ที่ได้ต่อไป

f) การทำชีวสังเคราะห์ยางโดย WRP ต่อจาก ^{14}C-UPP Rubber ที่สร้างโดย WBM

นำ 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7 (37,650 cpm) ที่สร้างจาก ^{14}C-UPP โดย WBM ไป incubate กับ WRP ในบัปเฟอร์ (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7) ปริมาตร 200 µl ที่ประกอบด้วย 40 mM DOC, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT และ 1 mM IPP ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่น้ำแข็ง และทำการแยก ^{14}C-rubber ดังรายละเอียดที่กล่าวในข้างต้น

g) การวิเคราะห์ molecular weight distribution (MWD) ของ ^{14}C-rubber

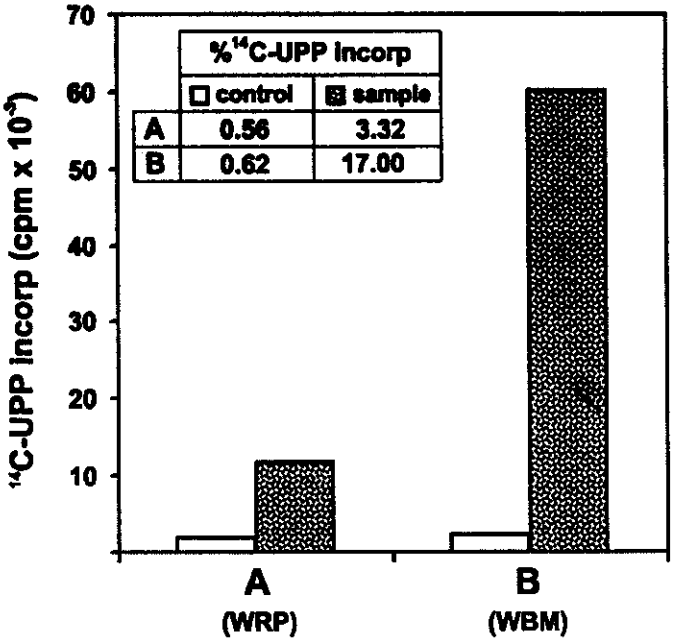
นำสารละลายใส tetrahydrofuran (THF) ที่มี ^{14}C-rubber บริสุทธิ์ละลายอยู่ไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel permeation chromatography (GPC) โดยใช้ซีรีของคอลัมน์ TSK gel (Tosho)ที่ต่อเนื่องกัน 4 คอลัมน์ มีค่า exclusion limit ดังนี้1.01 x 10^6, 1.72 x 10^5, 1.13 x 10^4 และ 1.30 x 10^3) การทำ GPC ใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที ทำการวัดค่าดูดกลืนแสง (λ210 nm) และ ปริมาณรังสีของ polyisoprene ใน fraction ต่าง ๆที่ถูกชะออกมาทุก ๆนาที พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers.

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

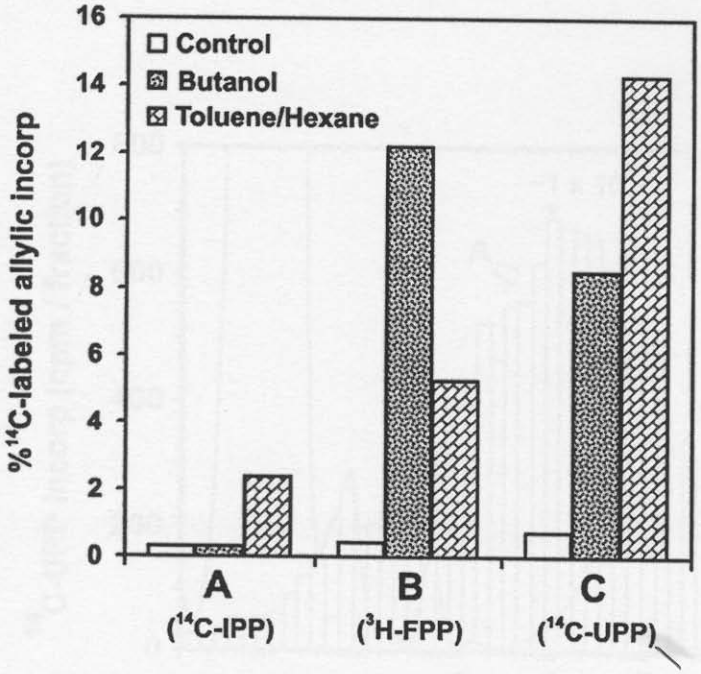
จากผลในรูปที่ B.2 จะเห็นว่าเมื่อใช้ ^{14}C-UPP เป็น allylic diphosphate initiator เมมเบรนโปรตีนของอนุภาคลูทอยด์และเฟรวีสริ่ง หรือ อนุภาคมกันหลอด (WBM) มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ยางได้มากกว่าอนุภาคยางขนาดเล็กถึง 5 เท่า โดยประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ยางของ WBM ที่ได้จากการใช้ ^{14}C-UPP เป็น allylic diphosphate initiator จะสูงกว่าที่ได้จากการใช้ ^{14}C-IPP และ ^{3}H-FPP ประมาณ 6 และ 2.5 เท่าตามลำดับ (รูปที่ B.3) โดยน้ำหนักโมเลกุลของยางที่สร้างจาก ^{14}C-UPP โดย WBM ที่วิเคราะห์ได้จาก GPC อยู่ในช่วง 1 - 4 x 10^5 และมี MWD เป็น แบบ skewed unimodal (รูปที่ B.4-5) โดยน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ยางดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าหรือเพิ่มขึ้นเป็น 9 x 10^5 เมื่อนำไป incubate กับ WRP ที่มีการเติม 60 µM IPP โดยมี MWD แบบ unimodal (รูปที่ B.6)

ผลของการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลยาง ที่สร้างโดยเมมเบรนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ของยางธรรมชาติ ทำให้ได้ความรู้พื้นฐานใหม่ที่สนับสนุนข้อสันนิฐานของนักวิทยาศาสตร์ (Southorn, 1961) ยุคบุกเบิก ว่าโมเลกุลยางน่าจะถูกสร้างขึ้นในร่างแหเมม

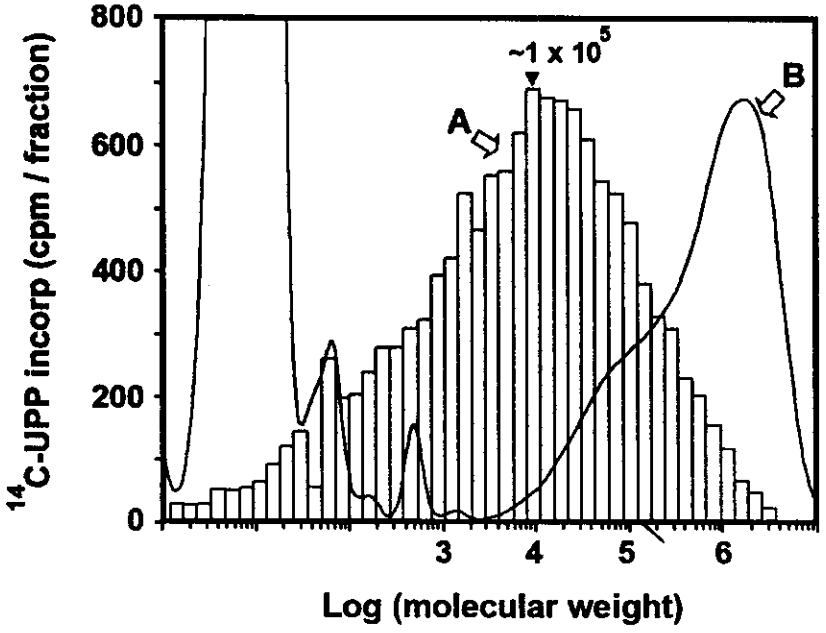
เบรนที่เชื่อมอนุภาคยาง อนุภาคลูทอยด์ และ อนุภาค เฟรวีสลิ่ง เข้าด้วยกัน โดยลำดับขั้นตอนการสร้างระดับ early elongation จะเริ่มจากอนุภาคกันหลอดซึ่งประกอบด้วยอนุภาคเฟรวีสลิ่งและอนุภาคลูทอยด์ ทำการสร้างได้พอลิเมอร์ยางที่มีขนาดเล็ก (1 - 4 x 10^5) และมี MWD เป็น แบบ skewed unimodal หลังจากนั้นการสร้างระดับ late elongation ให้ได้พอลิเมอร์ยางที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (9 x 10^5) จะเกิดขึ้นที่อนุภาคยางขนาดเล็ก ตามลำดับ ทั้งนี้จะอาศัยเอนไซม์ rubber transferase ชนิดต่างๆที่เกาะอยู่กับเมมเบรนของอนุภาคดังกล่าว



