

โครงการย่อ B

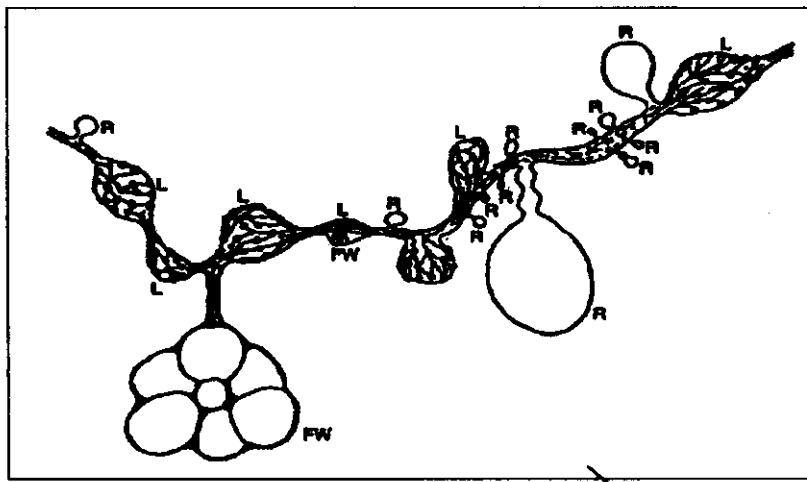
การศึกษาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยาง

ถึงแม้ว่าได้มีการศึกษาเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ยางธรรมชาติ มาเป็นระยะเวลากว่า 50 ปีแล้ว ตั้งแต่ปี กศ. 1950 แต่ความรู้ที่ได้ ก็ยังห่างไกลจากความสมบูรณ์อยู่มาก ปัจจุบันยังไม่เป็นที่รู้悉ด ว่ามี โปรตีนใดบ้าง ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำชีวสังเคราะห์ยาง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไปปรับเปลี่ยน ดังกล่าวมักเป็น hydrophobic protein หรือ อยู่กับเมมเบรน ซึ่งยากแก่การทําบาริสุทธิ์ ด้วยวิธี มาตรฐานทางชีวเคมีทั่วไป นักวิทยาศาสตร์ปัจจุบันจึงพยายามแก้ปัญหาดังกล่าว โดยอาศัย เทคนิคทาง proteomics และ genomics เข้าช่วย อย่างไรก็ตาม การที่จะใช้ประโยชน์สูงสุดจาก ผลงานวิจัยที่ได้ จำเป็นต้องอาศัยหลักความรู้พื้นฐานทางค้านกระบวนการชีวสังเคราะห์ยาง ธรรมชาติเป็นเกณฑ์

พอลิเมอร์ยางธรรมชาติประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น *cis*-isoprene เกือบทั้งหมด โดย ขั้นตอนเริ่มแรก(initiation) ของการทำชีวสังเคราะห์ยางจะมีการใช้ allylic diphosphate เป็น priming co-substrate และตามด้วยขั้นตอน elongation หรือ prenyl chain extension เพื่อการ สร้างเป็นพอลิเมอร์ยาง(Archer and Audley, 1987; Madhavan et al., 1989; Cornish and Backhaus, 1990). การสังเคราะห์ allylic prenyl diphosphates จะต้องอาศัยเอนไซม์ *trans*-prenyl transferase ซึ่งได้พบเอนไซม์ดังกล่าวมีอยู่ทั้งในส่วนของอนุภาคกันหลอดและส่วนของ C-serum ที่ได้หลังการบีบแยกเนื้อยางสด (Tangpakdee et al., 1997; Wititsuwannakul and Wititsuwannakul, 2001) และได้พบว่ากิจกรรมการสังเคราะห์ยางจะสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย allylic diphosphates ที่มีความยาวจาก C_5 - C_{20} โดยยิ่งสั้นยิ่งการตุ้นได้น้อยลง เช่น $C_5 < C_{10} < C_{15} < C_{20}$ (Archer and Audley, 1987). ซึ่งต่อมากำการศึกษาโดยอาศัยเทคนิคทาง ^{13}C -NMR พนว่ากลุ่มน้ำยีย่อยไอโซพรินท์ทำหน้าที่เป็นจุดเริ่มต้น (initiating species) ในการต่อเดิมหน่วย ย่อย IPP แบบ *cis* addition ไปเรื่อยๆ จนเป็น rubber polymer (*cis*-1,4-polyisoprene) เป็น *trans*-allylic diphosphate จำพวก famesyl pyrophosphate (Tanaka et al., 1996). ปัจจุบัน ยังไม่เป็นที่ทราบว่าอนุภาคยางเป็นแหล่งที่สร้าง initiating species ด้วยหรือไม่ มีการควบคุม การสร้าง initiating species พร้อมทั้งความยาวของพอลิเมอร์ยาง อย่างไร

คณะผู้จัดได้พบว่าของอนุภาคกันหลอดดึงประสาจากจากอนุภาคยาง (Wititsuwannakul et al., 2003) และเมมเบรนของอนุภาคกันหลอด(Wititsuwannakul et al., 2004, Appendix 3) ที่สามารถเครี่ยมได้หลังการบีบแยกเนื้อยางสดด้วยเครื่อง ultracentrifuge ก็มีประสิทธิภาพในการ สร้างพอลิเมอร์ยางเช่นกัน จึงทำให้น่าคิดว่ารายงานการศึกษาชีวสังเคราะห์ยางบนอนุภาคยางที่มี มาในอดีตนั้น เป็นการศึกษานอนุภาคยางบริสุทธิ์จริงๆ หรือเป็นอนุภาคยางที่ปนเปื้อนด้วยเมมเบรนโปรตีนจากอนุภาคกันหลอดที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ยาง ที่หลุดออกไปเครื่องคายเมมเบรน นรังแท ซึ่งได้มีการสาธิตไว้เป็นภาพวาด (ดังรูปด้านล่าง)โดย Southorn (1961) โดยจะเห็นได้ว่า อนุภาคในเนื้อยางที่ประกอบไปด้วยอนุภาคยาง (rubber) อนุภาคสูญญากาศ (luteoid) และ

อนุภาค เฟรวีสลิง (Frey Wysling) นั้นในสภาพธรรมชาติในท่อน้ำยาง จะเชื่อมโยงกันเป็นเครือข่ายร่างแท (reticulum) แขวนอยู่ในส่วนของช่องเหลว (cytosol) ในน้ำยาง แรงเหวี่ยงของเครื่อง ultracentrifuge ทำให้น้ำยางสัดที่นำมาศึกษามีการสูญเสียความเสถียรของเครือข่าย เมมเบรนร่างแทดังกล่าว นอกจากนั้น Southorn (1961) ยังได้สังนิฐานไว้ว่าเครือข่ายร่างแท เหล่านี้จะเป็นแหล่งที่ทำหน้าที่สร้างพอลิเมอร์ยาง



รูป B.1 รูปสchematic ถึงความเป็นไปได้ของการเชื่อมโยงของอนุภาคต่างๆ ในท่อน้ำยาง โดย Southorn , 1961

เมื่อทำการแยกน้ำยางสัด โดยการปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 49,000g นาน 45 นาที อนุภาคต่างๆ ที่ประกอนเป็นเครือข่ายร่างแทจะถูกแรงเหวี่ยงแยกออกจากกัน โดยอนุภาคยางจะถูกขับน้ำออกโดยบริเวณใต้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟรวีสลิงเกาะคิดอยู่ด้วยเล็กน้อย ส่วนใหญ่ของอนุภาคถูกหยอดและเฟรวีสลิงจะถูกเหวี่ยงไปอยู่บริเวณก้นหลอด ดังนั้นการคั่นพับถึงประสิทธิภาพของอนุภาคกันหลอด才 ว่าเกี่ยวข้องกับการทำชิ้นสังเคราะห์ยางโดยคณะผู้วิจัย [Wititsuwannakul et al., 2003, Wititsuwannakul et al, 2004 (Appendix 3); Rattanapittayaporn et al. 2004 (Appendix 4)] จึงเป็นการเสริมข้อสังนิฐานของ Southorn (1961)

การศึกษาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับชิ้นสังเคราะห์ยางในรายงานนี้ จึงเป็นการศึกษาต่อเนื่องจากที่เคยทำไว้ โดยจะทำการวิเคราะห์ขนาดของพอลิเมอร์ยางที่สร้างโดยอนุภาคต่างๆ ของร่างแท เมมเบรน พร้อมทั้ง จะศึกษาหาคุณสมบัติของอนุภาค เฟรวีสลิงซึ่งเป็นสมาชิกของเครือค่ายร่างแทเพิ่มเติม เพราะในอดีตแคนไม่มีข้อมูลการศึกษา ก่อน

B.1) ทำการวิเคราะห์ดูความแตกต่างของขนาดของพอลิเมอร์ยางที่สังเคราะห์โดยเมมเบรนโปรดีนของอนุภาคต่างๆ ในเครือข่ายร่างกาย

