รายงานการวิจัย

เบต้า-1,3-กลูคาเนส ไอโซไซม์จากยางพาราและการต้านเชื้อรา

Hevea β-1,3-glucanase Isozymes and Antifungal Activities

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ผศ. ดร. นันทา เชิงเชาว์

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2539 และ 2540

Order Key 17606
BIB Key 18283

เลขหมู่ QK898.H8 ว483
เลขทะเบียน
1 ธ.ค. S.A. 2541

บทคัดย่อ

ไอโซไซม์ของเบต้า-1,3-กลูคาเนส GI และ GII ได้ถูกเตรียมให้บริสุทธิ์จากบี-ซีรั่มของน้ำยาง โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ CM-cellulose และแบบจำเพาะเจาะจงกับ ConA agarose อัตราส่วนของ GI : GII ในน้ำยางพันธุ์ RRIM600 และพันธุ์ GT1 เท่ากับ 2 : 1 และ 1 : 8 ตามลำดับ GI และ GII เป็นโปรตีนเชิงเดี่ยวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32,000 และ 35,000 ดาลตัน ทั้งสองไอโซไซม์มีความเสถียรต่อความร้อนได้ถึง 60°C ค่า pH optimum ของ GI และ GII คือ 4.5 และ 5.0 เอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่มีหน่วยย่อยเป็นกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,3-ดี (β-1,3-D-glucosidic linkage) และหน่วยย่อยกลูโคสต้องมีความยาวพอสมควรโดยไม่มีการแตกแขนง ได้แก่ซีเอ็ม-พาไดแมน และลามินาริน ทั้งสองไอโซไซม์ไม่ย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4-ดี หรือ เบต้า-1,6-ดี ได้แก่ ไลชินินและพัสทิวแลน GI และ GII เป็นเบสิคโปรตีน มีค่า pI ประมาณ 9.5 และเป็นไกลโคโปรตีนมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 31.45% และ 4.43% ตามลำดับ ได้มีการวิเคราะห์หา amino acid composition และลำดับกรดอะมิโน แต่เกิด N-terminal block จากการทดลองด้วย p-nitrophenyl substrate และโดยวิธี TLC พบว่าทั้งสองไอโซไซม์เป็น endoglucanases เชื้อรา 4 ชนิดใน 9 ชนิดที่นำมาทดลองถูกยับยั้งการเจริญเติบโตของสายราด้วยบี-ซีรั่ม แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย GI และ GII จากการศึกษาในเชื้อรา Phytophthora palmivora พบว่าทั้งสองไอโซไซม์สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ด้วยความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกัน โดย GII ยับยั้งได้ดีกว่า GI เล็กน้อย ดังนั้นทั้งคู่จัดเป็น pathogenesis related-proteins แอนติบอดี้ต่อ GII ที่เตรียมได้สามารถจับอย่างจำเพาะกับแอนติเจน GI และ GII ได้ดีพอๆกัน แอนติบอดี้สามารถจับกับอีก 4 ไอโซไซม์ในสารสกัดจากใบยาง และจับกับอีก 3 ไอโซไซม์ในน้ำยางต้นอ่อนด้วย นอกจากไอโซไซม์ที่พบในน้ำยางต้นอ่อนจะไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ RRIM600 และ GT1 แล้ว ทั้งสามไอโซไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลไม่ตรงกับ GI หรือ GII เลย ดังนั้นการติดตามเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในน้ำยางต้นอ่อนโดยวิธี Western blot จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการคัดเลือกยางพันธุ์ดีที่มีความต้านทานโรคสูง

Abstract

Two beta-1,3-glucanase isozymes GI and GII were purified from B-serum of Hevea latex using ion-exchange on CM-cellulose and affinity on ConA agarose columns. The proportions of GI:GII are 2:1 and 1:8 in B-serum of rubber clones RRIM600 and GT1, respectively. GI and GII, as determined by SDS-PAGE, are monomeric proteins of MW ca 32000 and 35000. They are relatively heat-stable and retain full activities up to 60°C. The pH optima of the two isozymes are 4.5 (GI) and 5.0 (GII). Specificity studies indicate that both isozymes require relatively long runs of contiguous β -1,3-D-glucosidic linkages with a low degree of glucosyl substitution, such as CM-pachyman and laminarin. The enzymes hydrolyse neither β -1,4-D- nor β -1,6-D-glucosidic linkages, such as lichenin and pustulan. Both isozymes are basic proteins with pIs about 9.5. The amino acid compositions and sequences were analyzed, however both N-terminals are blocked. GI and GII are glycoproteins with 31.45 % and 4.43 % (w/w) carbohydrates. They are classified as endoglucanases based on the results from TLC and hydrolysis of p-nitrophenyl substrate. Four of nine tested fungi were inhibited by B-serum. However, GI and GII could not inhibit mycelial growth of these four fungi. GII could inhibit the spore germination of Phytophthora palmivora not much better than GI, they exibited antifungal activities at relatively the same concentration. Therefore, they are pathogenesis-related proteins. Antibody against GII was raised. It exibited cross reaction with GI as strong as with GII. It also cross reacted with the other four isozymes in crude leaf extract and the other three isozymes in latex of young seedlings. The isozymes detected in latex of young seedlings RRIM600 and GT1 are the same but different in molecular weights from GI and GII, therefore the Western blot analysis is not practical for young seedlings selection with respect to β -1,3-glucanase and disease resistant.