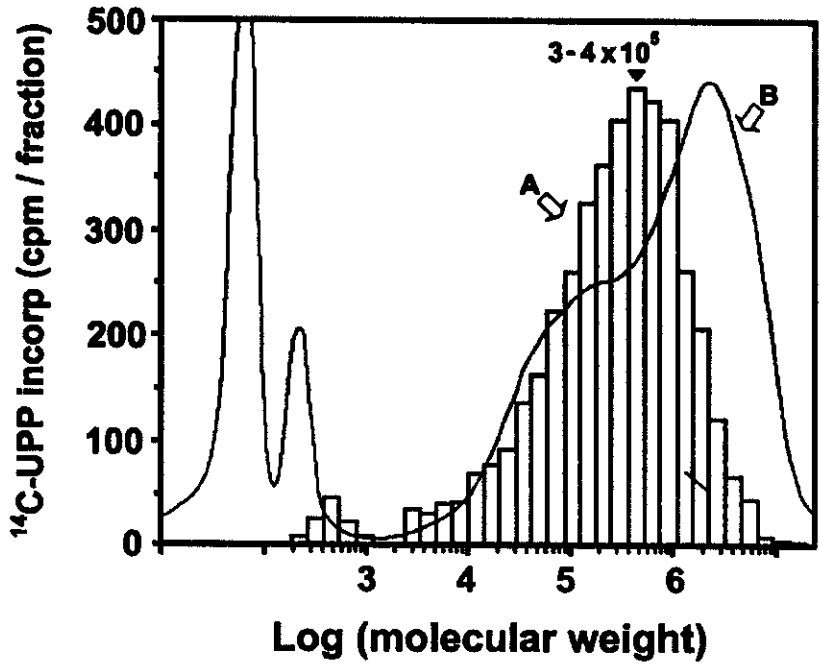
รูปที่ B.2 ชีวสังเคราะห์ยางโดย WRP (A) และ WBM (B) ซึ่งปริมาณที่ใช้เทียบเท่าน้ำหนักแห้งประมาณ 20 mg และมี ^{14}C-UPP (354,000 cpm) เป็น allylic initiator โดยใน ปฏิกิริยาควบคุมจะใส่ 20 mM EDTA ระดับกิจกรรมแสดงในรูปของ % ^{14}C-UPP ที่ถูก incorporate เข้าไปในโมเลกุลยางที่ได้จากการสกัด toluene/hexane (1:1, v/v).



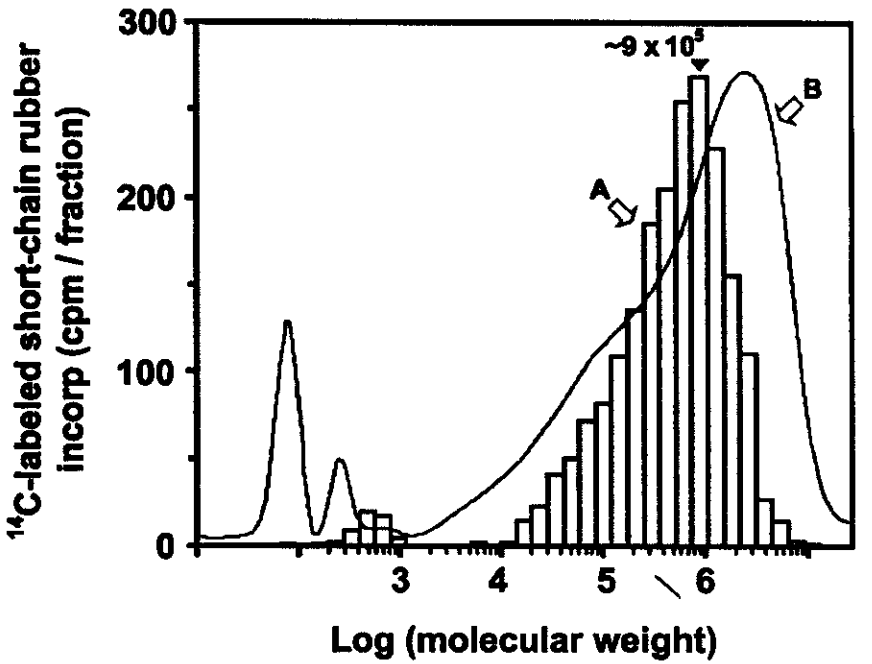
รูปที่ B.3 อิทธิพลของ allylic isoprene ที่มีต่อชีวสังเคราะห์ยางโดย WBM ปฏิกิริยาปริมาตร 200 µl ประกอบด้ว WBM (ปริมาณน้ำหนักแห้ง 20 mg), 60 µM IPP , radiolabeled allylic initiators [12.5 µM ^{3}H-FPP ,7 ci/mol (B) or 100,900 cpm ^{14}C-UPP (C)] สำหรับปฏิกิริยา (A) ไม่มี allylic initiator แต่มี 15 µM ^{14}C-IPP (15 ci/mol) โดยใน ปฏิกิริยาควบคุมจะใส่ 20 mM EDTA ระดับกิจกรรมแสดงในรูปของ % ^{14}C-UPP ที่ถูก incorporate เข้าไปในโมเลกุลยางที่ได้จากการสกัด toluene/hexane (1:1, v/v)



รูปที่ B.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของยางที่สร้างโดยส่วนของ WBM ที่ตกตะกอนด้วย acetone ช่วง 0-20%โดยมี UPP เป็น allylic initiator ด้วย GPCทำแยก radiolabeled rubber ออกจาก origin spot หลังการนำไปแยกด้วย ด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที ทำการวัดค่า ปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสง ที่ λ210 nm (B) ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชะออกมาทุกๆนาที พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers.



