รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10

โดย นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และคณะ

25 ตุลาคม 2556

สัญญาเลขที่ RDG5550059

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10

คณะผู้วิจัย

1. นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน มหาวิทยาลัยแม่โจ้
2. นางสาวสุทธิพร นันติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
3. นางสาวช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
4. นายเอกวิทย์ ตรีเนตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ชุดโครงการวิจัยแห่งชาติ : ยางพารา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน
หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225
E-mail pairote@mju.ac.th

นักศึกษา/ ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล ผศ.ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์
หน่วยงาน สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์ 053-875249 โทรสาร 053-878225

ชื่อ-สกุล อาจารย์เอกวิทย์ ตรีเนตร
หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225

ชื่อ-สกุล นางสาวสุทธิพร นันติ
หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225

งบประมาณทั้งโครงการ **296,000** บาท
ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2555 ถึง 31 กรกฎาคม 2556

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* พบว่าสามารถลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ แต่ยังไม่มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าโปรติเอสชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนเป้าหมายที่ภาคอุตสาหกรรมต้องการกำจัดทิ้งได้ ดังนั้นงานวิจัยที่เสนอขอนี้จึงได้มุ่งเน้นในการศึกษาถึงการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้แต่ละชนิดด้วยเทคนิค Western blot และ two-dimensional electrophoresis นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้วางแผนศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญบางประการของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำนี้ด้วย โดยในระยะปีที่ 1 ของแผนงาน จะได้มุ่งเน้นเฉพาะการตรวจวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hev b 3 (Small rubber particle protein) Hev b 5 (Acidic protein) และ Hev b 6.02 (Hevein) และหาสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการวิเคราะห์โปรตีนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิค two-dimensional electrophoresis

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในยางโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นโดยโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10

ผลการดำเนินงาน

ผู้วิจัยได้วางแผนการวิจัยซึ่งประกอบด้วยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสผงจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตน้ำยางพาราโปรตีนต่ำ จากนั้นจึงวางแผนตรวจสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Western blot และ 2D-gel electrophoresis แต่ในการดำเนินงานระยะปีที่ 1 นี้ เทคนิคที่สองเป็นเพียงการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เท่านั้น

ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์โปรติเอสผงที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่น ซึ่งภายหลังจากผ่านกระบวนการเตรียมหลายๆ ขั้นตอนแล้ว พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงตามลำดับ และสุดท้ายเมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแล้ว กิจกรรมของเอนไซม์หลงเหลืออยู่ทั้งสิ้น 120,422.53 Unit/กรัมของเอนไซม์ผง และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 169.78 unit/มิลลิกรัมของโปรตีน หลังจากนั้น เมื่อนำเอนไซม์มาบ่มร่วมกับน้ำยางพาราสดในสัดส่วน 500 unit/ น้ำยางพารา 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการบ่มน้ำยางพาราร่วมกับทั้งเอนไซม์และสาร SDS ก็จะพบว่าเอนไซม์โปรติเอสนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ แต่ไม่สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein (Hev b6.02) อย่างไรก็ตามการเติมสาร SDS ร่วมลงไปในน้ำยางพารากลับพบว่าเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ สาเหตุอาจเนื่องมาจากสาร SDS ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาหาเทคนิคการย้อมสีโปรตีนและความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคสีย้อม coomassie brilliant blue R-250 สีย้อม fast and sensitive colloidal coomassie G-250 และ สีย้อม silver staining และเปรียบเทียบความเข้มข้นเจลที่ระดับ 7.5, 12.5 และ 15% (w/v) ผลการทดลองพบว่าเทคนิคการย้อมสีที่เหมาะสมที่สุดคือ

coomassie brilliant blue R-250 และความเข้มข้นเจลที่เหมาะสมคือ 12.5% (w/v) ซึ่งจะได้นำสภาวะดังกล่าวมาใช้ดำเนินการวิเคราะห์โปรตีนชนิดอื่นๆ ในน้ำยางพาราต่อไปในการดำเนินงานระยะปีที่ 2

สรุปผลการวิจัย

จากการใช้เทคนิค Western blot ในการตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์โปรติเอสผงที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในน้ำยางพาราสด พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ แต่ไม่สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein (Hev b6.02) ส่วนการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ นั้น จะได้ทำการตรวจสอบต่อไปด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis ที่ซึ่งเบื้องต้นพบว่าสีย้อมโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดคือสี coomassie brilliant blue R-250 และความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์โปรตีนจากน้ำยางพาราสดคือที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

หากวิเคราะห์ว่าความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อยอดนั้นจะต้องขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัย นั่นคือ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ และต้นทุนการผลิต ก็จะพบว่างานวิจัยนี้ยังมีข้อด้อยในด้านต้นทุนของการผลิตเอนไซม์ ที่ยังคงสูง ดังนั้นควรมีการศึกษาพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์ต้นทุนต่ำในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มโอกาสแข่งขันในเชิงพาณิชย์

ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

บทความวิชาการระดับนานาชาติ “Proteome analysis of deproteinized rubber produced by bacterial protease” และสิทธิบัตร “กระบวนการผลิตน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ”

บทคัดย่อ

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 มีศักยภาพในการใช้ลดปริมาณโปรตีนของยางพาราเพื่อผลิตเป็นยางพาราโปรตีนต่ำ แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานยืนยันได้ว่าโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในน้ำยางพาราสดได้ถูกกำจัดออกไปหรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เสนอให้ทำการตรวจสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot และ 2D-gel electrophoresis ผลการทดสอบพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ แต่ไม่สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein (Hev b6.02) ส่วนการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ นั้น จะทำการตรวจสอบต่อไปด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis ที่ซึ่งเบื้องต้นพบว่าสีย้อมโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดคือสี coomassie brilliant blue R-250 และความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์โปรตีนจากน้ำยางพาราสดคือที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ABSTRACT

Protease enzyme produced from *Bacillus subtilis* MR10 has shown a potential in decreasing of para rubber proteins for deproteinized rubber production. However, no evidence has been shown that the allergenic proteins in natural rubber latex have been degraded. Thus, detection of the remaining allergenic proteins was introduced in this study using Western blot and 2D-gel electrophoresis technique. The results revealed that high risk allergenic proteins; i.e. rubber elongation factor (REF; Hev b1), small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) and acidic protein (Hev b5) were degraded, while hevein (Hev b6.02) could not be destroyed. In case of the other allergenic proteins, they were further investigated using 2D-gel electrophoresis technique. It was preliminary found that the suitable protein staining technique was using coomassie brilliant blue R-250 and the optimal polyacrylamide gel concentration was at 12.5% (w/v).

ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

จากงานวิจัยหัวข้อ การคัดเลือกโปรติเอสที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ (สัญญาเลขที่ RDG5250027) และ การเตรียมโปรติเอสในรูปทางการค้าสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยางสด (สัญญาเลขที่ RDG5350029) ซึ่งได้รับการสนับสนุนจาก สกว. ในปี 2552 และ 2553 ตามลำดับ พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ โปรติเอสผงจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สำหรับใช้ย่อยโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ อย่างไรก็ตามแม้ผลการทดลองจะพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ แต่ยังไม่มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าโปรติเอสชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนเป้าหมายที่ภาคอุตสาหกรรมต้องการกำจัดทิ้งได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้รับการอนุมัติทุนอีกครั้งในปี 2554 ภายใต้โครงการการวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ (สัญญาเลขที่ RDG5450045) ที่มุ่งเน้นศึกษาความสามารถของโปรติเอสผงจาก *B. subtilis* ในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Western blot ซึ่งเป็นเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ได้รับการยอมรับ ทั้งนี้เพื่อยืนยันว่าน้ำยางโปรตีนต่ำที่ผลิตได้นี้ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้จริงและปลอดภัยต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ยางพารา แต่ด้วยข้อจำกัดทางเทคนิคและงบประมาณของโครงการขนาด SPR ทำให้สามารถวิเคราะห์การมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ได้เพียงชนิดเดียวนั่นคือ Rubber Elongation Factor (REF) ดังนั้นงานวิจัยที่จะเสนอขอนี้จึงได้มุ่งเน้นในการศึกษาเพิ่มเติมถึงการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิค Western blot และ two-dimensional electrophoresis นอกจากนี้ จากข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิที่แนะนำให้คำนึงถึงคุณภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมด้วยโปรติเอสชนิดนี้ด้วยว่าอาจจะด้อยลงหลังการกำจัดโปรตีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้วางแผนในการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญบางประการของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำนี้ด้วย ด้วยแผนดำเนินงานทั้งหมดดังกล่าวนี้ คาดว่าจะช่วยให้สรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 นี้สามารถใช้เตรียมยางโปรตีนต่ำที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้และมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับยางทั่วไปได้หรือไม่