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมและล้างอนุภาคกันหลอด

นำน้ำยางสดที่กรีดจากดันยางพันธุ์ RRIM600 โดยรองรับด้วยภาชนะที่แข็งไว้น้ำแข็งไปปั่นแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 49,000g เป็นเวลา 40 นาที น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นบนสุดเป็นชั้นของอนุภาคยาง ชั้นกลางเป็นของเหลวไซต์ cytosol (C-serum) และชั้นล่างสุด เป็นส่วนของอนุภาคกันหลอด (bottom fraction, BF) แยกเอาส่วนของ BF ไปล้างด้วยสารละลายบัปเพอร์ [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] ที่ผสมด้วย 0.9% NaCl (w/v) จำนวน 3 ครั้ง และแยกส่วนของ BF ที่ผ่านการล้างสะอะดแล้ว (washed bottom particles, WBP) ด้วยการปั่นแยกที่ 4500g เป็นเวลา 30 นาที เก็บไว้ในภาชนะที่แข็งในน้ำแข็ง

b) การเตรียมเมมเบรนจากอนุภาคกันหลอด

นำ WBP หรืออนุภาคกันหลอดที่ผ่านการล้างแล้วไปทำให้แห้งโดยไม่ผสมลงในน้ำ กลั่นปริมาตร 3 เท่าแล้วกวนโดยการใช้เครื่องกวน แยกส่วนของเมมเบรนออกโดยการปั่นแยกที่ แรงเหวี่ยง 4500g นาน 60 นาที และทำการล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายบัปเพอร์ [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] ที่ผสมด้วย 0.9% NaCl (w/v)] เก็บส่วนของเมมเบรนที่ผ่านการล้าง (washed bottom membrane, WBM) เก็บไว้ในภาชนะที่แข็งในน้ำแข็ง

c) การเตรียมและล้างอนุภาคยาง

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

d) การวิเคราะห์ปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง

Assay mixture ของปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยางประกอบด้วยสีปีเพราท IDP , allylic diphosphate initiator ^{14}C -IDP, ^3H -FPP หรือ ^{14}C -UPP , เมมเบรนโปรดีนจาก WRP หรือ WBM โดยผสมอยู่ใน บัปเพอร์ (50 mM Tris-HCl, pH7.7) ตามรายละเอียดที่มีกำหนดไว้ครึ่ง หรือคราว พร้อมด้วย reagents เริ่มปฏิกิริยา (30 mM KF, 5 mM MgCl₂ และ 10 mM DTT) และ มีการเติม 20 mM EDTA ลงในปฏิกิริยาควบคุม โดยจะใช้การบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยการซ่อนไว้ในน้ำแข็ง ก่อนนำไปสกัด radiolabeled rubber

e) การวิเคราะห์ radiolabeled rubber ที่ได้จากปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง

ทำการตอกตะกอน radiolabeled rubber (^3H -rubber หรือ ^{14}C -rubber) ที่ได้จากปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ยาง โดยการเติมเอทเทนอลลงไปใน assay mixture และปั่นแยกตะกอนที่ 12000g นาน 45 นาที น้ำตะกอนที่ได้ไปละลายในสารละลาย hexane:toluene (1:1) และปั่นแยก

เอกสารที่ละเอียด ไประเหยเพื่อสกัดปริมาตรลงแล้วตากตะกอน radiolabeled rubber บริสุทธิ์ ด้วยอะซิโคนหรือเอทเทนอล นำตะกอนที่ได้ไปละเอียดใน toluene ปริมาตร 150 μl ทำบริสุทธิ์ radiolabeled rubber ด้วยการตากผึ้ง ด้วยอะซิโคนแข็งปริมาตร 750 μl จำนวน 3 ครั้ง นำตะกอนที่ได้ไปละเอียดใน toluene ซึ่งบรรจุอยู่ในขวด scintillation แล้วนำไปใส่ในเครื่อง scintillation counter เพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำหนาบริมาณสารรังสีของ radiolabeled rubber ที่ได้ต่อไป

ก) 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 ในบีปีเพอร์ (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.7) ปริมาตร 200 μl ที่ประกอบด้วย 40 mM DOC, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT และ 1 mM IPP ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแซนน์ดึ๊ก และทำการแยก ^{14}C -rubber ด้วยรายละเอียดที่กล่าวในข้างต้น

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

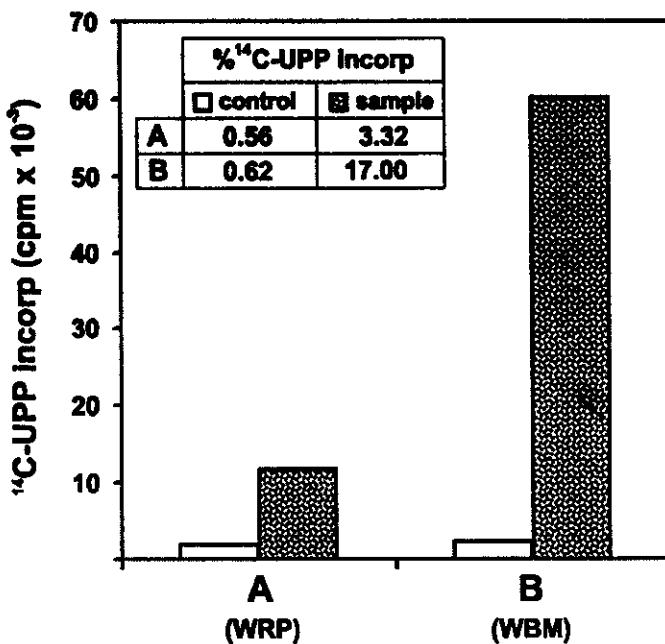
นำสารละลายใส tetrahydrofuran (THF) ที่มี ^{14}C -rubber บริสุทธิ์ละลายอยู่ไปทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี gel permeation chromatography (GPC) โดยใช้ชาร์ชของ colum TSK gel (Tosho) ที่ต่อเนื่องกัน 4 colum มีค่า exclusion limit ดังนี้ 1.01×10^6 , 1.72×10^5 , 1.13×10^4 และ 1.30×10^3 การทำ GPC ใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นคัวร์ส ที่อัตราการไหล 0.5 ml./ นาที ทำการวัดค่าดูดกลืนแสง (λ 210 nm) และ ปริมาณรังสีของ polyisoprene ใน fraction ต่างๆ ที่ถูกชะออกมากทุกๆนาที พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers.

ผลการทดลองและวิชาการผล

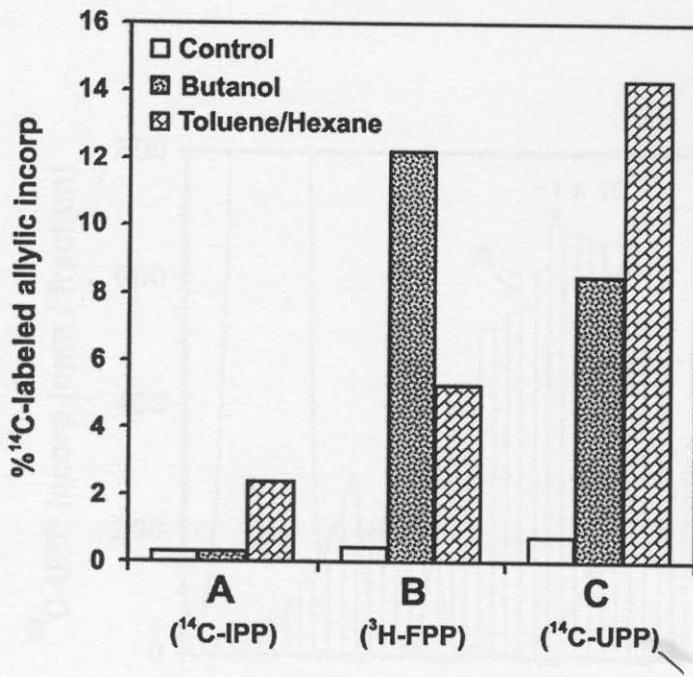
จากผลในรูปที่ B.2 จะเห็นว่าเมื่อใช้ ^{14}C -UPP เป็น allylic diphosphate initiator เมมเบรนโปรดีชนของอนุภาคถูกอยู่และเฟริวส์ริง หรือ อนุภาคมั่น濩ลอด (WBM) มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ยางได้มากกว่าอนุภาคยางขนาดเล็กถึง 5 เท่า โดยประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ยางของ WBM ที่ได้จากการใช้ ^{14}C -UPP เป็น allylic diphosphate initiator จะสูงกว่าที่ได้จากการใช้ ^{14}C -IPP และ ^{3}H -FPP ประมาณ 6 และ 2.5 เท่าตามลำดับ (รูปที่ B.3) โดยน้ำหนักไม่เลกุลของยางที่สร้างจาก ^{14}C -UPP โดย WBM ที่วิเคราะห์ได้จาก GPC อยู่ในช่วง $1 - 4 \times 10^5$ และมี MWD เป็นแบบ skewed unimodal (รูปที่ B.4-5) โดยน้ำหนักไม่เลกุลของพอลิเมอร์ยางตั้งกล่าวจะเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าหรือเพิ่มขึ้นเป็น 9×10^5 เมื่อนำไป incubate กับ WRP ที่มีการเติม 60 μM IPP โดยมี MWD แบบ unimodal (รูปที่ B.6)