รูปที่ B.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของยางที่สร้างโดย WBM โดยมี UPP เป็น allylic initiator ด้วย GPC ทำแยก radiolabeled rubber ออกจาก origin spot หลังการนำไปแยกด้วย ด้วย TLC แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที ทำการวัดค่า ปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสง ที่ λ210 nm (B) ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชะออกมาทุกๆนาที พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers

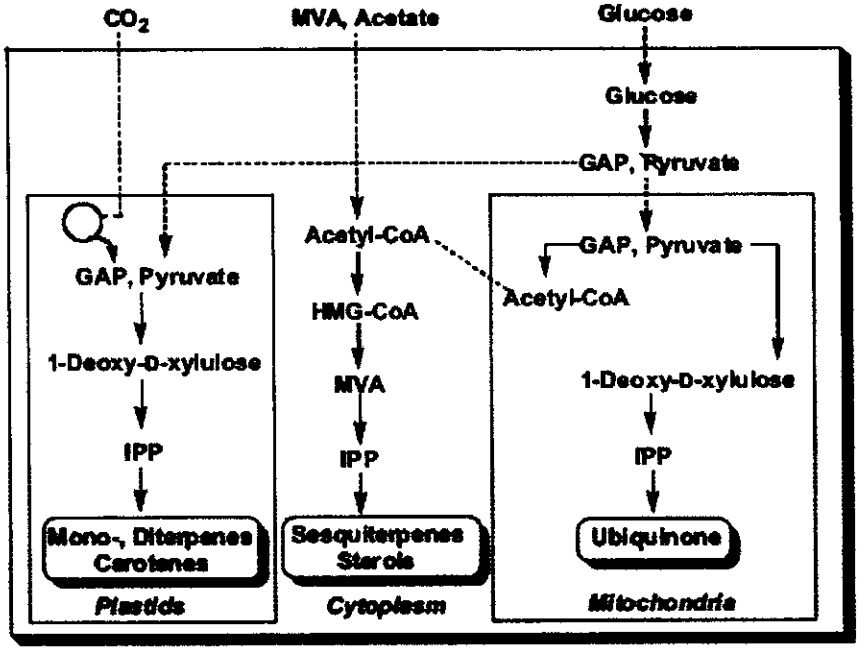


รูปที่ B.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ยางที่เพิ่มขึ้น เมื่อนำพอลิเมอร์ยางที่สร้างโดย WBM (รูปที่ B.5) ไปincubate กับ WRP ที่มีการเติม 60 μM IPP โดยนำ radiolabeled rubber ที่แยกได้จาก origin spot หลังการทำ TLC ไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชะ ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที ทำการวัดค่าปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสงที่λ210 nm (B) ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชะออกมาทุกๆนาที พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers

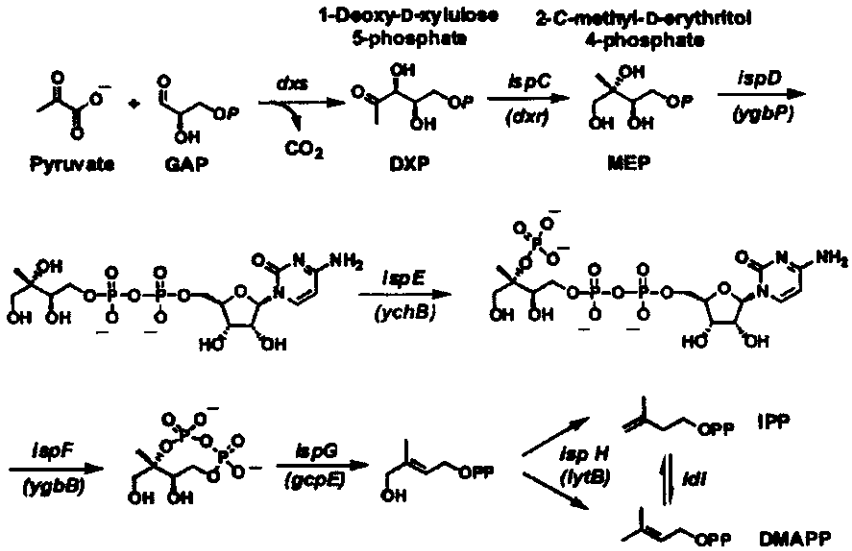
B.2) การ ศึกษาคุณสมบัติของอนุภาค เฟรวีสลิ่งที่อยู่ในเครือค่ายร่างแห

B2.1) การโคลนนิ่งเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR)

อนุภาคอนุภาคเฟรวีสสลิ่ง นี้แตกต่างจากอนุภาคลูทอยด์ และอนุภาคยางในเครือข่ายร่างแห (reticulum) ตรงที่เป็นอนุภาคที่มีเมมเบรนห่อหุ้ม 2 ชั้น คล้ายๆกับอนุภาค plastid จำพวก chromoplast และ leucoplast ของพืชอื่นโดยทั่วไป วิถีการสังเคราะห์ isoprene ในอนุภาค plastid จะเป็นแบบ MEP pathway ซึ่งจะแตกต่างจากวิถี (MVA pathway) ที่มี HMG-CoA reductase เป็น rate-limiting enzyme และเกิดขึ้นใน cytosol (รูปที่ C.6) แต่วิถี MEP pathway จะอาศัย glyceraldehyde 3-phosphate และ pyruvate ซึ่งได้จากการสลาย glucose โดยวิถี pentose phosphate เป็นสารตั้งต้นและมี 1-Deoxy-D-xylulose reductase (DXR) เป็น rate-limiting enzyme (รูปที่ C.7)



รูปที่ B.7 วิถีการสังเคราะห์ isoprene ใน ออร์แกนแนล (plastid และ mitochondria) และไซโตพลาสซึม



รูปที่ B.8 The non-mevalonate pathway or 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate/1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway (MEP/DOXP pathway) of isoprenoid biosynthesis

ดังนั้น หากอนุภาคเฟรวีสลิ่ง สามารถสร้าง IPP ได้จาก glucose ก็อาจมีความเป็นไปได้ว่าต้นยางสามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ในเครือข่ายร่างแหให้ไปเป็นยางโดยตรง

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมอนุภาคเฟรวิสริ่ง

นำน้ำยางสดมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 1700g อุณหภูมิ 10°C นาน 30 นาที ใน swing-out bucket rotor เพื่อลดการชนกระแทกระหว่างอนุภาคต่าง ๆของน้ำยางในขณะที่ถูกเหวี่ยง ทำการกำจัดส่วนครึ่งบนซึ่งส่วนใหญ่เป็นอนุภาคยางออกไป แล้วนำส่วนครึ่งล่างที่เหลือไปปั่นแยกที่ 7000g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที โดยใช้ fixed angle rotor น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นยางจะอยู่บนสุด โดยใต้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟรวิสริ่งสีเหลืองอมส้มแขวนลอยอยู่ ทำการรวบรวมอนุภาคแขวนลอยดังกล่าว แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 59,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที ทำการล้างตะกอนอนุภาคเฟรวิสริ่ง 3 ครั้งด้วยบัปเฟอร์

b) การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ^{14}C-prenyl ที่สร้างจาก ^{14}C-glucose โดยอนุภาคเฟรวิสริ่ง

นำอนุภาคเฟรวิสริ่งที่เตรียมได้ไปทำให้แตกโดยวิธี sonication แล้ว นำไปสกัดเอาส่วนใสโดยการปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 10,000g ที่ 4°C นาน 10 นาที นำส่วนใสปริมาตร 100 µl ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 280 µg ไปใส่ใน reaction mixture ปริมาตร 500 µl ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 30 mM KF, 0.15 NADPH, 74 µM mevinolin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ในกรณีที่ใส่) และ 1 mM [^{14}C]glucose (5 Ci/mol) ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 oC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการแยกผลิตภัณฑ์ prenyl diphosphate ด้วย 1-butanol แล้วทำการสลายหมู่ฟอสเฟตด้วยออกโดยใช้เอนไซม์ potato acid phosphatase สกัดผลิตภัณฑ์ prenols ที่ได้ด้วย pentane แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC บนแผ่น reverse LKC-18 plate และใช้ acetone/water (19:1, v/v) เป็นตัวชะ ทำการเปรียบเทียบขนาดกับ prenols มาตรฐานที่สามารถมองเห็นได้โดยอาศัยไอระเหยไอโอดีนพร้อมกับวิเคราะห์หาปริมาณ radioactive ในผลิตภัณฑ์ prenols ด้วยเครื่อง Bioimage analyzer

c) การโคลนนิ่ง cDNA ของ1-deoxy-D-xylulose reductase (DXR)