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในยางโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นโดยโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10

ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

โปรตีนหลายชนิดที่อยู่ในน้ำยางดิบสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ (Allergy) ขึ้นแก่ผู้สวมใส่ผลิตยางพาราโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถุงมือยาง โดยอาการแพ้นี้มีทั้งแบบเฉียบพลันและค่อยเป็นค่อยไป (ไพโรจน์ และพรสิทธิ์, 2540) อาการมีตั้งแต่เพียงระคายเคืองเมื่อสวมใส่ถุงมือ (Irritant contact dermatitis) ไปจนถึงอาการที่เรียกว่า anaphylaxis ซึ่งมีความรุนแรงมาก (Sussman et al., 2002) ดังนั้น ในกระบวนการผลิตจึงต้องกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกเสียก่อน วิธีการกำจัดโปรตีนมีตั้งแต่การล้างด้วยน้ำเปล่า แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกไปได้หมดเสียทีเดียว มีรายงานว่าโปรตีนบางชนิดในน้ำยางธรรมชาติสามารถถูกทำลายได้โดยการปรับสภาวะให้เป็นด่างแก่ เช่น การเติมแอมโมเนีย แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในน้ำยางจะทำให้เกิดผลกระทบต่อคุณสมบัติกายภาพของน้ำยางได้ (Moris and Lakin, 1995 อ้างโดย Perrella and Gaspari, 2002) ปัจจุบันวิธีที่ใช้กำจัดโปรตีนคือ การนำน้ำยางดิบไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนซีรัมทิ้งไป แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนส่วนที่เกาะกับอนุภาคยางออกไปได้ ซ้ำยังทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นเพิ่มขึ้นจาก 25 เปอร์เซ็นต์เป็น 50 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย (Perrella and Gaspari, 2002) จึงได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์โปรติเอส (Proteases) เข้าช่วยในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางเนื่องจากสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้งในส่วน serum และ rubber phase

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัยเอง พบว่าโปรติเอสที่ผลิตได้มาจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ซึ่งแยกได้มาจากถั่วเน่า (อาหารหมักพื้นบ้านทางภาคเหนือของประเทศไทย) มีประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางดิบได้ดีเมื่อเทียบกับโปรติเอสแหล่งอื่น และผู้วิจัยก็ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงกระบวนการเตรียมเอนไซม์ดังกล่าวนี้ให้อยู่ในรูปผงซึ่งสะดวกต่อการนำไปใช้งานจริงเป็นที่เรียบร้อยแล้ว แต่อย่างไรก็ตามแม้โปรติเอสที่ผลิตได้นี้จะสามารถย่อยโปรตีนได้มากเพียงใด แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าโปรติเอสไม่มีความจำเพาะ (Specificity) ต่อโปรตีนภูมิแพ้ที่สนใจ ทำให้โปรตีนภูมิแพ้เหล่านี้ยังคงอยู่ในน้ำยาง เกิดเป็นประเด็นที่ยังสงสัยอยู่ ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ข้อสงสัยดังกล่าวจึงควรมีการทดสอบความสามารถของโปรติเอส จาก *B. subtilis* MR10 ในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสด ซึ่งมีหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 ข้อมูลจำเพาะและคุณสมบัติการก่อภูมิแพ้ของโปรตีนแต่ละชนิดต่อผู้ป่วยได้มีการรายงานในรายงานต่างๆ มากมาย เช่น รายงานของ Palosuo (1997), Ylitalo et al. (1998), Sussman et al. (2002), Raulf-Heimsoth et al. (1997), Yeang et al. (2002) และ Yeang et al. (2004) เป็นต้น

ในการวิเคราะห์โปรตีนที่อยู่ในน้ำยางพารานั้นหากใช้วิธีทางเคมีเช่น Lowry's method, Modified Lowry's method หรือ Bradford's method ก็จะสามารถบอกได้เพียงปริมาณโปรตีนโดยรวมเท่านั้น ไม่สามารถระบุถึงโปรตีนแต่ละชนิดได้ ดังนั้นหากต้องการศึกษาถึงโปรตีนแต่ละชนิดทั้งเชิงคุณภาพและ/หรือปริมาณแล้ว พบว่าวิธีในเชิงหลักการของ electrophoresis (เช่น SDS-PAGE และ 2-dimensional electrophoresis) และ Immunoblotting (เช่น LEAP, RAST inhibition assay และ ELISA inhibition test) ได้รับความนิยมมากจากนักวิจัย (Raulf-Heimsoth et al., 1997; Breezhold et al., 2002; Tomazic-Jezic and Lucas, 2002) นอกจากนี้การใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนก็มีรายงานเช่นกัน (Tomazic and Lucas, 2002) วิธีการทาง Immunoblotting จะมีความถูกต้องของข้อมูลมากกว่าวิธี electrophoresis เพราะแอนติบอดี้ที่เติมลงไปจะจับกับโปรตีนภูมิแพ้ได้อย่างจำเพาะทำให้สามารถระบุการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ได้อย่างถูกต้องแม้จะมีโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันอยู่ด้วยก็ตาม อย่างไรก็ตาม วิธีการทาง Immunoblotting นี้แม้จะมีความจำเพาะและความถูกต้องสูง แต่ก็เป็นวิธีการที่ค่อนข้างซับซ้อน และมี

ค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากต้องมีการเตรียมแอนติบอดี้ของโปรตีนภูมิแพ้แต่ละชนิดซึ่งต้องเตรียมจากสัตว์ทดลอง ดังที่ Tomazic และ Lucas (2002) ได้สรุปข้อดี-ข้อเสียของการวิเคราะห์โปรตีนบางวิธีไว้ในตารางที่ 2

แต่หากต้องการเพียงศึกษาการกระจายตัวตามขนาดโมเลกุลของโปรตีนผสมในน้ำยางพาราแล้วนั้น พบว่าการใช้วิธีการทาง electrophoresis ก็เพียงพอและเป็นที่ยอมรับ เทคนิคนี้มีหลักการคือเมื่อโปรตีนอยู่ในสนามไฟฟ้า โปรตีนที่แตกต่างกันจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกันด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุล รูปร่างและขนาดโมเลกุล นอกจากศึกษาการกระจายตัวได้แล้วยังสามารถบอกถึงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดได้โดยเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว ยกตัวอย่างเช่น มีการใช้เทคนิค SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) ในการศึกษาโปรตีนผสมในน้ำยางพาราโดย Tomazic et al. (1995) และการตรวจหาเอนไซม์ไลโซไซม์ (lyzozyme) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดหนึ่งในน้ำยางพาราโดย Yagami et al. (1995) แต่มีข้อเสียที่ไม่สามารถแยกโปรตีนต่างชนิดกันที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันได้ จึงมีการพัฒนาเทคนิค 2-dimensional electrophoresis ขึ้น และใช้ศึกษาจำแนกโปรตีนในน้ำยางพาราได้ เช่นในการศึกษาของ Posch et al. (1997) เป็นต้น

จากข้อมูลทั้งหมด อาจจะพอสรุปได้ว่าวิธีที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือที่สุดในการตรวจหาโปรตีนภูมิแพ้ก็คือการใช้วิธีการทาง Immunobloting แต่จำเป็นต้องมี antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดที่สนใจนั้นเสียก่อน แต่ถ้าไม่สามารถจัดหาหรือผลิต antibody ออกมาได้ ก็อาจใช้เทคนิค 2-D electrophoresis ช่วยในการศึกษาโปรตีนผสมเหล่านี้ เนื่องจากสามารถแยกโปรตีนออกจากกันได้ แม้จะมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันก็ตาม แต่ก็อาจมีโอกาสแปรผลคลาดเคลื่อนไปบ้างเล็กน้อย งานวิจัยนี้จึงเสนอให้มีการวิเคราะห์การมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำด้วยเทคนิคทาง Immunobloting ที่มีชื่อว่า Western blot และเทคนิค 2-D electrophoresis ควบคู่กัน