ผลของการศึกษาน้ำหนักไม่เลกุลยาง ที่สร้างโดยเมมเบรนเมนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ของยางธรรมชาติ ทำให้ได้ความรู้พื้นฐานใหม่ที่สนับสนุนข้อสันนิฐานของนักวิทยาศาสตร์ (Southorn, 1961) บุคคลนึง ว่าไม่เลกุลยางน่าจะถูกสร้างขึ้นในร่างแห่งเมม-

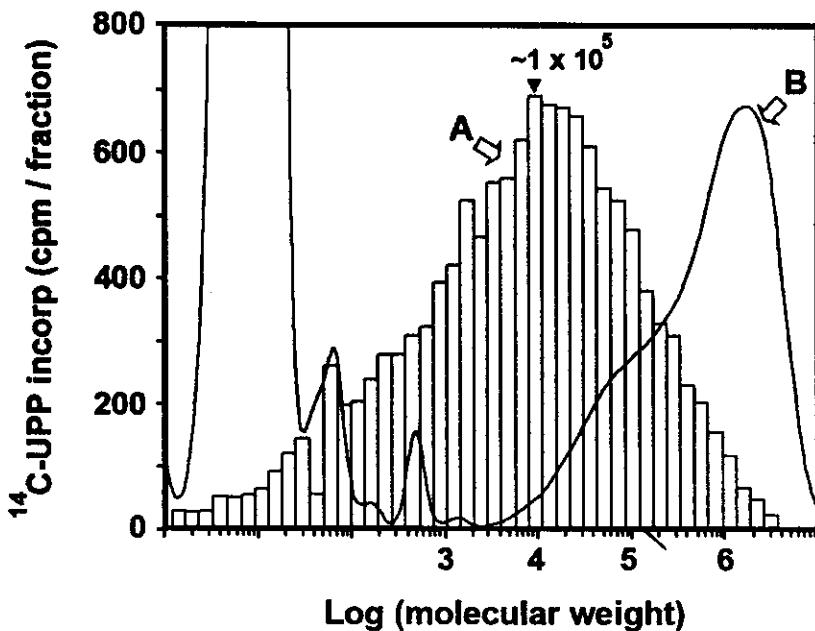
เบรนที่เริ่มอนุภาคยาง อนุภาคสูโทโยต์ และ อนุภาค เฟรวีสลิง เข้าด้วยกัน โดยสำดับขั้นตอน การสร้างระดับ early elongation จะเริ่มจากอนุภาคกันหลอดซึ่งประกอบด้วยอนุภาคเฟรวีสลิงและอนุภาคสูโทโยต์ ทำการสร้างได้พอลิเมอร์ยางที่มีขนาดเล็ก ($1 - 4 \times 10^5$) และมี MWD เป็นแบบ skewed unimodal หลังจากนั้นการสร้างระดับ late elongation ให้ได้พอลิเมอร์ยางที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (9×10^5) จะเกิดขึ้นท่อนุภาคยางขนาดเล็ก ตามสำดับ ห้องน้ำจะอาศัยเอนไซม์ rubber transferase ชนิดต่างๆที่เกาะอยู่กับเเมะเบรนของอนุภาคตั้งกล้าว



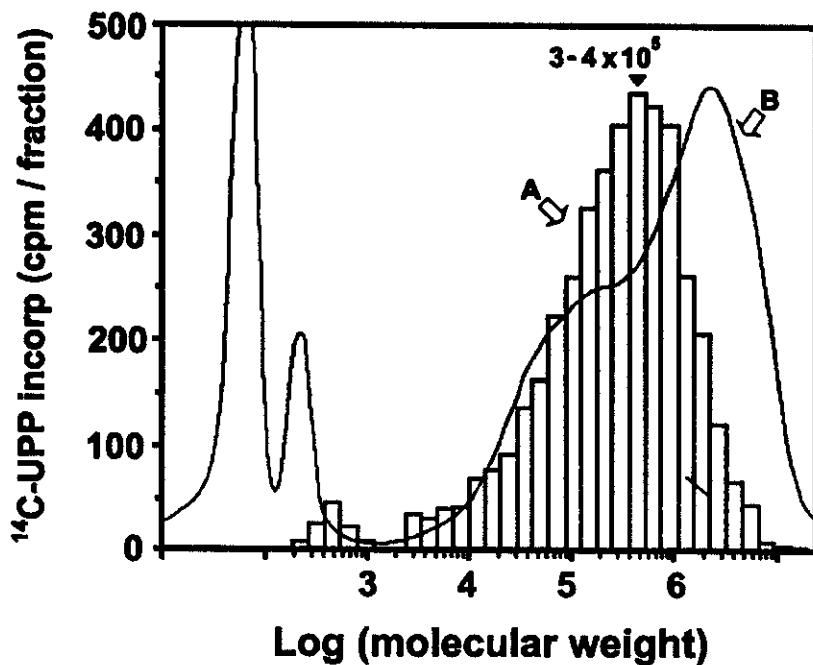
รูปที่ B.2 ชิวสังเคราะห์ยางโดย WRP (A) และ WBM (B) ซึ่งปริมาณที่ใช้เทียบเท่าน้ำหนักแห้งประมาณ 20 mg และมี ¹⁴C-UPP (354,000 cpm) เป็น allylic initiator โดยในปฏิกิริยาความคุณจะใส่ 20 mM EDTA ระดับกิจกรรมแสดงในรูปของ % ¹⁴C-UPP ที่ถูก incorporate เข้าไปในโมเลกุลยางที่ได้จากการสกัด toluene/hexane (1:1, v/v).



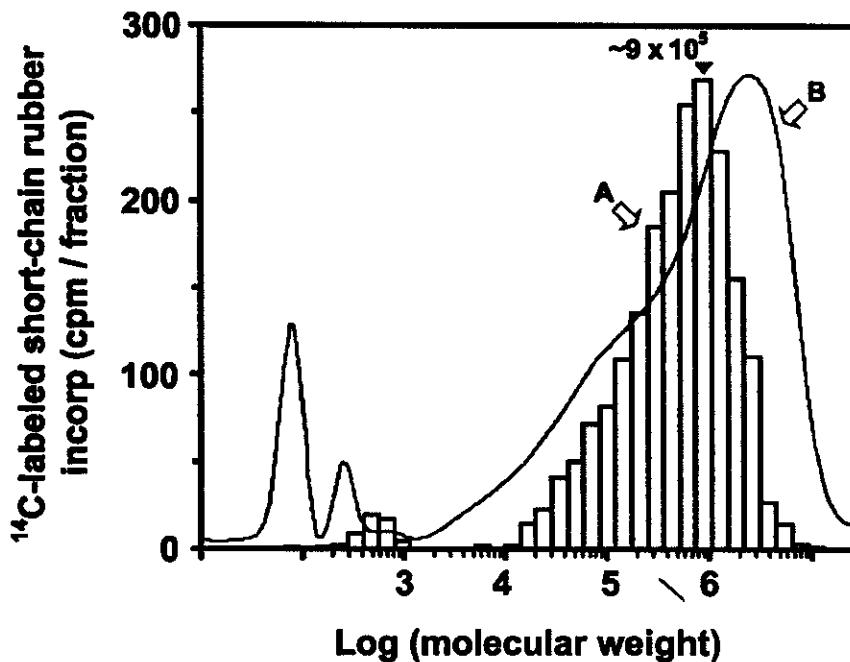
รูปที่ B.3 อิทธิพลของ allylic isoprene ที่มีต่อชีวสังเคราะห์ยางโดย WBM ปฏิกิริยา
ปริมาณ 200 ml ประกอบด้วย WBM (ปริมาณน้ำหนักแห้ง 20 mg), 60 μ M IPP , radiolabeled
allylic initiators [12.5 μ M ³H-FPP ,7 ci/mol (B) or 100,900 cpm ¹⁴C-UPP (C)] สำหรับ
ปฏิกิริยา (A) ไม่มี allylic initiator แต่มี 15 μ M ¹⁴C-IPP (15 ci/mol) โดยในปฏิกิริยาควบคุมจะใส่
20 mM EDTA ระดับกิจกรรมแสดงในรูปของ % ¹⁴C-UPP ที่ถูก incorporate เข้าไปในโมเลกุล
ยางที่ได้จากการสกัด toluene/hexane (1:1, v/v)