ทำโดยใช้ PCR product ที่มีความจำเพาะซึ่งได้ออกแบบมาจากลำดับเบปไทด์ของเอนไซม์ solanesyl diphosphate synthase ใน ฐานข้อมูล มาใช้เป็นตัวติดตามในการตราวจหายีนดังกล่าวจากห้องสมุดซีดีเอ็นเอที่เตรียมจากน้ำยางพารา จากนั้นชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวได้ถูกนำมาออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ ดังรายละเอียดใน (Yoonrum et al, 2008, Appendix 4)

d) การวิเคราะห์การแสดงออก mRNA ของ DXR

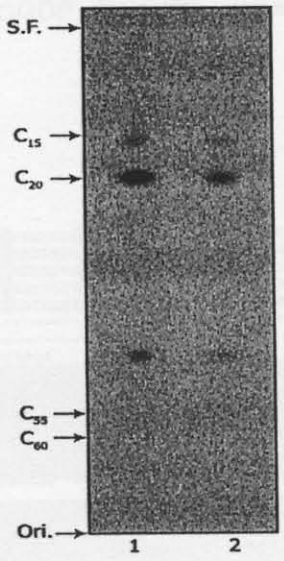
ทำการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR โดยการ amplify total RNA (1กรัม) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆด้วย primer .ที่ออกแบบจำเพาะกับ DXR

e) การหาตำแหน่งที่อยู่ของ DXR ภายในเซลล์

การหาตำแหน่งที่อยู่ของ DXR ภายในเซลล์ ทำโดยอาศัยเทคนิคทาง Gateway cloning systemดังรายละเอียดใน Yoonrum et al, 2008 (Appendix 5)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

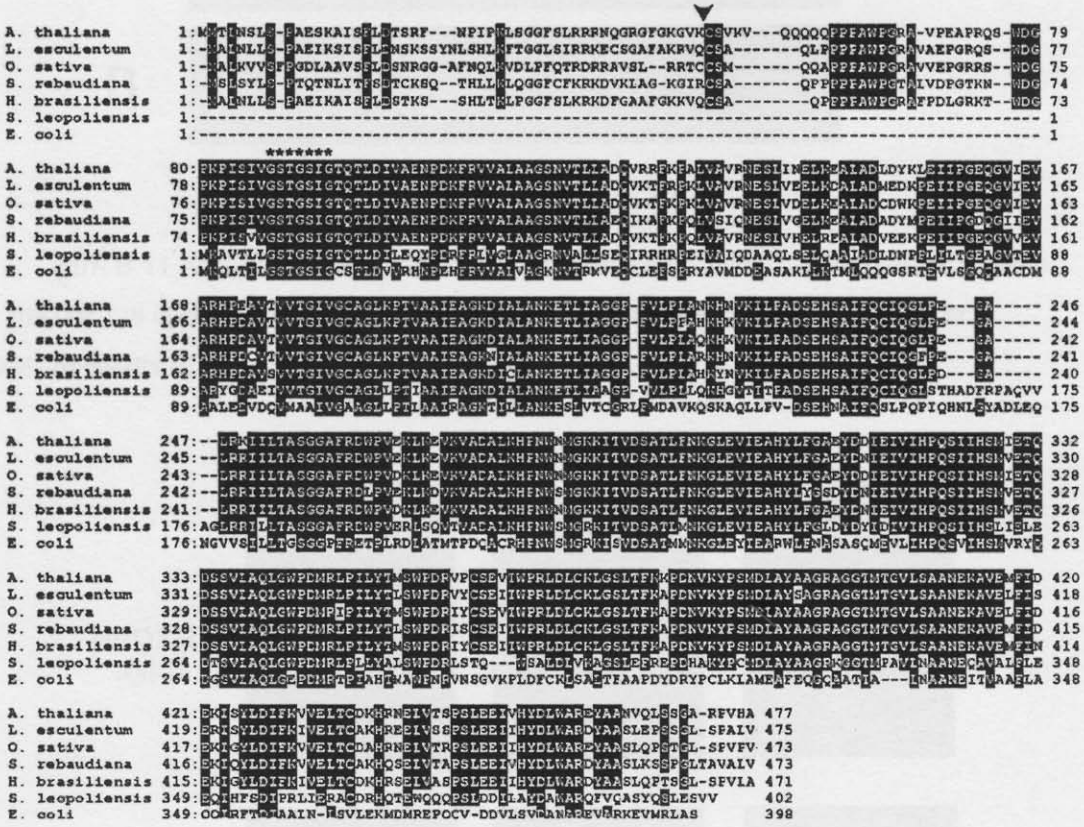
จากการนำ [^{14}C] glucose ไป incubate กับอนุภาคเฟรวีสลิ่ง ในสภาพที่มีตัวยับยั้ง HMG-CoA reductase (mevinolin) พบว่าอนุภาคเฟรวีสลิ่งสามารถสร้างสาร [^{14}C] prenyl ได้หลายชนิดรวมทั้ง FDP และ GGDP จาก [^{14}C] glucose แต่ปริมาณที่ได้จะเห็นว่าต่ำกว่าที่ได้ในสภาพที่ไม่มีการใส่ตัวยับยั้ง mevilonin (รูปที่ B.9) และเนื่องจากมีการรายงานว่า FDP เป็น allylic diphosphate ที่ถูกใช้เป็น initiation species ในการเริ่มกระบวนการชีวสังเคราะห์ยาง ดังนั้นอนุภาคเฟรวีสลิ่งอาจจะทำหน้าที่สร้าง initiating primer ให้กับพอลิเมอร์ยางก็ได้ แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานใดๆได้ทำการยืนยันว่าอนุภาคเฟรวีสลิ่งเป็นอนุภาคประเภท plastid จริงๆ ดังนั้นคณะวิจัยจึงได้ทำการโคลน cDNA ของเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose reductase (DXR) ซึ่งเป็น rate-limiting enzyme ในการสังเคราะห์ isoprene โดยวิถี MEP ใน plastid จากการใช้ cDNA library ที่เตรียมได้จากน้ำยาง เพื่อเป็นการยืนยัน



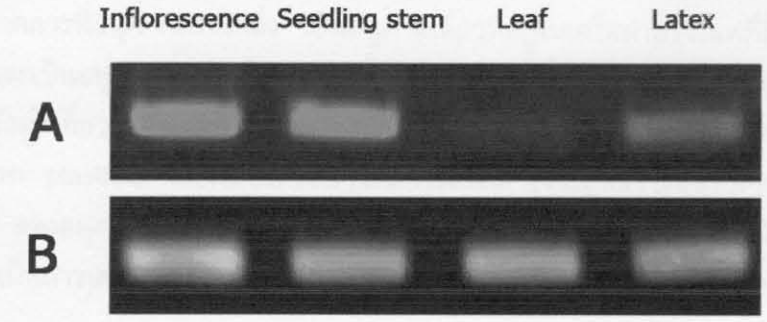
รูปที่ B.9 TLC autoradiogram ของ [^{14}C]prenyl (หลังการย่อยด้วย acid phosphate) ที่ได้จากการ incubate [^{14}C] glucose กับอนุภาคอนุภาคเฟรวีสลิ่ง ในสภาพที่ไม่มี (lane 1) และมี mevinolin (lane2) ผสมอยู่ด้วย (S.F. = solvent front; Ori = origin) (Yoonrum et al, 2008, Appendix 5)