แต่อย่างไรก็ตาม คุณภาพของผลิตภัณฑ์ยางที่ผลิตมาจากน้ำยางที่ผ่านการกำจัดโปรตีนออกไปโดยโปรติเอสจากเชื้อ MR10 ยังไม่สามารถคาดการณ์ว่าจะยังคงได้มาตรฐานหรือไม่ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาถึงคุณสมบัติบางประการของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นอย่างยิ่ง ถึงแม้ว่าจะมีรายงานวิจัยบางฉบับที่ระบุว่าถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางที่เติมโปรติเอสยังคงมีค่า tensile strength at break และ ultimate elongation สูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดก็ตาม (Perrella and Gaspari, 2002) แต่ก็เป็นเอนไซม์คนละชนิดกันที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ด้วยแนวคิดของการวิจัยดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นนี้ ก็คาดว่าเมื่อเสร็จสิ้นงานวิจัยแล้วจะได้หลักฐานยืนยันความปลอดภัยต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ยางพาราที่สัมผัสผิวหนังว่าปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ และความเชื่อมั่นถึงคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากยางโปรตีนต่ำที่เตรียมด้วยโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10 ได้

ตารางที่ 1 Latex allergens recognized by the International Union of Immunological Societies (IUIS)

IUIS code	ชื่อ	Molecular mass (kDa)	pI	แหล่งที่พบ
Hev b1	Rubber elongation factor (REF)	14.6, 58	4.9	อนุภาคยาง
Hev b2	Beta-1,3-glucanase	34-36	9.5	B-serum
Heb b3	Small rubber particle protein (SRPP)	22-23	4.8	อนุภาคยาง
Heb b4	Microhelix, cyanogenic glucosidase	50-57	4.5	B-serum
Heb b5	Acidic protein	16	3.5	C-serum
Heb b6.01	Prohevein	19-20	5.6	B-serum
Heb b6.02	Hevein	4.7	4.9	B-serum
Heb b6.03	Prohevein C terminus	14	6.4, 7.0, 7.4	B-serum
Heb b7.01	Patatin homolog, rubber biosynthesis inhibitor	43-44	-	C-serum
Heb b8	Profilin	10.2-15.7	4.9	C-serum
Heb b9	Enolase	48-51	5.6-6.4	C-serum
Heb b10	Mn-superoxide dismutase	23-45	6.3	B-serum

ที่มา: Yeang et al., 2002. และ Sussman et al., 2002.

ตารางที่ 2 Methods for measurement of natural rubber latex proteins, antigens, and allergens

Method	Type	Advantages	Disadvantages
Modified Lowry method (D5712)	Chemical method, measures total proteins	Standardized, available as a kit	Insufficient sensitivity, chemical interference
Amino acid analysis (HPLC)	Chemical method, measures amino acids	Sensitive, reproducible	Expensive equipment, technical expertise
LEAP	Immunologic method, Measures antigenic protein	Sensitive, available as kit	Assay format, not standardized
RAST inhibition assay	Immunologic method, measures antigenic or allergenic proteins	Good assay format, very sensitive	Radioactive isotope, not standardized
ELISA inhibition test	Immunologic method, measure allergenic protein	Good assay format, colorimetric, good sensitivity	Uses human serum, can not be standardized
ELISA inhibition test (D6499)	Immunologic method, measure antigenic proteins	Sensitive, standardized	New as a standard, unknown reproducibility of standard reagents

ที่มา: Tomazic และ Lucas, 2002.

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

Bacillus subtilis (MR10)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Casein medium และ Nutrient broth

3. น้ำยางพารา

ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง (สกย.) จังหวัดเชียงใหม่

4. สารเคมี

	ยี่ห้อ
Casein from bovine milk	FLUKA
Albumin from chicken white egg	SIGMA
Tyrosine	MERCK
K_2HPO_4	MERCK
KH_2PO_4	SCHARLUA
Trichloroacetic acid (CCl_3COOH)	MERCK
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	MERCK
Folin-ciocalteau reagent	MERCK
Sodium hydroxide (NaOH)	J.T BAKER
Copper sulphate ($Cu_2SO_4.5H_2O$)	AJAX
Potassium sodium tartrate tetra hydrate ($NaKC_4H_4O_6.4H_20$)	MERCK
Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	MERCK
HCl	LAB SCAN
Anti-latex rubber elongation factor monoclonal antibody	Pierce
Anti-latex SRPP monoclonal antibody	Icosagen
Anti-latex acidic protein monoclonal antibody	Icosagen
Anti-latex Hevein monoclonal antibody	Icosagen
Goat anti-mouse IgG HRP	Pierce
GBX DEV/REPL	KODAK
GBX Fix/REPL	KODAK

	ยี่ห้อ
Glycine	Research Organics
Sodium Dodecyl Sulfate	BIO BASIC
Tris	Research Organics
Skim milk	MERCK
Acrylamide(C_3H_5NO)	Merck
Ammonium persulfate	Fluka
Acetic acid	Merck
Aluminium sulphate octadecahydrate	Loba
Agarose NA	Amersham biosciences
Bromophenol blue	Fluka
β-mercaptoethanol	Acros
Copper(II)sulfatepentahydrate	Univar
Coomassie brilliant blue G 250	Fluka
Coomassie brilliant blue R 250	Fluka
Dithiothreitol, DTT	U.S.B
Drystrip cover fluid	Amersham biosciences
Ethanol	Merck
Folin-ciocalteau's phenol	Merck
Formaldehyde	QReC
Glycine	Fisher
Glycerol	Carlo Erba
Hydrochloric acid	Carlo Erba
Iodoacetamide, IAA	Amersham biosciences
IPG buffer pH 3-10NL	Amersham biosciences
Methanol	Loba
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	Fluka
N,N'-methylenebisacrylamide	Fluka
Orthophosphoric acid	Merck
Phosphoric acid	Sigma
Sodium dodecyl sulfate, SDS	Sigma
Sodium hydroxide	Merck
Sodium carbonate	Merck
Sodium potassiumtartrate	Fisher
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Merck
2D Clean-up kit	Amersham biosciences
2D Quant kit	Amersham biosciences

5. อุปกรณ์

	ยี่ห้อ
เครื่องเขย่าชนิดแบบควบคุมอุณหภูมิได้	RATEK
ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar airflow)	FLUFRANCE
ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Incubator)	MEMERT
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ	HETTICH ZENTRIFUGER
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	SPECTRONIC GENESYS 5
เครื่องกวนสารแบบใช้ความร้อน (Hot plate stirrer)	CLIFTON CERASTIR
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	BINDER
เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	VORTEX GENIC 2
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	MEMMERT
เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข้ง (Freeze dryer)	DURA-DRY μP
เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Rotary evaporator)	BU CHI
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml	PYREX
หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 ml	CORNING
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)	PYREX
ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 500 ml, 1000 ml	DURAN
กระบอกตวง (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 ml, 500 ml, 1000 ml	PYREX
หลอดทดลอง (Test tube)	PYREX
ถุงไดอะไลซิส (Dialysis tubing)	CELLU SEP
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)	PYREX
Amersham ECL Gel 12%	AMERSHAM
X-ray film	KODAK
Ettan IPG Strip holder	Amersham Biosciences
Image Scaner	Amersham Biosciences
Immobilin Drystrip pH 3-10 NL	Amersham Biosciences
Isoelectric focusing system	Amersham Biosciences
Vertical electrophoresis system	Hoefer SE 250

วิธีการทดลอง

(1) การเตรียมโปรติเอสผงจากเชื้อ *Bacillus subtilis* (MR10)

อ้างอิงจากกระบวนการที่ได้จากงานวิจัยเลขที่ RDG5350029 กล่าวโดยย่อคือ เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ในอาหารเหลว casein medium ปริมาณ 150 ml เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลายส่วนใส นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ให้มีเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวที่ร้อยละ 85 กวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนโปรตีนที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายกลับในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 15 ml จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปบรรจุลงในถุงไดอะไลซีสขนาด 12 kDa cut-off แล้วแช่ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 6 ชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซีสไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง โปรติเอสผงที่ได้ให้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หากต้องการนำมาใช้ก็จะทำการละลายกลับด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM pH 7.0 ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 50 ml ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอสด้วยวิธีการที่อ้างอิงจาก Chantawannakul และคณะ (2002) และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ด้วยวิธี Lowry' s method และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ

(2) การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ

เอนไซม์โปรติเอสทั้งที่เตรียมเองและโปรติเอสในทางการค้า จะมีการวัดปริมาณในรูปของค่ากิจกรรมโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Chantawannakul และคณะ (2002) โดยใช้ Casein from bovine milk เป็นสับสเตรท วิธีการทำได้โดยเตรียมสารละลายผสม 4 หลอดได้แก่

หลอดที่ 1 (ES): สารละลายเอนไซม์ปริมาณ 1 ml + สารละลาย Casein from bovine milk เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ปริมาณ 1 ml