รูปที่ B.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของยางที่สร้างโดยส่วนของ WBM ที่ดักดักก่อนตัวย acetone ช่วง 0-20% โดยมี UPP เป็น allylic initiator ด้วย GPC ทำแยก radiolabeled rubber ออกจาก origin spot หลังการนำไปแยกตัวย ด้วย TLC และนำไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชี้ที่อัตราการไหล 0.5 mL./นาที ทำการวัดค่า ปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสง ที่ $\lambda 210\text{ nm}$ (B) ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชะออกมากทุกๆ นาที 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 TLC และนำไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นดีซิล ที่อัตราการไหล 0.5 mL./นาที ทำการวัดค่า ปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสง ที่ $\lambda 210\text{ nm}$ (B) ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชะออกมาทุกๆนาที พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers

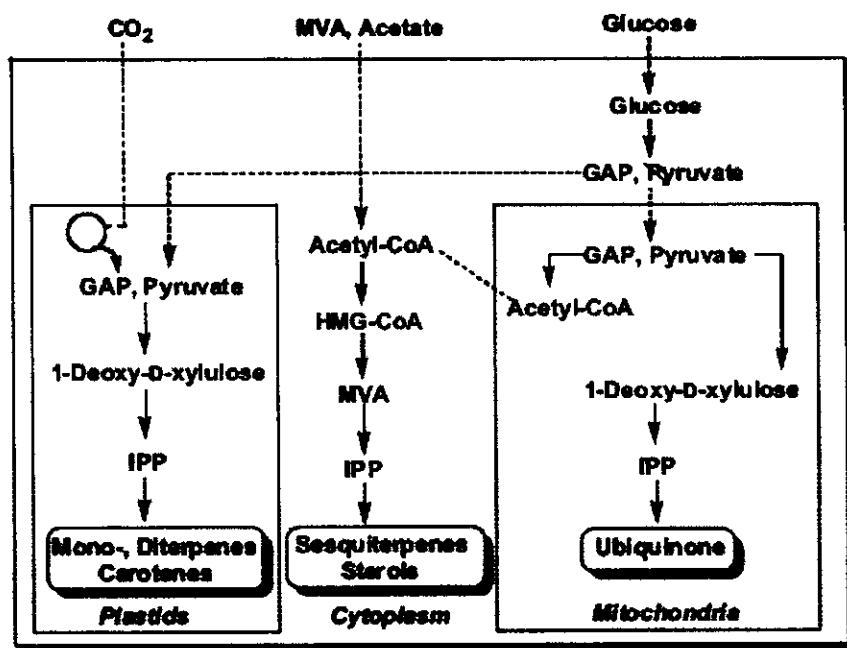


รูปที่ B.6 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ยางที่เพิ่มขึ้น เมื่อนำพอลิเมอร์ยางที่สร้างโดย WBM (รูปที่ B.5) ไป incubate กับ WRP ที่มีการเติม 60 μ M IPP โดยนำ radiolabeled rubber ที่แยกได้จาก origin spot หลังการทำ TLC ไปวิเคราะห์ด้วย GPC โดยใช้อุณหภูมิ 35°C และ THF เป็นตัวชีวะ ที่อัตราการไหล 0.5 ml./นาที ทำการวัดค่าปริมาณรังสี (A) และค่าการดูดกลืนแสงที่ λ 210 nm (B) ของ polyisoprene ในอยู่ในแต่ละ fraction ที่ถูกชี้ออกมากทุกๆ หน้าที่พร้อมทั้งหาค่า molecular mass โดยเปรียบเทียบกับ polystyrene MW markers

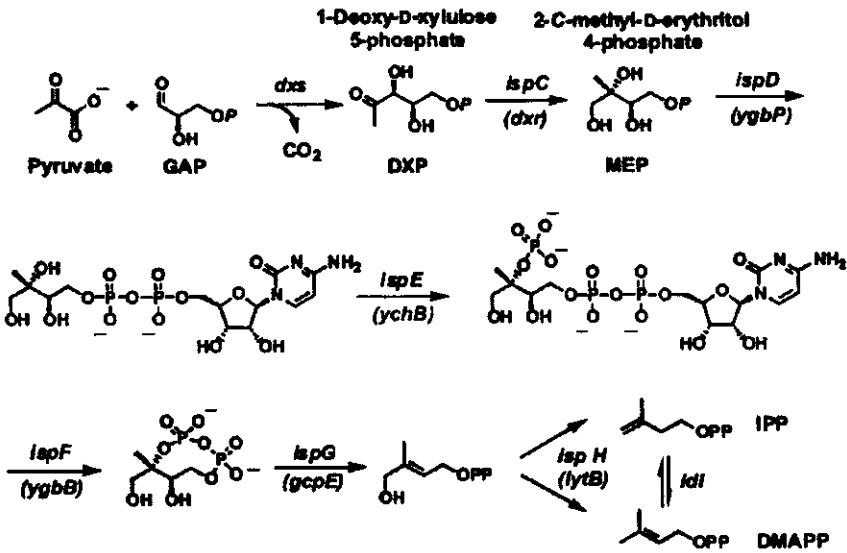
B.2) การศึกษาคุณสมบัติของอนุภาค เฟร์วิสลิ่งที่อยู่ในเครือค่ายร่างแท

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

อนุภาคอนุภาคเฟร์วิสลิ่ง นี้แตกต่างจากอนุภาคถูกอยค์ และอนุภาคบางในเครือร่างแท (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 เป็นส่วนตั้งต้นและมี 1-Deoxy-D-xylulose reductase (DXR) เป็น rate-limiting enzyme (รูปที่ C.7)



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



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 หากอนุภาคเฟริวสิ่ง สามารถสร้าง IPP ได้จาก glucose ก็อาจมีความเป็นไปได้ว่าดันยางสามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่มีอยู่ในเครือข่ายร่างแทให้ไปเป็นยางโดยตรง

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมอนุภาคเฟริวสิ่ง

นำน้ำยางสกัดมาบีนแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 1700g อุณหภูมิ 10°C นาน 30 นาที ใน swing-out bucket rotor เพื่อลดการชนกระแทกระหว่างอนุภาคต่างๆ ของน้ำยางในขณะที่ถูกเหวี่ยง ทำการกำจัดส่วนคริบบันชึ้งส่วนใหญ่เป็นอนุภาคยางออกไป และนำส่วนคริบบันลงที่เหลือไปบีนแยกที่ 7000g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที โดยใช้ fixed angle rotor น้ำยางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นยางจะอยู่บนสุด โดยได้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟริวสิ่งสีเหลืองอมส้มแขวนลอยอยู่ ทำการรวมรวมอนุภาคแขวนลอยดังกล่าว และนำไปบีนแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 59,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที ทำการล้างตะกรอนอนุภาคเฟริวสิ่ง 3 ครั้งด้วยน้ำเพอร์

b) การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ¹⁴C-pronyl ที่สร้างจาก ¹⁴C-glucose โดยอนุภาคเฟริวสิ่ง

นำอนุภาคเฟริวสิ่งที่เตรียมได้ไปทำให้แตกโดยวิธี sonication และนำไปสกัดเอาส่วนใสโดยการบีนแยกด้วยแรงเหวี่ยง 10,000g ที่ 4°C นาน 10 นาที นำส่วนใสปริมาณ 100 μl ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 280 μg ไปใส่ใน reaction mixture ปริมาตร 500 μl ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 30 mM KF, 0.15 NADPH, 74 μM mevinolin

คุณสมบัติทางชีววิทยา

(ในกรณีที่ต้องใช้) และ 1 mM [¹⁴C]glucose (5 Ci/mol) ทำการบ่มปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการแยกผลิตภัณฑ์ prenyl diphosphate ด้วย 1-butanol และทำการสลายหมู่ฟอสเฟตด้วยออกไซด์โซเดียมโซดา potato acid phosphatase ยกตัวอย่างเช่น prenols ที่ได้ด้วย pentane แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC บนแผ่น reverse LKC-18 plate และใช้ acetone/water (19:1, v/v) เป็นตัวช่วย ทำการเบรย์นเทียนขนาดกับ prenols มาตรฐานที่สามารถมองเห็นได้โดยอาศัยไอระ夷ไฮโดรเจนพร้อมกับเคราะห์ที่หายไป radioactive ในผลิตภัณฑ์ prenols ด้วย เครื่อง Bioimage analyzer

c) การโคลนинг cDNA ของ 1-deoxy-D-xylulose reductase (DXR)