ผลการโคลนยีน DXR จากยางพารา (HbDXR) โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมได้จากน้ำยาง พบว่า ยีน HbDXR ประกอบไปด้วยหนึ่ง putative ORF (open reading frame) ที่มี % การเรียงลำดับเบสคล้ายคลึงกับ DXR ในพืชอื่นๆคือ *L. esculentum* (86%), *A. thaliana* (82%), *S. rebaudiana* (82%), and *O. sativa* (80%) (รูปที่ B.10) โดยโปรตีนที่สังเคราะห์จาก HbDXR จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว และคาดว่ามี molecular mass เท่ากับ 50.97 kDa นอกจากนั้นยังพบว่าระดับการ expression ของยีน HbDXR มีมากที่สุดในในเนื้อเยื่อส่วนที่มาจากช่อดอกและลำต้นอ่อนของต้นกล้ายาง มีระดับปานกลางในน้ำยาง และแทบไม่มีเลยในใบยางแก่ (รูปที่ B.11) ดังนั้นยีน HbDXR ที่โคลนได้น่าเป็นชนิดที่มีความจำเพาะต่อท่อน้ำยาง จากการตรวจดูยีน HbDXR ด้วย ChloroP algorithm พบว่า HbDXR มีกรดอะมิโน 80 ตัวด้าน N-terminal ที่น่าจะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่เป็น transit peptide เพื่อนำ DXR เข้าไปใน plastid ซึ่งสามารถยืนยันจากผลการทดลองโดยการ fuse ยีน HbDXR ด้วย GFP fluorescent ตรงบริเวณ C-terminal แล้วนำไปใส่ในเซลล์ *Arabidopsis* ปรากฏว่าสามารถพบยีน HbDXR ในบริเวณที่เป็น chromoplastid (chloroplast) (รูปที่ B.12) ดังนั้น อนุภาคเฟรวิสริ่งจึงเป็นอนุภาคพลาสติดที่จำเพาะสำหรับท่อน้ำยาง และน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างหน่วยย่อยไอโซพรีน ที่ใช้ในการสร้าง

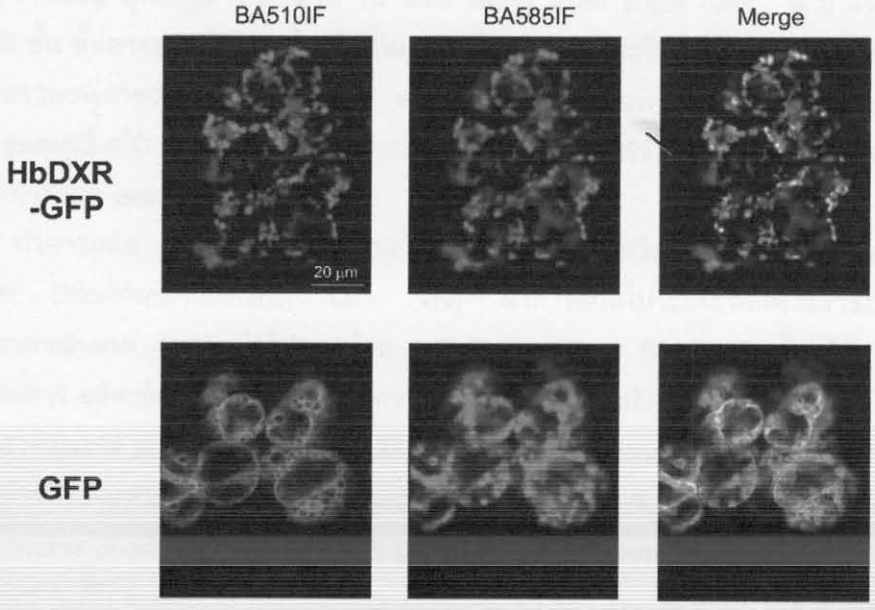
หมู่พรีนิลเช่น FDP และ GGDP ซึ่งใช้เป็น primer สำหรับการสร้างโมเลกุลยาง ในขั้นตอน initiation step



รูปที่ B.10 Multiple sequence alignment of the deduced amino acid of HbDXR and DXRs from four other plants including two of those from bacteria. The residues boxed in black indicated the positional identity for at least four of six compared sequences. Dashed indicate gaps introduced in order to optimize the alignment. Asterisks indicate the NADPH-binding motif. The putative cleavage site is indicated with an arrowhead. The cDNA accession number are *A. thaliana*; AF148852, *L. esculentum*; AF331705_1, *O. sativa*; AF367205, *S. rebaudiana*; AJ429233, *H. brasiliensis*; DQ437520, *S. leopoliensis*; AJ250721 and *E. coli*; AB013300. (Yoonrum et al, 2008, Appendix 5)



รูปที่ B.11 Analysis of mRNA expression patterns by RT-PCR. A: mRNA expression of HbDXR (28 cycles); B: 18S rRNA expression as an internal control. (Yoonrum et al, 2008, Appendix 5)



รูปที่ B.12 Subcellular localization of HbDXR in *Arabidopsis* T87 cells. Cells expressing HbDXR, fused with GFP at C-terminus of GFP and GFP, were observed by laser confocal microscopy. The panels indicated as BA510IF, BA585IF, and Merge show fluorescence images of GFP, the autofluorescence of chlorophylls, and the merged image of green and red fluorescence, respectively. (Yoonrum et al, 2008, Appendix 5)

B.2.2 การโคลนนิ่งเอนไซม์ solanesyl diphosphate synthase (SDS)

จากการที่อนุภาคเฟรวิสลิ่ง เป็นอนุภาคเดียวที่อยู่ในเครือค่ายร่างแหที่มีเมมเบรน 2 ชั้นห่อหุ้ม และเป็นอนุภาคที่มีสีเหลืองอมส้มซึ่งน่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง carotenoids แต่ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับกิจกรรมของอนุภาคนี้ยังมีน้อยมาก คณะวิจัยจึงได้ทำการการวิเคราะห์หาสารจำพวก plastidial isoprenoid เช่น plastoquinone ซึ่งจะถูกสร้างจาก IPP ที่ได้มาจาก MEP pathway ของอนุภาคพลาสติด พร้อมทั้งทำการโคลนนิ่ง cDNA ของ เอนไซม์ SDS ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อเป็นการเสริมข้อมูลคุณสมบัติจำเพาะด้านการเป็นพลาสติดของอนุภาคเฟรวิสริ่งต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมอนุภาคเฟรวิสลิ่ง