หลอดที่ 2 (EB): สารละลายเอนไซม์ปริมาณ 1 ml + 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 1 ml

หลอดที่ 3 (SB): สารละลาย Casein from bovine milk เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ปริมาณ 1 ml + 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 1 ml

หลอดที่ 4 (BB): 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาณ 2 ml

นำสารแต่ละหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.4 M Trichloroacetic acid 2 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 8,000 rpm 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมา 0.5 ml เติม 0.4 M Na_2CO_3 2.5 ml และ Folin – Ciocalteau phenol reagent 0.5 ml ทิ้งไว้ 30 นาที

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาปริมาณของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์โปรติเอส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ tyrosine ที่เตรียมไว้แล้ว ทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์โปรติเอส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย tyrosine ออกมา 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่วิเคราะห์ และค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ของเอนไซม์คำนวณจากค่ากิจกรรมของโปรติเอส (unit/ ml) หารด้วยปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ (mg/ ml)

(3) การเตรียมน้ำยางพาราโปรตีนต่ำสำหรับใช้ในงานวิจัย

ผสมน้ำยางพาราสดกับน้ำกลั่นในสัดส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นเติมโปรติเอสในสัดส่วนโปรติเอส 500 ยูนิตต่อน้ำยางพารา 100 ml พร้อมทั้งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 45 $^{\circ}$C 20 ชั่วโมง

(4) การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot

นำน้ำยางโปรตีนต่ำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 30 นาที เพื่อแยกส่วนเนื้อยางและชั้นซีรั่ม ใช้หลอดหยดปลายแหลมเป็นอุปกรณ์ดูดเก็บรวบรวมส่วนซีรั่ม แล้วแบ่งเก็บไว้เป็นส่วนๆ(Aliquot) ในตู้แช่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของโปรตีนระหว่างรอการวิเคราะห์ และทำการวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) ในส่วนของชั้นซีรั่มด้วยวิธี Modified Lowry's method

(5) การวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของโปรตีนผสมในซีรั่มของน้ำยางโปรตีนต่ำ

สำหรับการแยกโปรตีนตามขนาดจะใช้วิธี SDS-PAGE ในการวิเคราะห์ โดยใช้เจลสำเร็จรูป Amersham ECL Gel 12%, 10 wells โดยเตรียมสารละลาย 1x Electrode Running Buffer เติมลงใน Amersham ECL Gel Box ปริมาตร 180 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียมเจล โดยทำการชะเจลและใส่เจลลงใน Amersham ECL Gel Box ปิดฝาให้สนิท และเชื่อม Amersham ECL Gel Box กับ Power supply โดย Pre-run เจลเป็นเวลา 12 นาทีที่กำลังไฟฟ้า 150 V จากนั้นเปิดฝาเพื่อถอดหวีออกจากเจล เติม 1X Running Buffer ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงไป โดยใช้ตัวอย่าง 15 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย ตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร และสีย้อม 10 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well ทำการ Run gel เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่กำลังไฟฟ้า 150 V จากนั้นถอดเจลออกจาก Amersham ECL Gel Box ทำการย้อมสีเจลเป็นเวลา 5 นาที และล้างสีออกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

(6) การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot

6.1 การเตรียมตัวอย่างซีรั่มบน PVDF membrane

ทำการแช่ PVDF membrane ในเมทานอลเป็นเวลา 5 นาที และนำไปแช่ใน Transfer buffer อย่างน้อย 15 นาที หลังจากนั้นทำการหยดตัวอย่างซีรั่ม 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น membrane และรอจนกระทั่งแห้ง

6.2 การบ่มซีรั่มร่วมกับแอนติบอดี้

นำ PVDF จากข้อ 6.1 มาล้างด้วย TSB buffer นาน 10 นาที 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10-15 ml บ่มต่อด้วย non-fat milk ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่น PVDF ไปบ่มร่วมกับ Anti-latex antigen monoclonal antibody แต่ละชนิด (Hev b3, Hev b5 และ Hev b6.02) (อัตราการเจือจาง 1: 10,000 in 4% non-fat milk) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ให้ล้าง PVDF ด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 15 นาที และล้างด้วย TSB buffer อีก 1 ครั้ง ต่อไปให้นำแผ่น PVDF ดังกล่าวมาบ่มร่วมกับ Goat anti-mouse IgG HRP (อัตราการเจือจาง 1:10,000 in 4% non-fat milk) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น PVDF เช่นเดิมด้วย TBST และ TSB buffer

6.3 การตรวจสอบผล

นำแผ่น PVDF นี้ไปทำปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจสอบชนิด chemiluminescent detection kit (Pierce, super signal Chemiluminence) 5 นาที จากนั้นเตรียมสารเคมีสำหรับล้างฟิล์มโดยผสมน้ำกลั่นกับสารละลาย Fixer ในอัตราส่วน 4:1 และผสมน้ำกลั่นกับสารละลาย Developer ในอัตราส่วน 4:1 เช่นเดียวกัน นำแผ่น PVDF มาประกบลงบนแผ่นฟิล์ม X-ray ในที่มืดเป็นเวลา 5-60 นาที หรือข้ามคืน ขึ้นกับกรณีแล้วล้างฟิล์มโดยแช่แผ่นฟิล์มในสารละลาย Fixer เป็นเวลา 30 วินาที และแช่ในสารละลาย Developer เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดอย่างรวดเร็ว ผึ่งแผ่นฟิล์มให้แห้ง แล้วสังเกตแถบสีดำที่เกิดขึ้น

(7) การวิเคราะห์โปรตีนผสมในซีรั่มของน้ำยางพาราโปรตีนต่ำด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis

ในการศึกษาหัวข้อนี้ในแผนงานระยะปีที่ 1 จะเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราโปรตีนต่ำ โดยสภาวะที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ได้แก่ เทคนิคการย้อมสีโปรตีนและความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสม

7.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีน

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเริ่มต้นในซีรั่มน้ำยางพาราโปรตีนต่ำแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธี Modified Lowry และ Micro assay จากนั้นทำการวิเคราะห์รูปแบบเบื้องต้นของการกระจายตัวของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เครื่องมือ Hoefer รุ่น SE250 ใช้เจลขนาด 10 x 8 cm ซึ่งในหัวข้อนี้จะทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 2 ประเด็น ได้แก่

1) <u>เทคนิคการย้อมสี</u> ได้แก่ สีย้อม coomassie brilliant blue R-250 สีย้อม fast and sensitive colloidal coomassie G-250 และ สีย้อม silver staining โดยทำการศึกษาบนเจลความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนในตัวอย่างปริมาณ 40 ไมโครกรัม

2) <u>ความเข้มข้นของเจล</u> ได้แก่ ความเข้มข้นของเจลที่ 7.5% 12.5% และ 15% ทั้งที่เป็นสภาวะ reducing (เติม β-mecaptoethanol) และสภาวะ non-reducing (ไม่เติม β-mecaptoethanol)

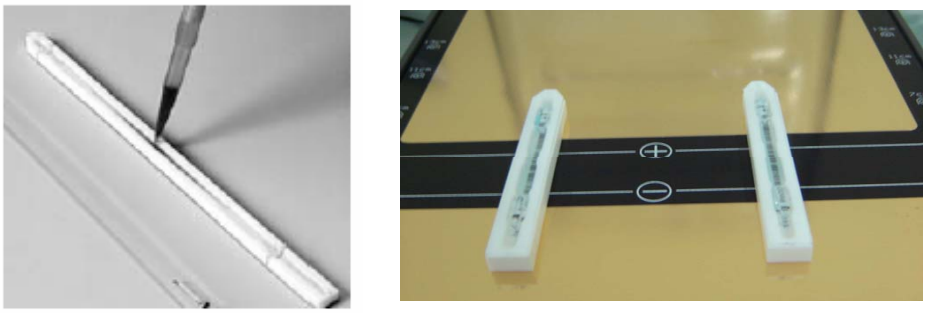
7.2 การศึกษารูปแบบของโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค 2D-gel electrophoresis ร่วมกับ MALDI-TOF MS

ทำการกำจัดสิ่งเจือปน เพื่อทำให้ตัวอย่างซีรั่มมีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ 2-D Clean-Up Kit รุ่น Code No. 80-6483-51 (GE-Healthcare) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Micro assay ใช้ 2D-Quant Kit รุ่น Code No. 80-6483-56 (GE-Healthcare) ก่อนดำเนินการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่องมือ 2-D gel electrophoresis จากศูนย์เครื่องมือ หน่วยวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งมีวิธีการคร่าวๆ ดังต่อไปนี้