ทำโดยใช้ PCR product ที่มีความจำเพาะซึ่งได้ออกแบบมาจากสำคัญเป้าหมายของ เอนไซม์ solanesyl diphosphate synthase ในฐานข้อมูล นาใช้เป็นตัวติดตามในการตรวจหา ยินดังกล่าวจากห้องสมุดซึ่ดอิเน็ตเครื่องจากน้ำยางพารา จากนั้นชันส่วนของยินดังกล่าวให้ถูก นำมาออกแบบ primer เพื่อใช้ในการหาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ ดัง รายละเอียดใน (Yoonrum et al, 2008, Appendix 4)

d) การวิเคราะห์การแสดงออก mRNA ของ DXR

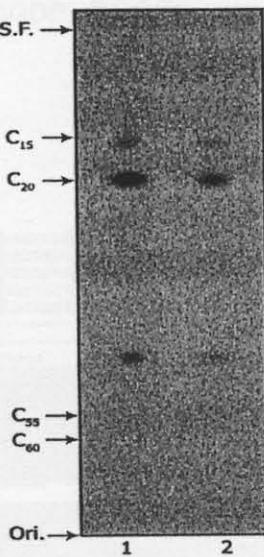
ทำการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR โดยการ amplify total RNA (1กรัม) ที่แยกได้ จากเนื้อยื่อย่างๆด้วย primer .ที่ออกแบบจำเพาะกับ DXR

e) การหาตัวแหน่งที่อยู่ของ DXR ภายในเซลล์

การหาตัวแหน่งที่อยู่ของ DXR ภายในเซลล์ ทำโดยอาศัยเทคนิคทาง Gateway cloning system ดังรายละเอียดใน Yoonrum et al, 2008 (Appendix 5)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการนำ [¹⁴C] glucose ไป incubate กับอนุภาคเฟรวิสลิง ในสภาพที่มีด้วยบัยบยัง HMG-CoA reductase (mevinolin) พบร่องอนุภาคเฟรวิสลิงสามารถสร้างสาร [¹⁴C] prenyl ได้ทั้งชั้นรวมทั้ง FDP และ GGDP จาก [¹⁴C] glucose แต่ปริมาณที่ได้จะเห็นว่าต่ำกว่าที่ได้ใน สภาพที่ไม่มีการใส่ด้วยบัยบยัง mevinolin (รูปที่ B.9) และเนื่องจากมีการรายงานว่า FDP เป็น allylic diphosphate ที่ถูกใช้เป็น initiation species ในการเริ่มกระบวนการชีวสังเคราะห์ยาง ดังนั้นอนุภาคเฟรวิสลิงอาจจะทำหน้าที่สร้าง initiating primer ให้กับพอลิเมอร์ยางได้ แต่ เนื่องจากยังไม่มีรายงานใดๆได้ทำการยืนยันว่าอนุภาคเฟรวิสลิงเป็นอนุภาคประเภท plastid จริงๆ ดังนั้นจะวิจัยซึ่งได้ทำการโคลน cDNA ของเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose reductase (DXR) ซึ่งเป็น rate-limiting enzyme ในการสังเคราะห์ isoprene โดยวิถี MEP ใน plastid จาก การใช้ cDNA library ที่เครื่องมือได้จากน้ำยาง เพื่อเป็นการยืนยัน



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

ผลการโคลนยืน DXR จากยางพารา (HbDXR) โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมได้จากน้ำยาง พนว่า ยืน HbDXR ประกอบไปด้วยหนึ่ง putative ORF (open reading frame) ที่มี % การเรียงลำดับเบสคล้ายคลึงกับ DXR ในพืชอื่นๆ คือ *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 นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการ expression ของยืน HbDXR มีมากที่สุดในเนื้อเยื่อส่วนที่มาจากช่องอกและลำต้นอ่อนของต้นกล้วยยาง มีระดับปานกลางในน้ำยาง และแทนไม่มีเลยในใบยาง แก่ (รูปที่ B.11) ดังนั้นยืน HbDXR ที่โคลนได้น่าเป็นชนิดที่มีความจำเพาะต่อท่อน้ำยาง จากการตรวจดูยืน HbDXR ด้วย ChloroP algorithm พบว่า HbDXR มีกรดอะมิโน 80 ตัวด้าน N-terminal ที่น่าจะเป็นส่วนที่ทำหน้าที่เป็น transit peptide เพื่อนำ DXR เข้าไปใน plastid ซึ่งสามารถยืนยันจากการทดลองโดยการ fuse ยืน HbDXR ด้วย GFP fluorescent ตรงบริเวณ C-terminal แล้วนำไปใส่ในเซลล์ *Arabidopsis* ปรากฏว่าสามารถพนยืน HbDXR ในบริเวณที่เป็น chromoplastid (chloroplast) (รูปที่ B.12) ดังนั้น อนุภาคเฟริวส์ริงจึงเป็นอนุภาคพลาสติดที่จำเพาะสำหรับท่อน้ำยาง และน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างหน่วยย่อยไฮโอโซฟรีน ที่ใช้ในการสร้าง

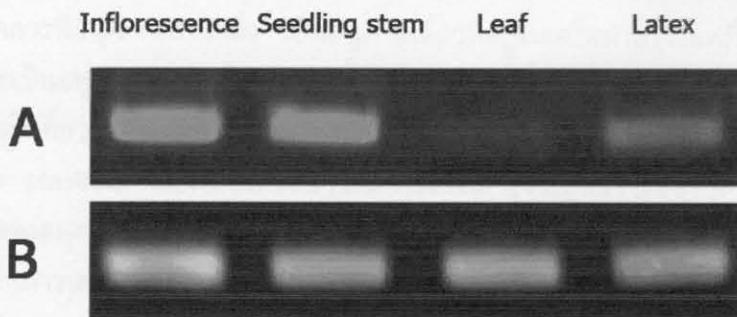
หมู่พรินิลเช่น FDP และ GGDP ซึ่งใช้เป็น primer สำหรับการสร้างโมเลกุลยัง ในขั้นตอน initiation step

A. thaliana	1:-MOTNSL--BAEKAISPLTSRFF--NPIPFLSGGGFSLLRRPNQGRFGFKGVKCSVKV--QQQQPFPAFWPGH-VPEAPRQS-NDG	79
L. esculentum	1:-PAALNLGS-BAEIKSISPLANSKSSXNLSHL-TTGLLSIRRKECSGAFAKRVQCSA---QLPFFPAFWPGH-VPEAPRQS-NDG	77
O. sativa	1:-AAKVVPSGDLAANVS-SNSRGQ-AFNQWVUDLFFQTRDRAVSL--RRTCESM--QQAPFFPAFWPGH-VVEPGRQS-NDG	75
S. rebaudiana	1:-SASYLE-TPTQNTLT-SCTKSQ--THLL-LQQGFCFCKRKDVKLAG-KGIRCSA---QPFPPFAFWPGH-ALVDEGTKN-NDG	74
H. brasiliensis	1:-AAALNLIS-BAEIKAISPLSTKS---SHLTLPQGGFSLKRKDGFAGFKKVQCSA---QPFFPAFWPGH-APPDLGRKT-NDG	73
S. leopoliensis	1:-	1
E. coli	1:-	1