นำน้ำยางสดมาปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 1700g อุณหภูมิ 10°C นาน 30 นาที ใน swing-out bucket rotor เพื่อลดการชนกระแทกระหว่างอนุภาคต่างๆของน้ำยางในขณะที่ถูกเหวี่ยง ทำการกำจัดส่วนครีมบนซึ่งส่วนใหญ่เป็นอนุภาคยางออกไป แล้วนำส่วนครีมล่างที่เหลือไปปั่นแยกที่ 7000g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที โดยใช้ fixed angle rotor น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นยางจะอยู่บนสุด โดยใต้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟรวิสลิ่งสีเหลืองอมส้มแขวนลอยอยู่ ทำการรวบรวมอนุภาคแขวนลอยดังกล่าว แล้วนำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 59,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที ทำการล้างตะกอนอนุภาคเฟรวิสริ่ง 3 ครั้งด้วยบัปเฟอร์

b) การแยก plastidal isoprenoid

ทำการสกัด prenyl lipid ออกจากตะกอนอนุภาคเฟรวิสลิ่ง โดยการ reflux ด้วยสารละลาย chloroform/methanol (2:1, v/v) นำสารสกัดไประเหยให้แห้งแล้วละลายด้วย chloroform/methanol (1:1) นำไปแยกด้วย TLC (Kieselgel 60 F254) โดยใช้สารละลาย hexane/diethyl ether/acetic (80:20:1, v/v/v) เป็นตัวชะ นำไปแผ่น TLC ไปส่องใต้แสง UV แล้วแยกเอาส่วนของ prenylquinone (R_f 0.27-0.59) ไปสกัดด้วย chloroform/methanol (1:1) ทำให้แห้ง แล้วนำไปละลายใน solvent A (methanol/propa-o2-ol; 4:1,v/v) แล้วทำการแยก ผ่านคอลัมน์ reverse-phase C18 Symmetry 5 μm (3.9 mmx150 mm) ที่มีการปรับสภาพด้วยสารผสม solvent A กับ solvent B (mrthanol/propan-2-ol;1:1,v/v) ในปริมาตรเท่ากัน ด้วยอัตราการไหล 1 มล./นาที โดยฉีดเข้าเครื่อง HPLC แล้วทำการชะด้วย linear gradient จาก 50-100% ของ solvent B เป็นเวลา 10 นาที แล้วตามด้วย solvent B อีก 10 นาที เตรียมสารละลายมาตรฐาน ubiquinone 10 ใน solvent เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ และทำการยืนยันสาร platoquinone ที่เตรียมด้วยได้โดยวิธี Hirooka et al.(2003)

c) การโคลนนิ่ง cDNA ของ solanesyl diphosphate synthase

ทำโดยใช้ PCR product ที่มีความจำเพาะซึ่งได้ออกแบบมาจากลำดับเบปไทด์ของเอนไซม์ solanesyl diphosphate synthase ใน ฐานข้อมูล มาใช้เป็นตัวติดตามในการตราวจหายีนดังกล่าวจากห้องสมุดซีดีเอ็นเอที่เตรียมจากน้ำยางพารา จากนั้นชิ้นส่วนของยีนดังกล่าวได้ถูก

นำมาออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ ดังรายละเอียดใน (Phatthiya et al, 2007, Appendix 6)

d) การเตรียม *Hevea* solanesyl diphosphate synthase (HbSDS)

ทำโดยการนำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a/HbSDS ซึ่งได้โคลนยีน SDS ที่มาจาก พลาสมิด pGEM T-easy/HbSDS มาชักนำให้โปรตีน SPS แสดงออก แล้วทำการแยก SDS จากส่วน pellet fraction ของ cell homogenate หลังการปั่นแยก

e) การวิเคราะห์กิจกรรมของHbSDS

ส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยางในปริมาตรของสารทั้งหมด 0.1 ml มี 50 mM Tris/HCl buffer, (pH 7.5) , 5 mM $MgCl_2$, 20 mM β-mercaptoethanol , 50 μM farnesyl diphosphate, 50 μM [1-^{14}C] IPP (2.15 GBq.mmol^{-1}), 0.5% Triton X-100 และ 200 μg ของ crude enzyme ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

f) การวิเคราะห์ product ที่ได้จากกิจกรรมของHbSDS

ทำการสกัด product prenyl diphosphate ที่ได้ที่ได้หลังการบ่มด้วย butanol แล้วใช้เอนไซม์ potato acid phosphatase ย่อยหมู่ฟอสเฟตออก จากนั้นนำไปแยกบนแผ่น TLC ชนิด reverse-phase LKC-18 โดยใช้ตัวทำละลาย acetone/water (19:1,v/v) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bio-image analyzer

g) การวิเคราะห์การแสดงออก mRNA ของ HbSDS

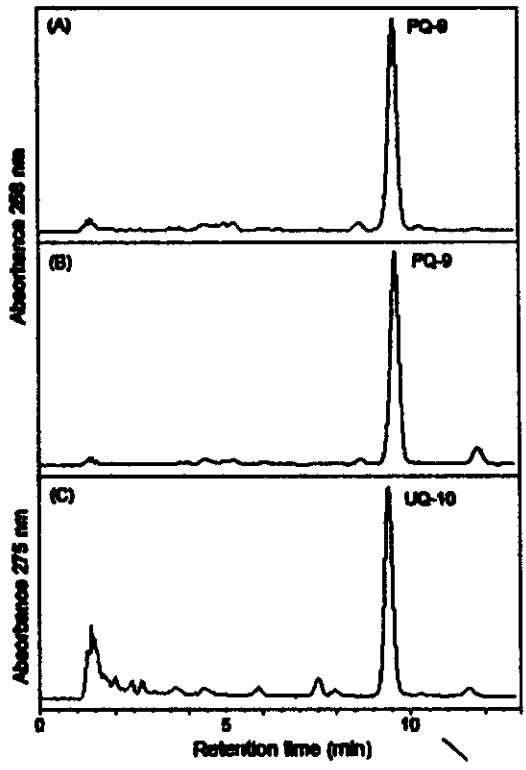
ทำการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR โดยการ amplify total RNA (1กรัม) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆด้วย primer ที่ออกแบบจำเพาะกับ HbSDS

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

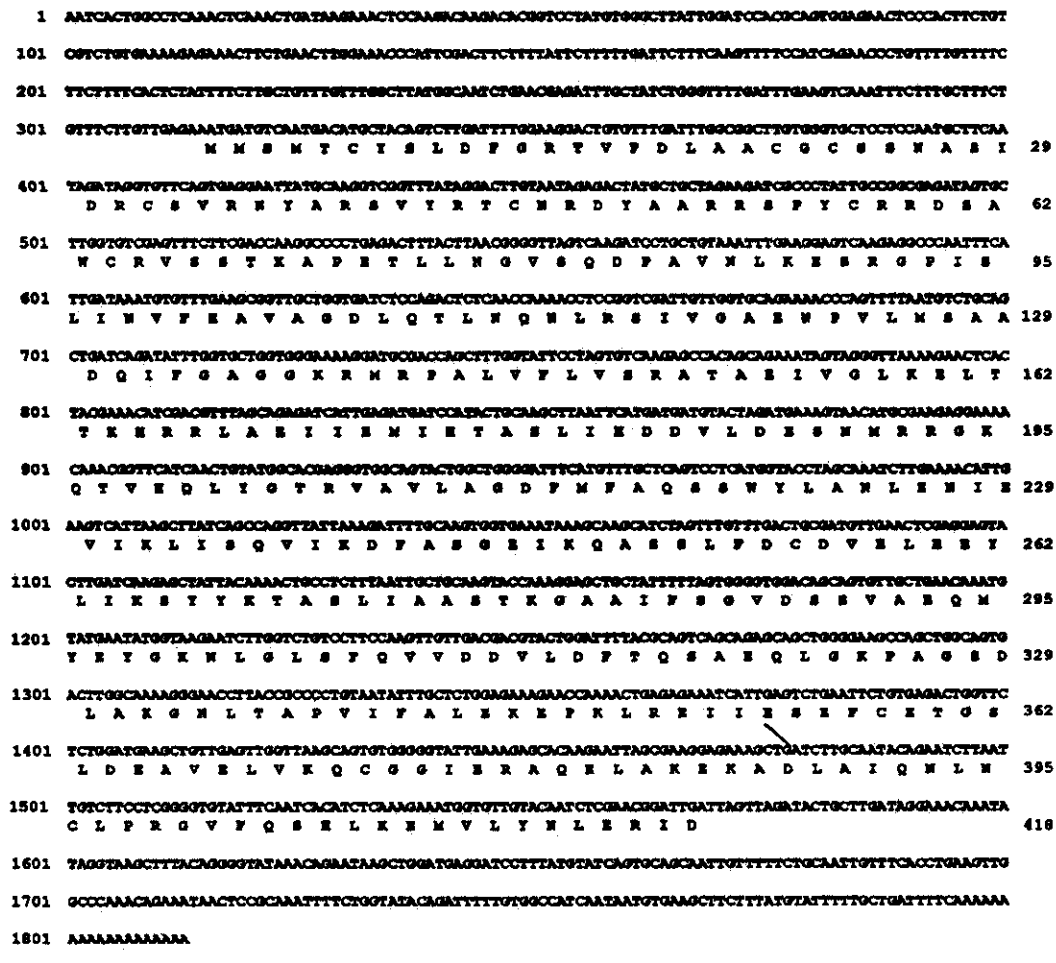
ผลจากการนำสาร plastidal isoprenoid ที่สกัดจากอนุภาคเฟรวิสริงไปทำบริสุทธิ์โดยวิธี TLC และ วิเคราะห์ด้วย HPLC (รูปที่ B.13) โดยเปรียบเทียบกับ plastidal isoprenoid (PQ-9 และ UQ-10) ที่สกัดจาก chloroplast และ mitochondria ของใบ ปรากฏว่าเป็นสารสกัดจากเฟรวิสริงเป็นชนิด PQ-9