1) การแยกโปรตีนมิติที่ 1 ด้วยวิธี IEF

เตรียมสารละลายสำหรับทำ IEF ปริมาตร 125 µl ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนตัวอย่าง 6 µg, 20 mM DTT, 0.8% v/v IPG buffer และ rehydration stock solution จากนั้นถ่ายตัวอย่างลงไปใน strip holder ขนาด 7 cm ดังภาพที่ 1(A) จากนั้นปิดฝาของ strip holder แล้วนำไปวางบนเครื่อง Ettan IPGphor II ดังภาพ 1(B) และดำเนินระบบดังโปรแกรมต่อไปนี้ เมื่อโปรแกรมสิ้นสุดจึงนำ strip ออกจาก strip holder ไปทำการแยกโปรตีนมิติที่ 2 ด้วยวิธี SDS-PAGE ต่อไป

Step 1 step and hold	150 V	200 V/hr
Step 2 step and hold	300 V	200 V/hr
Step 3 Gradient	1000 V	300 V/hr
Step 4 Gradient	5000 V	4500 V/hr
Step 5 step and hold	5000 V	6500 V/hr
Total		11,700 V/hr



(A) (B)

ภาพที่ 1 การถ่ายสารละลายโปรตีนลงใน strip holder (A) และการวาง strip holder บนพื้นที่ electrode ของเครื่อง Ettan IPGphor II (B)

2) การแยกโปรตีนมิติที่ 2 ด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการ equilibrate IPG strip ก่อนทำ SDS-PAGE โดยแช่ IPG strip จากข้อที่ 1) ลงในสารละลาย DTT (0.05 g ใน SDS equilibration buffer 5 ml) จากนั้นย้ายมาล้างในสารละลาย IAA (1.25 g ใน SDS equilibration buffer 5 ml) แต่ละขั้นตอนจะทำการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที

แช่ IPG strip ที่ได้จากลงใน 1X SDS electrophoresis running buffer (tank buffer) เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อล้าง glycerol ที่เป็นองค์ประกอบใน SDS equilibration buffer ออก แล้ววาง strip ลงบน polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้ เตรียม protein marker ปริมาตร 0.75 μl ลงบนกระดาษกรอง (ขนาด 3×5 mm) แล้วทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นวางกระดาษกรองลงตรงช่องว่างด้านซ้ายของ IPG strip แล้วปิดผิวหน้า IPG strip ด้วย agarose sealing solution และเริ่มดำเนินระบบ ดังภาพที่ 2 ด้วยโปรแกรมดังนี้

Step 1: current 10 mA/gel	0:15 hr
Step 2: current 20 mA/gel	1:30 hr
Max 150 V and 100 W	

เมื่อสิ้นสุดโปรแกรม จึงทำการย้อมสีเพื่อตรวจสอบผลการกระจายตัวของโปรตีนด้วยเทคนิคที่เหมาะสมที่ศึกษาก่อนหน้านี้

ภาพที่ 2 การต่อเครื่อง mini VE เข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเพื่อทำ SDS-PAGE

ผลการวิจัย

(1) กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

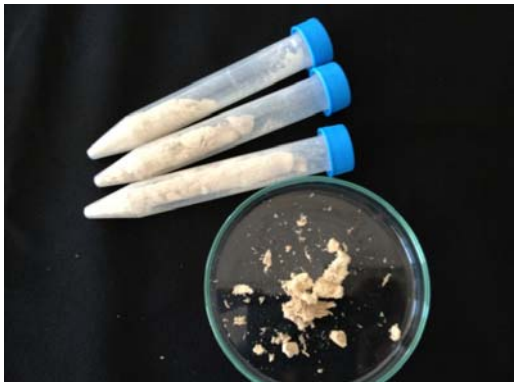
เอนไซม์โปรติเอสผงที่ผลิตขึ้นจากงานวิจัยครั้งนี้มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่นแสดงดังในภาพที่ 3 ซึ่งทั้งนี้ภายหลังจากผ่านกระบวนการเตรียมหลายๆ ขั้นตอนแล้ว พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง แสดงผลดังตารางที่ 3 และสุดท้ายเมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแล้ว กิจกรรมของเอนไซม์หลงเหลืออยู่ทั้งสิ้น 120,422.53 Unit/กรัมของเอนไซม์ผง และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 169.78 unit/มิลลิกรัมของโปรตีน ซึ่งเอนไซม์ที่เตรียมขึ้นนี้ก็จะได้นำมาใช้ตลอดการวิจัย

ตารางที่ 3 แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่หลงเหลืออยู่ภายหลังจากผ่านขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ผง

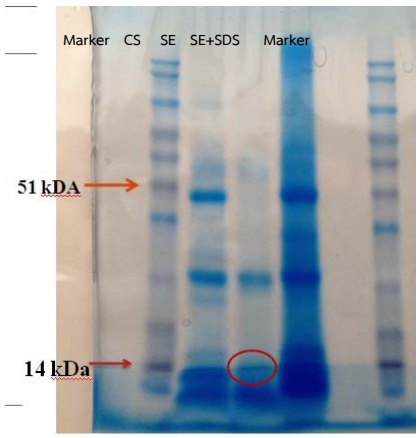
ขั้นตอนการเตรียม	กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (Unit)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (U/mg)	Recovery yield (%)
Crude enzyme	238560	2832.90	8.32	100.00
ตกตะกอน+dialysis	118800	205.20	578.94	49.80
ทำแห้งแบบเยือกแข็ง	24633	145.09	169.78	10.32

2. การวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของโปรตีนผสมในซีรั่มของน้ำยางโปรตีนต่ำ

น้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้ ได้จากการบ่มน้ำยางร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 500 ยูนิต ต่อน้ำยาง 100 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเอาชั้นซีรั่มออกมาวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE อย่างไรก็ตาม ชุดการทดลองควบคุมก็ได้ดำเนินการควบคู่กันไปจำนวน 2 ชุดการทดลอง นั่นคือน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์และน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์ร่วมกับ SDS ความเข้มข้น 0.2% (w/v) เมื่อผ่านการวิเคราะห์แล้ว ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โปรตีนบางส่วนได้หายไปหรือลดลงภายหลังจากการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไป ยกตัวอย่างเช่นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 14 และ 50 kDa ในขณะที่การเติมเอนไซม์ร่วมกับสาร SDS นั้นกลับพบว่าเอนไซม์ไม่สามารถทำงานเพื่อย่อยโปรตีนได้ ดังนั้นจึงยังคงตรวจพบแถบโปรตีนดังเดิม



ภาพที่ 3 แสดงเอนไซม์โปรติเอสผงที่ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10



ภาพที่ 4 แสดงการตรวจสอบโปรตีนในน้ำยางพาราโปรตีนต่ำด้วยเทคนิค SDS-PAGE
หมายเหตุ: CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์และสาร SDS
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส
SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสร่วมกับสาร SDS (0.2% w/v)

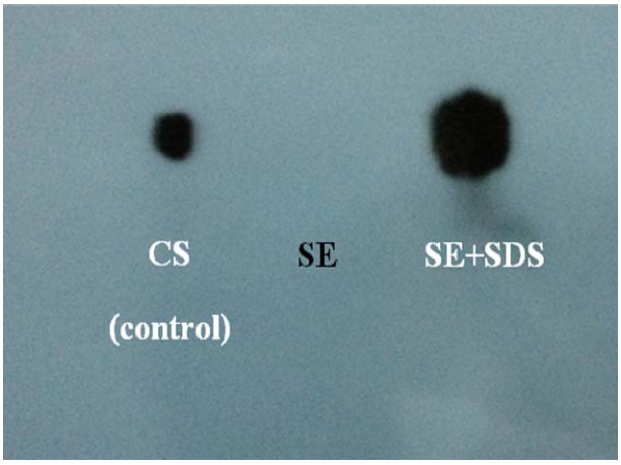
3. การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot

งานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค Western blot ในการวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้จำนวน 4 ขนิด ได้แก่ Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) Acidic protein (Hev b5) และ Hevein (Hev b6.02) ในน้ำยางพาราโปรตีนต่ำ เปรียบเทียบกับอีก2 ชุดการทดลอง คือน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์และน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์ร่วมกับ SDS ความเข้มข้น 0.2% (w/v) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 5-8 ซึ่งก็พบว่าในกรณีของโปรตีน REF และ SRPP นั้น จะตรวจพบโปรตีนดังกล่าวเฉพาะในตัวอย่างน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์โปรติเอสและน้ำยางพาราที่เติมโปรติเอสร่วมกับสาร SDS แต่ในขณะที่น้ำยางพาราที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสเพียงอย่างเดียวนั้น จะไม่สามารถตรวจพบโปรตีนภูมิแพ้ทั้งสองชนิดนี้หลงเหลืออยู่ แต่เมื่อพิจารณาการศึกษาโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Acidic protein แล้วนั้นกลับพบผลการศึกษาที่แตกต่างกันเล็กน้อย นั่นคือตรวจพบ Acidic protein เพียงในตัวอย่างน้ำยางพาราสดเท่านั้น แต่ไม่พบโปรตีน