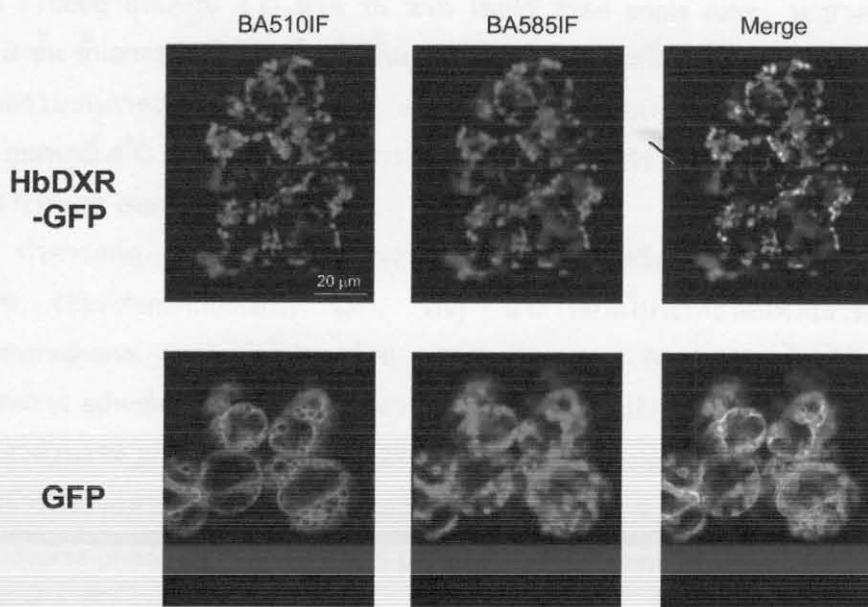
A. thaliana	80:EKPIISIVGSTGSIGQTLDIVAENPDKFVRVALAAGSNVTLLADSVRREKALALADYKLEIIPGEQGVMEW	167
L. esculentum	78:EKPIISIVGSTGSIGQTLDIVAENPDKFVRVALAAGSNVTLLADSVRREKALALADYKLEIIPGEQGVMEW	165
O. sativa	76:PKPIISIVGSTGSIGQTLDIVAENPDKFVRVALAAGSNVTLLADSVRREKALALCDWKKPELIPGEQGVMEW	163
S. rebaudiana	75:EKPIISIVGSTGSIGQTLDIVAENPDKFVRVALAAGSNVTLLADSVRREKALADADYKLEIIPGEQGVMEW	162
H. brasiliensis	74:EKPIISIVGSTGSIGQTLDIVAENPDKFVRVALAAGSNVTLLADSVRREKALADADYKLEIIPGEQGVMEW	161
S. leopoliensis	1:MPAVLLIVGSTGSIGQTLDIVAENPDKFVRVALAAGSNVTLLADSVRREKALADADYKLEIIPGEQGVMEW	88
E. coli	1:MQQLTIDGSTGSIGCSPLDWRKPFZFRVALVACKNTRKVEECLPESPRYAVMDDEASAKL-EKMLQQQGSRTEVLSQGACDM	89
A. thaliana	168:ARHEPAVTVTGIWGCAGLRPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGE-FVLPFLANKRNWKILFADSEHSAIFQCIQGLPE--GA--	246
L. esculentum	166:ARHEPAVTVTGIWGCAGLRPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGE-FVLPFLANKRNWKILFADSEHSAIFQCIQGLPE--GA--	244
O. sativa	164:ARHEPAVTVTGIWGCAGLRPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGE-FVLPFLANKRNWKILFADSEHSAIFQCIQGLPE--GA--	243
S. rebaudiana	163:ARHPEDAVTVTGIWGCAGLRPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGE-FVLPFLANKRNWKILFADSEHSAIFQCIQGLPE--GA--	241
H. brasiliensis	162:ARHEPAVTVTGIWGCAGLRPTVAAIEAGKDIALANKETLIAGGE-FVLPFLANKRNWKILFADSEHSAIFQCIQGLPE--GA--	240
S. leopoliensis	89:APYKCAIWWVIGVIGCAGLDPFIAIEAGKDIALANKETLIAGGE-VVLPFLQHNGKQHITFADSEHSAIFQCIQGLSTHADFRAFQVW	175
E. coli	89:MALEPDVQDNAAIWGAGLPTIAIFAGTHIDLANKESEVTCGRLFDMAVKQSKAQILFV-DSEHNAIFQSLQFQIQLHNLYADLQE	175
A. thaliana	247:--LPLRIILTAGSGGAFRDWPVPLKLIKVACALKHFNNGNNKNTVDSATLNKGLEVIAHYLFQAFDDIEVIVHPQSITHSLHETQ	332
L. esculentum	245:--LPLRIILTAGSGGAFRDWPVPLKLIKVACALKHFNNGNNKNTVDSATLNKGLEVIAHYLFQAFDDIEVIVHPQSITHSLHETQ	330
O. sativa	243:--LPLRIILTAGSGGAFRDWPVPLKLIKVACALKHFNNGNNKNTVDSATLNKGLEVIAHYLFQAFDDIEVIVHPQSITHSLHETQ	328
S. rebaudiana	242:--LPLRIILTAGSGGAFRDWPVPLKLIKVACALKHFNNGNNKNTVDSATLNKGLEVIAHYLFQAFDDIEVIVHPQSITHSLHETQ	327
H. brasiliensis	241:--LPLRIILTAGSGGAFRDWPVPLKLIKVACALKHFNNGNNKNTVDSATLNKGLEVIAHYLFQAFDDIEVIVHPQSITHSLHETQ	326
S. leopoliensis	176:AGLRPLIITAGSGGAFRDWPVPLKLIKVACALKHFNNGNNKNTVDSATLNKGLEVIAHYLFQAFDDIEVIVHPQSITHSLHETQ	263
E. coli	176:MGVVSHTLTSGGGFPTPLRDLATMPDCQCRHENNSMGRKNSWDSDAIMMKGLEVIEARNLWASASQMVLEIHPQSITHSLHETQ	263
A. thaliana	333:DSSVIAQLGPDMRLPILYMM-SWFDPDVFCESEIVNPFLDLCKLGSLTFH-PFCNVKPYMSDIAAYAAGRAGGMITGVLSAANEKAVELFED	420
L. esculentum	331:DSSVIAQLGPDMRLPILYMM-SWFDPDVFCESEIVNPFLDLCKLGSLTFH-PFCNVKPYMSDIAAYAAGRAGGMITGVLSAANEKAVELFED	418
O. sativa	329:DSSVIAQLGPDMRLPILYMM-SWFDPDVFCESEIVNPFLDLCKLGSLTFH-PFCNVKPYMSDIAAYAAGRAGGMITGVLSAANEKAVELFED	416
S. rebaudiana	328:DSSVIAQLGPDMRLPILYMM-SWFDPDVFCESEIVNPFLDLCKLGSLTFH-PFCNVKPYMSDIAAYAAGRAGGMITGVLSAANEKAVELFED	415
H. brasiliensis	327:DSSVIAQLGPDMRLPILYMM-SWFDPDVFCESEIVNPFLDLCKLGSLTFH-PFCNVKPYMSDIAAYAAGRAGGMITGVLSAANEKAVELFED	414
S. leopoliensis	264:DSSVIAQLGPDMRLPILYMM-SWFDPDVFCESEIVNPFLDLCKLGSLTFH-PFCNVKPYMSDIAAYAAGRAGGMITGVLSAANEKAVELFED	348
E. coli	264:DSSVIAQLGPDMRLPILYMM-SWFDPDVFCESEIVNPFLDLCKLGSLTFH-PFCNVKPYMSDIAAYAAGRAGGMITGVLSAANEKAVELFED	348
A. thaliana	421:EKICYLDFIRWEILTDOKHRENEIVTPSLEIINHYDLKWARDAAANVOLSGA-RFVHA 477	
L. esculentum	419:EKICYLDFIRWEILTDOKHRENEIVTPSLEIINHYDLKWARDAALEPSSL-SFADV 475	
O. sativa	417:EKICYLDFIRWEILTDOKHRENEIVTPSLEIINHYDLKWARDAAQLPFTGL-SEFVFV 473	
S. rebaudiana	416:EKICYLDFIRWEILTDOKHRENEIVTPSLEIINHYDLKWARDAAQLPFTGL-SFADV 473	
H. brasiliensis	415:EKICYLDFIRWEILTDOKHRENEIVTPSLEIINHYDLKWARDAAASLQPTSL-SEVIA 471	
S. leopoliensis	349:EKICYHSDPFLPLRERDRHOTEEQCSSEDDILAHYAMARQFVQCSYQLEEVV 402	
E. coli	349:CGCFPTAAALIN--MSVLEKMDMREPOCCV-DDLVLVNRHWRKVEVMRLS 398	

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)*

จากการที่อนุภาคเฟริวิสลิง เป็นอนุภาคเดียวที่อยู่ในเครือค่ายร่างแท้ที่มีเมมเบรน 2 ชั้น ห่อหุ้ม และเป็นอนุภาคที่มีสีเหลืองอมส้มซึ่งนำจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง carotenoids แต่ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับกิจกรรมของอนุภาคนี้ยังมีน้อยมาก คณะวิจัยจึงได้ทำการการวิเคราะห์ทางการจำพวก plastidial isoprenoid เช่น plastoquinone ซึ่งจะถูกสร้างจาก IPP ที่ได้มาจากการ pathway ของอนุภาคพลาสติด พร้อมทั้งทำการโคลนนิ่ง cDNA ของ เอนไซม์ SDS ที่เกี่ยวข้อง หันนี้เพื่อเป็นการเสริมข้อมูลดูแลสมบัติจำเพาะด้านการเป็นพลาสติดของอนุภาคเฟริวิสลิงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

a) การเตรียมอนุภาคเฟริวิสลิง

นำน้ำยาางสกมปันแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 1700g อุณหภูมิ 10°C นาน 30 นาที ใน swing-out bucket rotor เพื่อลดการชนกระแทกระหว่างอนุภาคต่างๆของน้ำยาางในขณะที่ถูกเหวี่ยง ทำการกรองส่วนครึ่งบนซึ่งส่วนใหญ่เป็นอนุภาคยางออกไป และนำส่วนครึ่งล่างที่เหลือไปปันแยกที่ 7000g อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที โดยใช้ fixed angle rotor น้ำยาางจะถูกแยกออกเป็น 3 ชั้น ชั้นบนจะอยู่บนสุด โดยได้ชั้นยางจะมีอนุภาคเฟริวิสลิงสีเหลืองอมส้มแขวนลอยอยู่ ทำการรวมรวมอนุภาคแขวนลอยดังกล่าว และนำไปปันแยกด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ 59,000g อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที ทำการล้างตะกอนอนุภาคเฟริวิสลิง 3 ครั้งด้วยน้ำป่าเพอร์