ผลการโคลนยีน SDS จากยางพารา โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมได้จากน้ำยาง พบว่ายีน HbSDS ประกอบไปด้วยหนึ่ง ORF (open reading frame) ที่ encode กรดอะมิโน 418 ตัว หรือโปรตีนขนาด 46 kD (รูปที่ B.14) โดยการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวใน E. Coli จะอยู่ในรูปของ recombinant protein ขนาด 60 kD (รูปที่ B.15) โดยอยู่ในส่วนของตะกอน ทั้งนี้เพราะโปรตีนดังกล่าวประกอบไปด้วยกรดอะมิโนชนิด hydrophobic ถึง 48% ในขณะที่มีกรดอะมิโนชนิด hydrophilic เพียง 28% และ มีกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ SDP synthase 1 ของ *A. thaliana* 70%, ODP synthase ของ *E. Coli* 46% , GDP synthase ของ *Citrus siensis* 41%, GGDP (รูปที่ B.16) และจาก sequence analysis ของ HbSDS โดย Predotar program พบว่าประกอบไป

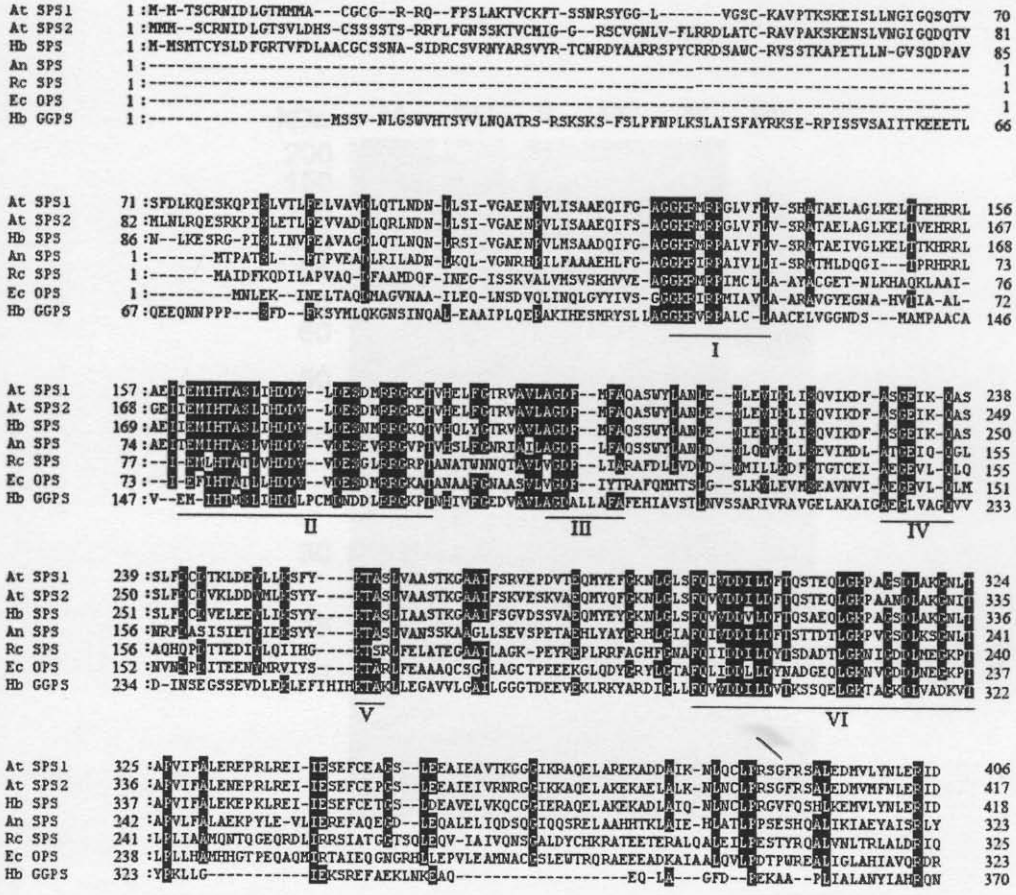
ด้วยส่วนของ plastid targeting sequence นอกจากนั้นยังสามารถยืนยันจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ HbSDS ในสารสกัดที่ได้จาก IPTG-induced *E.Coli* ว่ายีน SDS ที่โคลนได้สามารถสร้าง C_{45} prenyl moiety (รูปที่ B.17) โดยเอนไซม์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อ allylic primers ตามลำดับดังนี้ GGDP>FDP>GDP นอกจากนั้นยังสามารถพบการแสดงออกของ HbSDS mRNAs ได้สูงสุดในน้ำยาง ซึ่งสูงกว่าในใบและส่วนลำต้นของต้นอ่อน แต่ไม่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อราก (รูปที่ B.18) ดังนั้น PQ-9 ในอนุภาคเฟรวีสริงน่าจะทำหน้าที่เป็นปัจจัยหนึ่ง ในปฏิกิริยาต่อเนื่องของกระบวนการ desaturation ที่จำเป็นสำหรับการสร้าง carotenoid หรือ อาจทำหน้าที่เป็นสาร antioxidant คล้ายคลึงกับหน้าที่ของ ubiquinone ใน mitochondria หรือ อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคเหมือนกับที่ได้มีการรายงานไว้ในพืชอื่นๆ