ชนิดนี้ในตัวอย่างอื่นๆ เลย ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าโปรติเอสช่วยกำจัด Acidic protein ด้วยเช่นกัน และสุดท้ายกรณีของการศึกษาโปรตีนชนิด Hevein ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ายังคงตรวจพบโปรตีนชนิดนี้ในตัวอย่างน้ำยางพาราทุกชุดการทดลอง นั้นอาจหมายความว่าโปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* นี้ไม่สามารถโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein นี้ได้

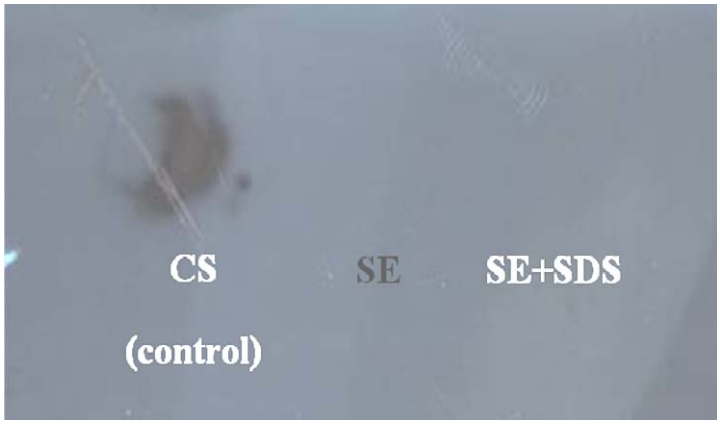
ภาพที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1)

หมายเหตุ: CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส
SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)



ภาพที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3)

หมายเหตุ: CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส
SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)

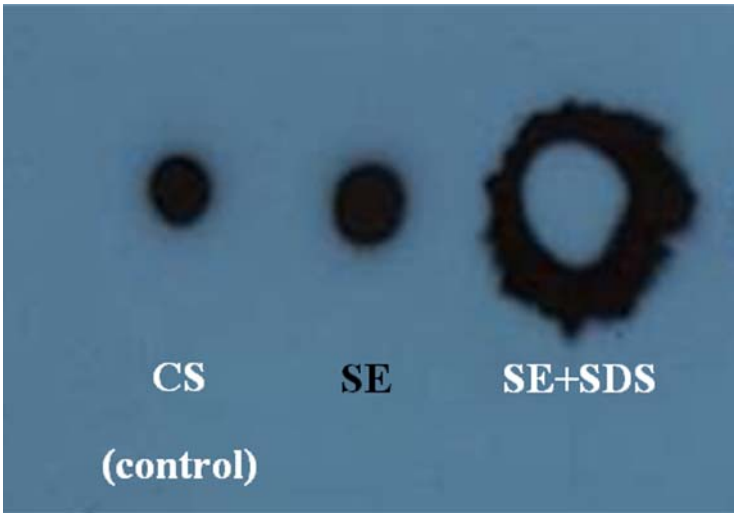


ภาพที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Acidic protein (Hev b5)

หมายเหตุ: CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด

SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส

SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)



ภาพที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein (Hev b6.02)

หมายเหตุ: CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด

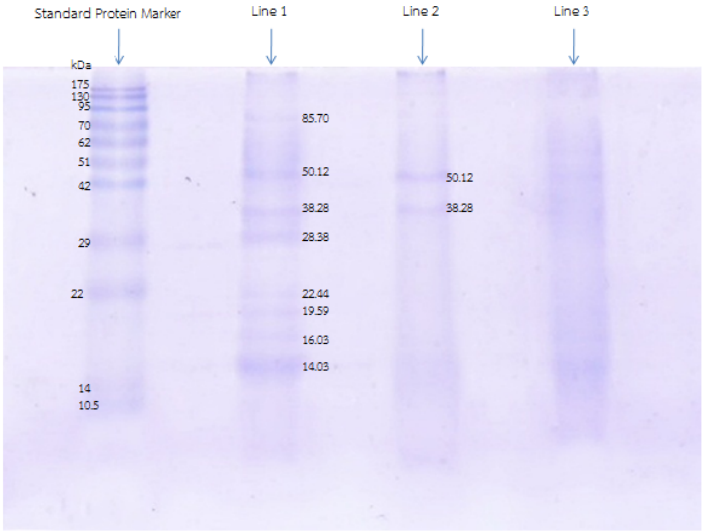
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส

SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)

4. การวิเคราะห์โปรตีนผสมในซีรั่มของน้ำยางพาราโปรตีนต่ำด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis

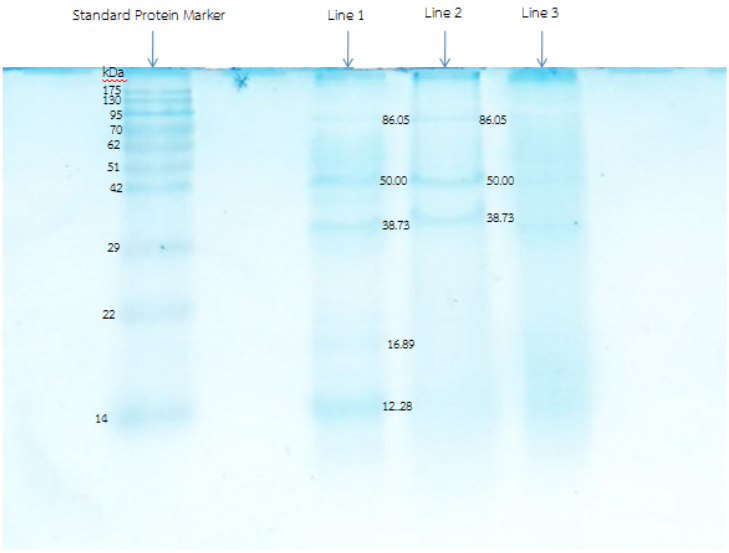
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนมิติที่ 1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ในการวิเคราะห์การกระจายตัวของโปรตีนผสมจากตัวอย่างแหล่งต่างๆ ด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ชัดเจนที่สุด ซึ่งสภาวะแรกที่ได้ทำการศึกษาคือ เทคนิคการย้อมสีโปรตีน ซึ่งเปรียบเทียบกันทั้งสิ้น 3 เทคนิค พบว่าภายหลังจากศึกษาโดยใช้โปรตีนปริมาณ 40 μg ในเจลความเข้มข้น 12.5% นั้นการย้อมด้วยวิธีการ coomassie brilliant blue R-250 จะปรากฏแถบโปรตีนปรากฏมากที่สุดจำนวน 8 แถบ ได้แก่ 85.70, 50.12, 38.28, 28.38, 22.44, 19.59, 16.03 และ 14.03 kDa ในตัวอย่างน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์ (CS) ส่วนน้ำยางพาราที่เติมเพียงเอนไซม์โปรติเอส (SE) ปรากฏเพียง 2 แถบ ได้แก่ 50.12 และ 38.28 kDa ในขณะที่น้ำยางพาราที่เติมทั้งเอนไซม์โปรติเอสและ SDS นั้น ไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจนเห็นเป็นเพียงรอยลากยาวเท่านั้น ซึ่งโดยรวมแล้วจะเห็นว่าเทคนิคการย้อมสีดังกล่าวให้ผลของแถบโปรตีนที่ค่อนข้างชัดเจนมาก (ภาพที่ 9) และเมื่อเทียบกับการย้อมด้วยวิธี fast and sensitive colloidal coomassie G-250 และ silver staining พบว่าการย้อมด้วย fast and sensitive colloidal coomassie G-250 ให้แถบของโปรตีนมากที่สุดในตัวอย่างน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์ (CS) เพียง 5 แถบ ได้แก่ 86.05, 50.00, 38.73, 16.89 และ 12.28 kDa ส่วนน้ำยางพาราที่เติมเพียงเอนไซม์โปรติเอส (SE) ปรากฏเพียง 3 แถบ ได้แก่ 86.05, 50.00 และ 38.73 kDa และน้ำยางพาราที่เติมทั้งเอนไซม์โปรติเอสและ SDS ก็ยังคงเห็นเพียงรอยลากยาวของโปรตีนเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 10) ส่วนกรณีการย้อมด้วย silver staining นั้นก็พบว่าโปรตีนทั้ง 3 ตัวอย่าง ไม่สามารถระบุแถบของโปรตีนได้ชัดเจน (ภาพที่ 11)