b) การแยก plastidial isoprenoid

ทำการสกัด prenyl lipid ออกจากตะกอนอนุภาคเฟริวิสลิง โดยการ reflux ด้วยสารละลาย chloroform/methanol (2:1, v/v) นำสารสกัดไประบายน้ำให้แห้งแล้วละลายด้วย chloroform/methanol (1:1) นำไปแยกด้วย TLC (Kieselgel 60 F254) โดยใช้สารละลาย hexane/diethyl ether/acetic (80:20:1, v/v/v) เป็นตัวชี้ นำไปแผ่น TLC ไปส่องใต้แสง UV และแยกเอาส่วนของ prenylquinone (R_f , 0.27-0.59) ไปสกัดด้วย chloroform/methanol (1:1) ให้แห้ง และนำไปละลายใน solvent A (methanol/propa-02-ol; 4:1,v/v) และทำการแยก ผ่าน kolomne reverse-phase C18 Symmetry 5 μm (3.9 mmx150 mm) ที่มีการปรับสภาพด้วยสารผสม solvent A กับ solvent B (methanol/propan-2-ol; 1:1,v/v) ในปริมาตรเท่ากัน ด้วยอัตราการไหล 1 mL/นาที โดยฉีดเข้าเครื่อง HPLC และทำการ冲洗ด้วย linear gradient จาก 50-100% ของ solvent B เป็นเวลา 10 นาที และตามด้วย solvent B อีก 10 นาที เครื่มสารละลายมาตรฐาน ubiquinone 10 ใน solvent เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ และทำการยืนยันสาร plastoquinone ที่เครื่มด้วยไฮดรอเจนไนเต้โดยวิธี Hirooka et al.(2003)

c) การโคลนนิ่ง cDNA ของ *solanesyl diphosphate synthase*

ทำการโดยใช้ PCR product ที่มีความจำเพาะซึ่งได้ออกแบบมาจากสำดับแบบไทต์ของ เอนไซม์ *solanesyl diphosphate synthase* ใน ฐานข้อมูล มาใช้เป็นตัวติดตามในการตรวจหา ยืนดังกล่าวจากห้องสมุดชีดีเอ็นเอที่เครื่มจากน้ำยาางพารา จากนั้นชันส่วนของยืนดังกล่าวได้ถูก

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

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

ทำโดยการนำแบปค์ที่เรีย *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a/HbSDS ซึ่งได้โคลนยืน SDS ที่มาจากการนำแบปค์ที่เรีย *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a/HbSDS มาขักนำให้ไปรีติน SPS แสดงออก แล้วทำการแยก SDS จากส่วน pellet fraction ของ cell homogenate หลังการบีบแยก

e) การวิเคราะห์กิจกรรมของ HbSDS

ส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ย่างในปริมาตรของสารทั้งหมด 0.1 ml มี 50 mM Tris/HCl buffer, (pH 7.5) , 5 mM MgCl₂, 20 mM β-mercaptoethanol , 50 μM farnesyl diphosphate, 50 μM [1-¹⁴C] IPP (2.15 GBq.mmol⁻¹), 0.5% Triton X-100 และ 200 μg ของ crude enzyme ทำการบีบที่อุณหภูมิ 30 °C นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

f) การวิเคราะห์ product ที่ได้จากการของ HbSDS

ทำการสกัด product prenyl diphosphate ที่ได้ที่ได้หลังการบีบด้วย butanol และใช้เอนไซม์ potato acid phosphatase ย่อยหมู่ฟอสฟे�ตออก จากนั้นนำไปแยกบนแผ่น TLC ชนิด reverse-phase LKC-18 โดยใช้ตัวทำละลาย acetone/water (19:1,v/v) และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Bio-image analyzer

g) การวิเคราะห์การแสดงออก mRNA ของ HbSDS

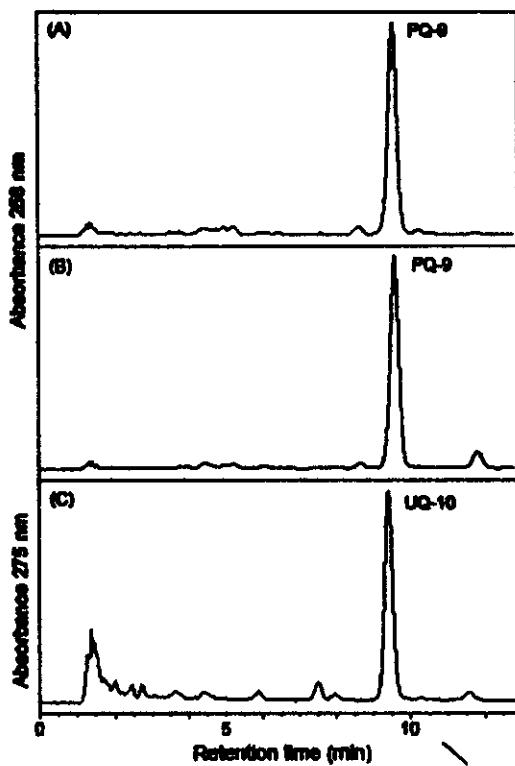
ทำการวิเคราะห์โดยใช้ RT-PCR โดยการ amplify total RNA (1กรัม) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต่างๆด้วย primer ที่ออกแบบมาเพาะกับ HbSDS

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลจากการนำเสนอ plastidal isoprenoid ที่สกัดจากอนุภาคเฟริสติงไปทำบริสุทธิ์โดยวิธี TLC และ วิเคราะห์ด้วย HPLC (รูปที่ B.13) โดยเปรียบเทียบกับ plastidal isoprenoid (PQ-9 และ UQ-10) ที่สกัดจาก chloroplast และ mitochondria ของใบ ปรากฏว่าเป็นสารสกัดจากเฟริสติงเป็นชนิด PQ-9

ผลการโคลนยืน SDS จากย่างพารา โดยใช้ cDNA library ที่เตรียมได้จากน้ำย่าง พนวจยืน 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 ทั้งนี้ เพราะโปรตีนดังกล่าวประกอบไปด้วยกรดอะมิโนชนิด 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 พนวจว่าประกอบไป

ด้วยส่วนของ plastid targeting sequence นอกจากนั้นยังสามารถยึนยันจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการกิจกรรมของเอนไซม์ HbSDS ในสารสกัดที่ได้จาก IPTG-induced *E.Coli* ว่ายืน SDS ที่คลุนได้สามารถสร้าง C₄₅ prenyl moiety (รูปที่ B.17) โดยเอนไซม์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อ allylic primers ตามลำดับดังนี้ GGDP>FDP>GDP นอกจากนั้นยังสามารถพบรากурсของ HbSDS mRNAs ได้สูงสุดในน้ำยาง ซึ่งสูงกว่าในใบและส่วนลำต้นของต้นอ่อน แต่ไม่พบการแสวงของในเนื้อเยื่อ根 (รูปที่ B.18) ตั้งนั้น PQ-9 ในอนุภาคเพรเวอร์ติงน่าจะทำหน้าที่เป็นปัจจัยหนึ่ง ในปฏิกิริยาต่อเนื่องของกระบวนการ desaturation ที่จำเป็นสำหรับการสร้าง carotenoid หรือ อาจทำหน้าที่เป็นสาร antioxidant คล้ายคลึงกับหน้าที่ของ ubiquinone ใน mitochondria หรือ อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินงานไรค์เหมือนกับที่ได้มีการรายงานไว้ในพืชอื่นๆ



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)