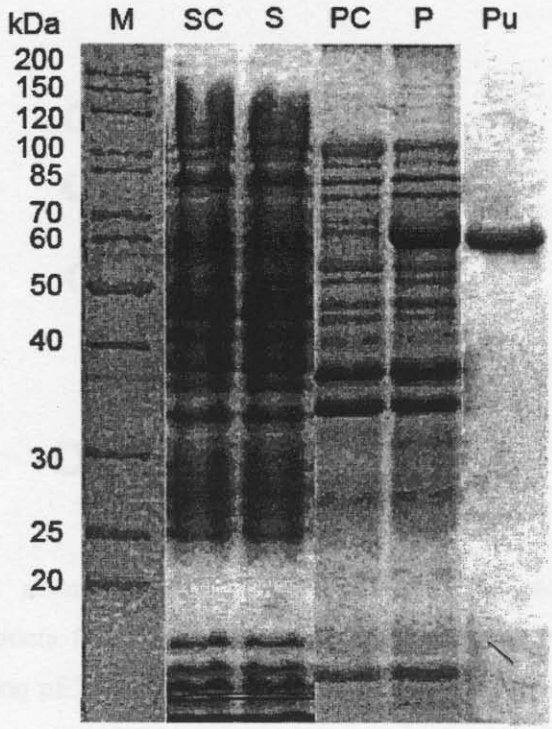
รูปที่ B.13 HPLC chromatogram of *Hevea* prenylquinones. (A) Chloroplast plastoquinone-9 extracted from leaves (B) Frey-Wyssling particle plastoquinone-9 extracted from latex (C) Mitochondrial ubiquinone-10 extracted from leaves. (Phatthiya et al, 2007. Appendix 6)



รูปที่ B.14 Nucleotide and deduced amino acid sequences of HbSDS. Number of nucleotide sequence and amino acid sequence are indicated on the left and right, respectively. (Phatthiya et al, 2007. Appendix 6)



รูปที่ B.15 Comparison of the deduced amino acid sequences of HbSDS. The deduced amino acid sequences of HbSDS are compared with those of solanesyl diphosphate synthases from *A. thaliana* (SPS1 GenBank accession no. **BAD88533)** and SPS2 GenBank accession no. **BAD88534**) and *Rhodobacter capsulatus* (GenBank accession no. **BAA22867**). The filled boxes indicate the positional identity of the sequences. The seven highly conserved regions are underlined. (Phatthiya et al, 2007. Appendix 6)



รูปที่ B.16 SDS-PAGE gel of purified HbSDS. Lane SC and S, soluble protein from non-induced and induced *E. coli* cells, respectively; lane PC and P, insoluble proteins from non-induced and induced *E. coli* cells, respectively; lane Pu, purified HbSDS; lane M, molecular-mass markers. (Phatthiya et al, 2007. Appendix 6)

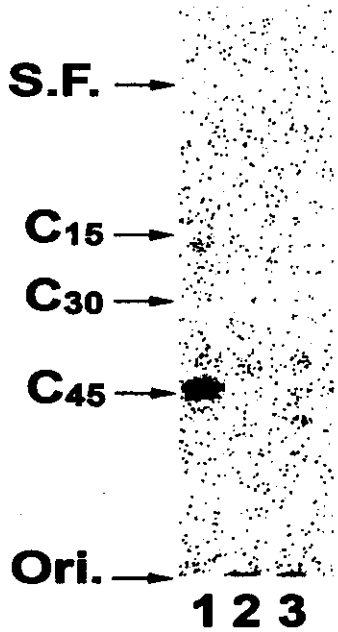


Fig.B.17 TLC autoradiogram of the prenyl alcohols obtained by enzymatic hydrolysis of the products formed by the reaction with cell-free homogenate of IPTG induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 1), non-induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 2), and *E. coli* harboring pET-32 (lane 3). (Phatthiya et al, 2007. Appendix 6)

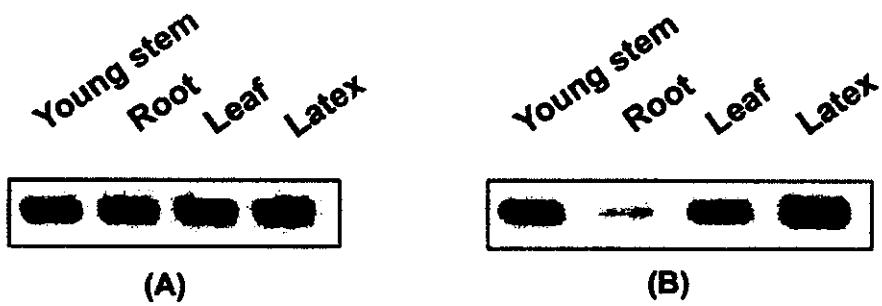


Fig.B.18 Analysis of mRNA expression patterns by RT-PCR. (A) Control (18S rRNA); (B) mRNA expression of HbSDS (35 cycles). (Phatthiya et al, 2007. Appendix 6)

References:

Archer, B. L., Audley, B. G., 1987. New aspects of rubber biosynthesis. Bot. J Linnean Soc. 94, 181-196.

Cornish, K., Backhaus, R. A., 1990. Rubber transferase activity in rubber particles of guayule. Phytochemistry 29, 3809- 3813.

Hirooka, K., Bamba, T., Fukusaki, E., Kobayashi,A. Cloning and kinetic characterization of *Arabidopsis thaliana* solanesyl diphosphate synthase, Biochem. J. 370 (2003) 679-686.

Madhavan, S., Greenblatt, G. A., Foster, M. A., Benedict, C. R., 1989. Stimulation of isopentenyl pyrophosphate incorporation into polyisoprene in extracts from guayule plants (*Parthenium argentatum*) by low temperature and 2-(3,4-dichlorophenoxy) triethanoamine. Plant Physiol. 89, 506-511.

Moir, G. F. J., 1959 Ultracentrifugation and staining of *Hevea* latex. Nature 184,1626-1628.

Rattanapittayaporn, A., Wititsuwannakul, D. and Wititsuwannakul, R. (2004) Significant role of bacterial undecaprenyl diphosphate (C_{55}-UPP) for rubber biosymthesis by *Hevea* latex enzyme Macromol. Biosci.4, 1039-1052.

Phatthiya, A., Takahashi, S., Chareonthiphakorn, N., Koyama, T., Wititsuwannakul, D., Wititsuwannakul, R., 2007. Cloning and expression of the gene encoding solanesyl diphosphate synthase from *Hevea brasiliensis*. Plant Sci. 172, 824- 831.

Southorn, W. A., 1961. Microscope studies on fresh *Hevea* latex. Rubber Development 14, 2-6.

Tanaka, Y., Eng, A. H., Ohya, N., Nishiyama, N., Tangpakdee, J., Kawahara, S., Wititsuwannakul, R., 1996. Initiation of rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis*: characterization of initiating species by structural analysis. Phytochemistry 41, 1501-1505.

Tangpakdee, J., Tanaka, Y., Ogura, K., Koyama, T., Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., 1997a. Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea* latex. Phytochemistry 45, 269-274.

Wititsuwannakul, D., Wititsuwannakul, R. 2001. Biochemistry of natural rubber and structure of latex. In: Steinbuchel, A. (ed.), Biopolymers Vol. 2, p p. 151-202. Germany: WILEY-VCH.

Wititsuwannakul, D., Rattapittayaporn, A., Wititsuwannakul, R., 2003. Rubber biosynthesis by a *Hevea latex* bottom-fraction membrane. J. Appl. Polym. Sci. 87, 90-96.

Wititsuwannakul,D., Rattanapittayaporn A., Koyama, T. and Wititsuwannakul, R. (2004) Involvement of *Hevea* latex organnelle membrane proteins in rubber biosynthesis activity and regulatory function. Macromol. Biosci. 4, 314-323.

Yoonram, K., Takahashi, S., Rattanapittayaporn, A., Koyama, T., Wititsuwannakul, D., Wititsuwaanakul, R. (2008) cDNA, from *Hevea brasiliensis*, encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase. Plant Science (being revised for resubmission)