At SPS1	1 : M-M-TSCRNID LGTMNMA---CGCG--R-RQ--FPS LAKTVCKFT-SSNRSYGG-1-----VGSC-KAVPTKSKEISLNLNGIGQSQT	70	
At SPS2	1 : M-M-SCRNID LGTSVLDSH-CSSSSTS-RRFLFGNSKTVCHIG-G--RSCVGNLV-FLRRDLATC-RAVPAKSSENLSVNGI GGDQTV	81	
Hb SPS	1 : M-MSNTCYSLD FGRTVFD LAACGCSNSA-SIDRCSPVNYAR5VYR-TCNRDYAARRSPYCRRDSSAWC-RVS STKAPETLLN-GVSQDPAV	85	
An SPS	1 :	1	
Rc SPS	1 :	1	
Ec OPS	1 :	1	
Hb GGPs	1 : -----MSSV-NLG5WVHTSYVLNQATRS-RSKSKS-FSLPFNPLKSLAISFAYRKSE-RPISSVSAAITKEEETL	66	
At SPS1	71 : SFIDLQESKQPISLVTIPELVAVIQLTLNDN-ILSI-VGAENWLISAAEQIFG-AGGEMPRLGLVFDV-SRATAELAGLKELITEHRL	156	
At SPS2	82 : MLNLRQESKPISLETLPVVADOLQRNDN-ILSI-VGAENWLISAAEQIFG-AGGEMPRLGLVFDV-SRATAELAGLKELITEHRL	167	
Hb SPS	86 : N--LKE SRG-PISLINVFEAVACDQLTQNQ-ILSI-VGAENWLNSAADQIFG-AGGEMPRLALVFDV-SRATAEIVGLKELITEHRL	168	
An SPS	1 : -----MTPATL---FTPVEARLILADN-LKQL-VGNRHLILFAAAEHLFG-AGGEMPRLALVFDV-SRATAEIVGLKELITEHRL	73	
Rc SPS	1 : -----MAIDFKQDILAPVAQ-FAAAMDQF-INEG-ISSKVALVHSVSKHVG-AGGEMPRLALVFDV-SRATAEIVGLKELITEHRL	76	
Ec OPS	1 : -----MNLK--INE LTAAHGAGVNAA-ILEQ-LNSD VOLINOLQGYIIVS-GGEGEPMFPIINC LSA-ATAGGET-NLKHAOKLAII-	72	
Hb GGPs	67 : QEEQNNPPP---FD-[KSYMLQKGNSINQAL-EAAIPLQE[AKIHESMRYSLLAGGTIVPALC-BAACELVGGNDS---MANPAACA	146	
	I		
At SPS1	157 : AIEIEMIHTASLIDHDM--LIEEDMPEGCENIVHLCFCITRAVLAGDF--MFAQASWVLANLE--MIEIPILISQVIKDF-ASEEIK-DAS	238	
At SPS2	168 : GEIIEIHTASLIDHDM--LIEEDMPEGCENIVHLCFCITRAVLAGDF--MFAQASWVLANLE--MIEIPILISQVIKDF-ASEEIK-DAS	249	
Hb SPS	169 : ADIIEIHTASLIDHDM--LIEEDMPEGCENIVHLCFCITRAVLAGDF--MFAQSSWVLANLE--MIEIPILISQVIKDF-ASEEIK-DAS	250	
An SPS	74 : AEIIEIHTASLIDHDM--VIEEVEPVGPIVNEESELEPGLVLAQDF--LFAQSSWVLANLE--MIEIPILISQVIKDF-ASEEIK-DAS	155	
Rc SPS	77 : --I-EMIHTASLIDHDM--VIEEVEPVGPIVNEESELEPGLVLAQDF--LIAFRADLIVDUD--MIEIPILISQVIKDF-ASEEIK-DAS	155	
Ec OPS	73 : --I-BFIHTASLIDHDM--VIEEVEPVGPIVNEESELEPGLVLAQDF--IYTRAFQNMNTSLG--SLKLEVIVCAVNVI-AEDEVL-ILM	151	
Hb GGPs	147 : V--EMIHTASLIDHDM--VIEEVEPVGPIVNEESELEPGLVLAQDF--LIEEAEHIAVSTLNVSSARIVRAVGEALKAIAGELVAGVV	233	
	II	III	IV
At SPS1	239 : SLFCCOTKLDELLSFSY---ITASLVAASTKCGAAIFSRVEPDVIEQYEFICKNLLSPOIQTIDLIQDOSTEOLCHPAPSDLQANLII	324	
At SPS2	250 : SLFCCOTKLDDMLLSFSY---ITASLVAASTKCGAAIFSKVESKVAEQHYQFFKNLQELSPOUVDLQDOSTEOLCHPAPSDLQANLII	335	
Hb SPS	251 : SLFCCOTKLDELLSFSY---ITASLVAASTKCGAAIFSKVESKVAEQHYQFFKNLQELSPOUVDLQDOSTEOLCHPAPSDLQANLII	336	
An SPS	156 : HRFELASISLEYTIESSYY---ITASLVANSKKAAGLSESVPTAEELHYAYGRHGLIAFOIDDLQDOSTEOTTDILCHGPVVSLSQKCNLII	241	
Rc SPS	156 : AQRPQPTTIEDLQLIIG---ITSPFLATECATLAGK--PEYREPLRRPAGHFIAFQIHDILQDOSTADTIGENWIDCLNEEKP	240	
Ec OPS	152 : NVFELPITEENHRVIYS---ITAPLFEEAAAQCSCLAGCTPEEEKGLDQDYERYLTAFULIQLLQDGEQGLGENVCDCLNEEKP	237	
Hb GGPs	234 : D-INSSEGSEVDLPELEFIHITVAKLLEGAVVLGAALGGGTDDEEVKLRKYARDIILQDQVQDQDQKSOELEKTAGLQVADKVI	322	
	V	VI	
At SPS1	325 : AFWIFLEREPRLREI-IESEFCEAES--LEEAIEAVTKGG-IKRAQELAREKADDIHK-MDQCLRSGFRALEDMVLYNLEDID	406	
At SPS2	336 : AFWIFLEREPRLREI-IESEFCEAES--LEEAIEAVTKGG-IKRAQELAREKADDIHK-MDQCLRSGFRALEDMVLYNLEDID	417	
Hb SPS	337 : AFWIFLEREKEPLKREI-IESEFCEAES--LEEAIEVVKQCGEIERAQELAREKADLHQ-MDQCLRSGFRALEDMVLYNLEDID	418	
An SPS	242 : AFWIFLAEAKPYLE-VLIREFAQED--LEQAELIQDSQEIQSQRELAAHHTKLLIE-HATLIPSESHQALIKIAEYAISLY	323	
Rc SPS	241 : AFWIFLAEAKPYLE-VLIREFAQED--LEQAELIQDSQEIQSQRELAAHHTKLLIE-HATLIPSESHQALIKIAEYAISLY	325	
Ec OPS	238 : LPLLHMHRHGTPEQAMQDRTAIEQGNGRHLLEPYLEAKNACSELEUTQRRAEEDAKIAALQWLEDTPUREALIGLAHIAVSDR	323	
Hb GGPs	323 : YPKLLG--IEKSREFAAEKLNKBAQ-EQ-L---GFD-[EKAA--PEIALANYIAHQ	370	
	VII		

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)

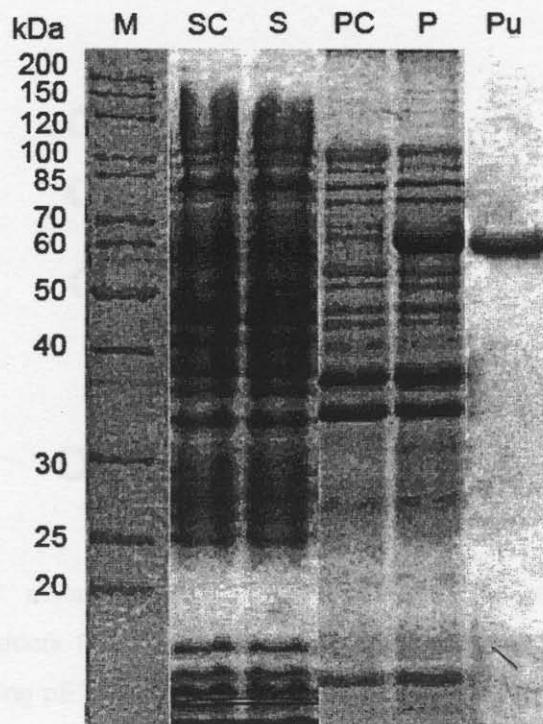


Figure B.16 SDS-PAGE gel of purified HbSDS. Lane SC and S, soluble protein from non-induced and induced *E. coli* cells, respectively; lane PC and P, insoluble proteins from non-induced and induced *E. coli* cells, respectively; lane Pu, purified HbSDS; lane M, molecular-mass markers. (Phatthiya et al,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

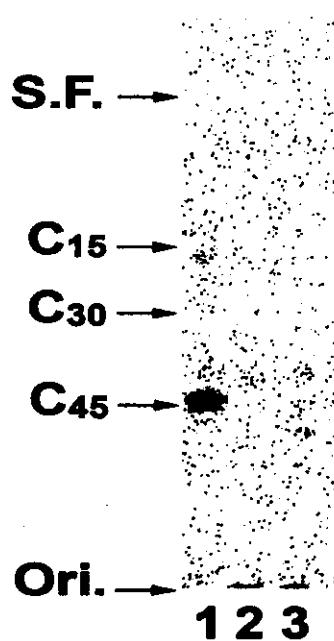


Fig.B.17 TLC autoradiogram of the prenyl alcohols obtained by enzymatic hydrolysis of the products formed by the reaction with cell-free homogenate of IPTG induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 1), non-induced *E. coli* harboring pET-HbSDS (lane 2), and *E. coli* harboring pET-32 (lane 3). (Phatthiya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

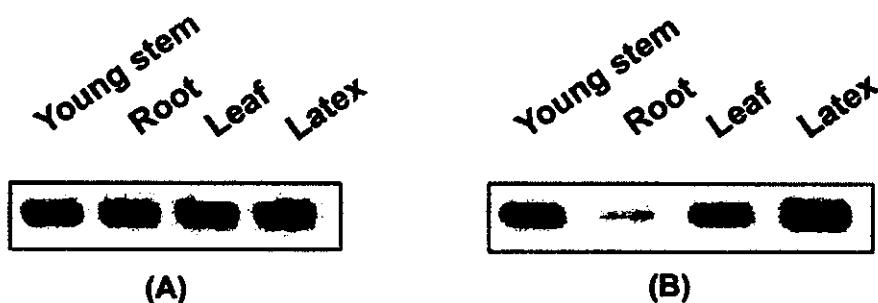


Fig.B.18 Analysis of mRNA expression patterns by RT-PCR. (A) Control (18S rRNA); (B) mRNA expression of HbSDS (35 cycles). (Phatthiya et al, 2007. Appendix 6)

References:

- Archer, B. L., Audley, B. G., 1987. New aspects of rubber biosynthesis. Bot. J Linnean Soc. 94, 181-196.
- Comish, 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 (C₅₅-UPP) for rubber biosynthesis 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: Steinbüchel, 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* organelle 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)