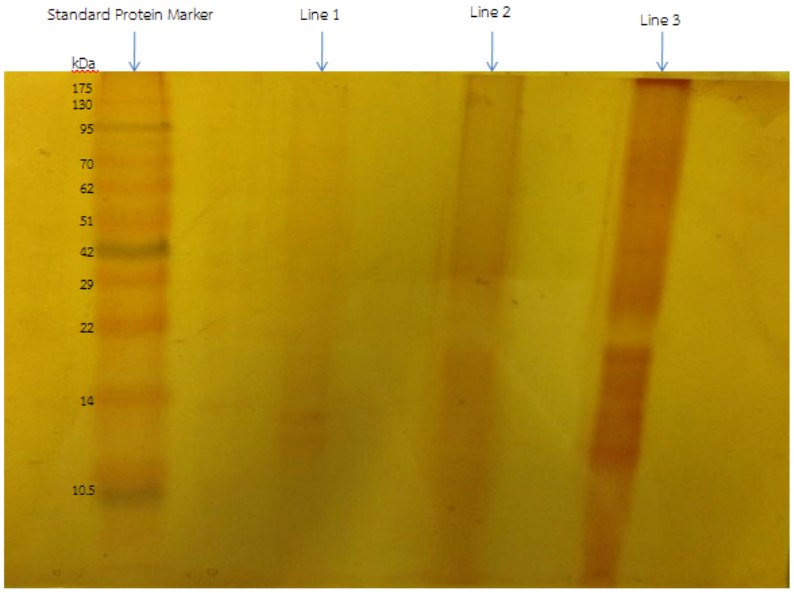
ภาพที่ 9 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้การย้อมสีด้วยวิธี coomassie brilliant blue R -250 ในเจล 12.5% ด้วยปริมาณโปรตีน 40 μg/well

หมายเหตุ: Line 1 คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด (CS)
Line 2 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส (SE)
Line 3 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)



ภาพที่ 10 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้การย้อมสีด้วยวิธี fast and sensitive colloidal coomassie G-250 ในเจล 12.5% ด้วยปริมาณโปรตีน 40 μg/well

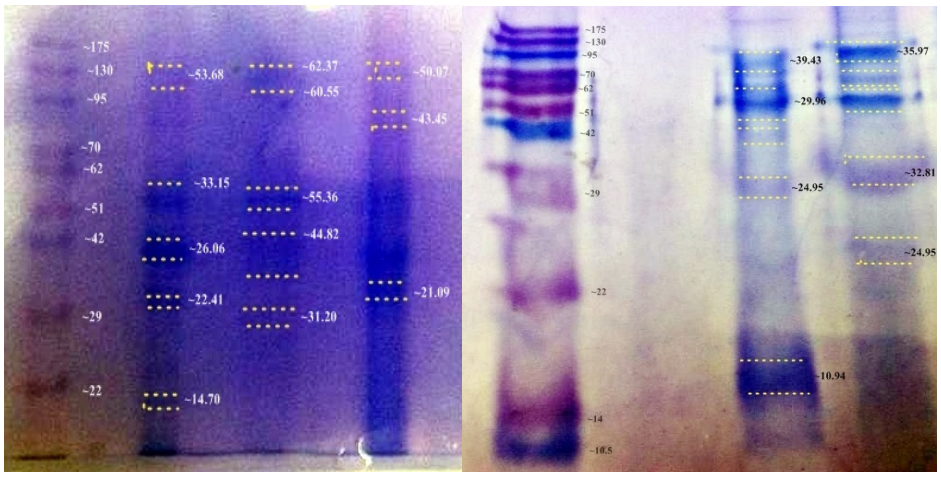
หมายเหตุ: Line 1 คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด (CS)
Line 2 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส (SE)
Line 3 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)



ภาพที่ 11 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้การย้อมสีด้วยวิธี silver staining ในเจล 12.5% ด้วยปริมาณโปรตีน 40 μg/well

หมายเหตุ: Line 1 คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด (CS)
Line 2 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส (SE)
Line 3 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)

เมื่อได้ทราบเทคนิคการย้อมสีที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนแล้ว จึงได้ทำการศึกษาสภาวะที่สองนั่นคือความเข้มข้นของ polycrylamide gel ซึ่งจากปรกติที่ใช้ในระดับ 12.5% ก็ได้ทดสอบเพิ่มเติมที่ระดับความเข้มข้น 7.5% และ 15% ผลการทดสอบก็แสดงดังภาพที่ 12(A) และ 12(B) ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าความเข้มข้นเจลที่ 7.5% แม้แถบของโปรตีนที่ได้จะมีการแยกออกจากกันได้กว้างขึ้น แต่พบว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็กนั้น หลายตัวได้หลุดออกจากแผนเจล โดยสังเกตจากโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่าง ซึ่งในที่นี้โปรตีนภูมิแพ้ที่ต้องการศึกษาจะมีขนาดที่ต่ำกว่า 70 kDa ลงมา ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นนี้จึงไม่น่าเหมาะสมนักในการศึกษาขั้นต่อไป ส่วนการใช้ความเข้มข้นของเจลที่ 15% พบว่าโปรตีนขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ไม่สุดขอบเจลทำให้แถบของโปรตีนมีการอัดตัวเป็นแถบขนาดใหญ่ไม่เกิดการแยกของโปรตีนหลายๆ แถบเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นของเจลระดับ 12.5% (ภาพ 9) ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้น 12.5% นี้จึงน่าจะเป็นความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมที่สุดในการแยกโปรตีนผสมจากน้ำจากน้ำยางพารา และเป็นพื้นฐานสำคัญเพื่อใช้ศึกษาโปรตีนด้วยวิธี 2D-gel electrophoresis ต่อไป



A B

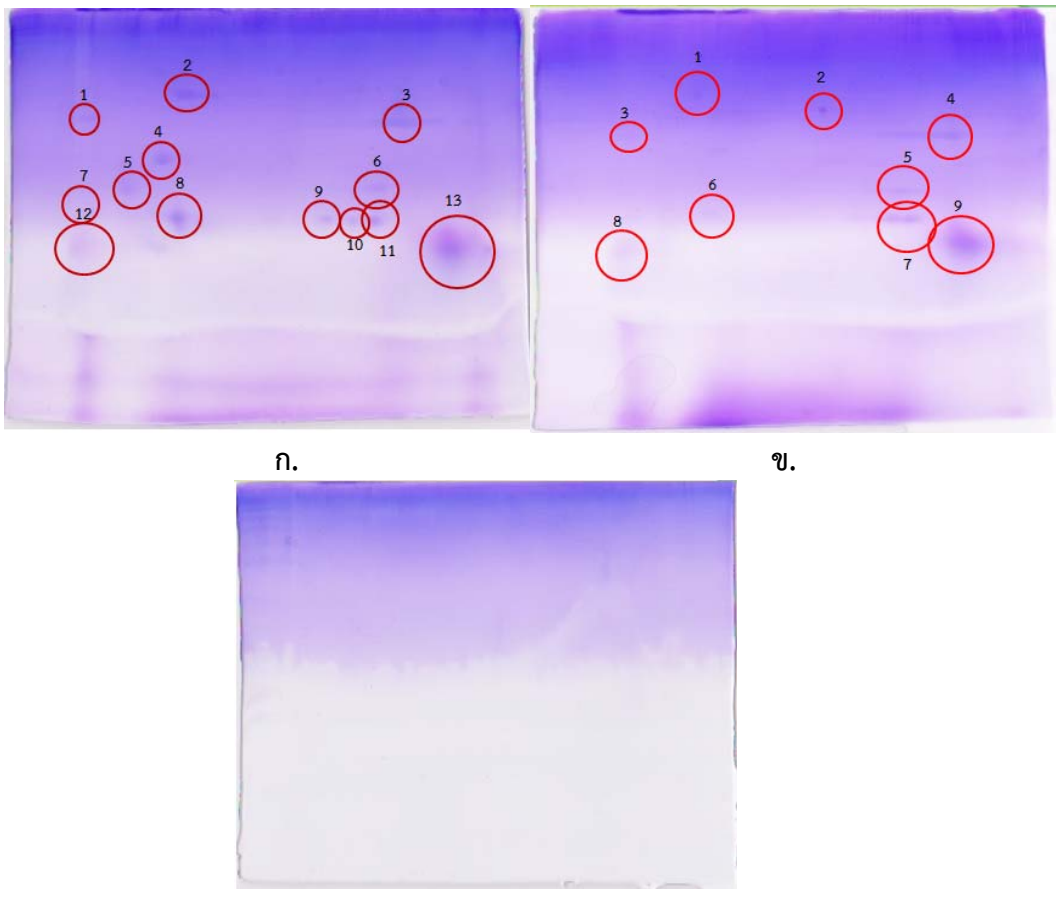
ภาพที่ 12 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และเทคนิคสีย้อมย้อม coomassie brilliant blue R-250 ในเจลเข้มข้น 7.5% (A) และ 15% (B) ตามลำดับด้วยปริมาณโปรตีน 40 ไมโครกรัม

4.2 การศึกษารูปแบบของโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค 2D-gel electrophoresis

ภายหลังจากทราบถึงเทคนิคการย้อมสีและความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมในการศึกษาโปรตีนผสมในน้ำยางพาราแล้ว จึงได้นำสภาวะเหล่านี้มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป โดยได้ทดสอบนำตัวอย่างซีรั่มจากน้ำยางพาราทั้ง 3 ชุดการทดลองมาทำการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนผสมด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis ผลการศึกษาพบว่าการแยกโปรตีนตามค่า pI ในขั้นตอน IEF (IPG strip pH 3-10 NL ขนาด 7 cm) แล้วตามด้วยการแยกโปรตีนตามขนาดโมเลกุลด้วยการทำ SDS-PAGE (ready gel solution 12.5%T, 2.7%C กระแสไฟฟ้า 20 mA/gel ความต่างศักย์ 150 V เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที

บัฟเฟอร์พีเอช 8.3) และสุดท้ายจึงย้อมสีโปรตีนด้วยสี coomassie brilliant blue R-250 ได้ผลการวิเคราะห์ดังภาพที่ 13-15 ซึ่งโดยรวมแล้วการวิเคราะห์ที่ได้ยังไม่มีที่พึงพอใจนัก เนื่องจากจุดโปรตีนไม่มีความคมชัดเท่าที่ควร ทำให้ยากในการประมวลผล ดังนั้นในงานวิจัยระยะที่ปีสองจึงต้องเน้นด้านเทคนิคการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D-gel นี้ให้มากขึ้น ก่อนที่นำไปประมวลผลในขั้น MALDI-TOF MS ต่อไป

อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ในครั้งนี้ก็แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างซีรั่มจากน้ำยางพาราสดปรากฏจุดโปรตีนจำนวน 13 จุด (ภาพที่ 13) ซึ่งตำแหน่งของจุดโปรตีนเหล่านี้มีการกระจายตัวอยู่ในช่วง pH 3-10 โดยจุดโปรตีนที่ 2, 8, 4, 5, 7, 1 และ 12 กระจายตัวอยู่ในบริเวณที่ pH เป็นกรด ส่วนจุดโปรตีนที่ 9, 10, 11, 6, 3 และ 13 กระจายตัวอยู่ในบริเวณที่ pH เป็นเบส ในขณะที่ตัวอย่างซีรั่มที่ผ่านการเติมเอนไซม์โปรติเอสนั้นก็พบว่าปรากฏจุดโปรตีนที่น้อยกว่าและจางกว่า (ภาพที่ 14) ซึ่งเป็นไปตามคาดและสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE นอกจากนี้ตำแหน่งของโปรตีนแต่ละจุดยังสอดคล้องกับตัวอย่างซีรั่มจากน้ำยางพาราสดอีกด้วย แต่ตัวอย่างซีรั่มที่เติมเอนไซม์ร่วมกับ SDS นั้นกลับไม่ปรากฏจุดโปรตีน (ภาพที่ 15) ซึ่งก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเกิดจากการที่ไม่มีโปรตีนหลงเหลืออยู่หรือเกิดจากปัญหาเชิงเทคนิค จึงต้องทำการศึกษาต่อไปในแผนระยะปีที่สอง



ก. ข.

ค.

ภาพที่ 13 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราสด (CS) (ภาพ ก) น้ำยางพาราที่เติมด้วยเอนไซม์โปรติเอส (SE) (ภาพ ข) และ น้ำยางพาราที่เติมด้วยเอนไซม์โปรติเอสร่วมกับสาร SDS (SE+SDS)ด้วยวิธี 2D-gel electrophoresis (ภาพ ค)

วิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้นครั้งนี้ก็ยังคงสามารถนำมาใช้งานได้สะดวกดังเช่นทุกครั้งที่ผ่านมา แต่ประเด็นปัญหาที่ยังคงพบคือ อายุการเก็บรักษาของเอนไซม์ผง ที่พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงตลอดเวลา แม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็นผลึกน้ำแข็งจากความชื้นที่หลงเหลืออยู่ในเอนไซม์ผงซึ่งจะทำลายโครงสร้างของโปรตีน รวมถึงสภาวะออกซิเดชั่นที่เกิดกับโมเลกุลโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจเกิดกับกรดอะมิโน cysteine ดังนั้นการทดลองนำสารที่มีคุณสมบัติยืดอายุการเก็บรักษาของเอนไซม์มาผสมลงในเอนไซม์โปรติเอสนี้จึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง สารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้แก่ สารกลุ่ม cryoprotectant (ลดการเกิดผลึกน้ำแข็ง) สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อน สารกลุ่ม Metal chelator (คงสภาพโปรตีนในสภาวะ Reduced) และ reducing agent (ป้องกันโมเลกุลโปรตีนจากสภาวะออกซิเดชั่น) อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์จากขั้นตอนการเตรียมโปรติเอสผงนี้ ก็จะเห็นได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ถูกเก็บเกี่ยวได้ในแต่ละขั้นตอนจะลดลง ในขั้นตอนแรกของการตกตะกอนโปรตีนและไดอะไลซีสนั้น คาดว่าที่เก็บเกี่ยวได้น้อยอาจจะเนื่องจากประสิทธิภาพการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนโปรตีนทำให้เก็บได้ไม่หมด ครั้งต่อไปสามารถปรับปรุงเทคนิคการเก็บตะกอนด้วยการกรองแทนการปั่นเหวี่ยง แต่ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็งก็ทำให้กิจกรรมโปรติเอสลดลงไปอย่างมากเช่นกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้ว ผู้วิจัยลงความเห็นว่าขั้นตอนนี้อาจจะไม่จำเป็นต่อไป เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ไม่สามารถควบคุมได้ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นส่งผลเสียต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทั้งยังใช้เวลาและเครื่องมือราคาสูง กระทบต่อต้นทุนการผลิต ทางออกที่ผู้วิจัยเสนอคือ ให้เตรียมเอนไซม์โปรติเอสในรูปสารละลายเอนไซม์เข้มข้นแทน นั่นคือเมื่อผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนเรียบร้อยแล้ว ก็ทำการละลายกลับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม พร้อมทั้งเติมสารกลุ่มต่างๆ ที่มีคุณสมบัติยืดอายุการเก็บรักษาแทน ด้วยกระบวนการเช่นนี้คาดว่าจะทำให้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น

โปรตีนภูมิแพ้ชนิด REF ได้เคยถูกตรวจสอบมาแล้วในงานวิจัย 54500045 (การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ) โดยในครั้งนั้นได้พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ MR10 นี้สามารถกำจัด REF ได้ แต่ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แสดงเพิ่มเติมถึงผลของการเติมสาร SDS (Sodium dodesyl sulfate) ที่มีต่อประสิทธิภาพการกำจัด REF เนื่องจากพบว่างานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมาได้มีการเติมสารชนิดนี้ร่วมกับเอนไซม์เพื่อลดปริมาณโปรตีนในเนื้อยางพาราลง (ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์, 2540, Klinklai et al., 2003; Klinklai et al., 2004; Rattanasom et al., 2005) ซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่าการเติมสาร SDS ลงในน้ำยางพาราร่วมกับการเติมเอนไซม์โปรติเอส ทำให้ช่วยลดปริมาณโปรตีนในส่วนเนื้อยางลงได้จริงเช่นเดียวกับการเติมเพียงเอนไซม์อย่างเดียว (ไม่ได้แสดงผลการทดลองในรายงาน) อย่างไรก็ตาม แม้จะลดปริมาณโปรตีนได้ใกล้เคียงกัน แต่กลับพบว่ายังคงมีโปรตีนภูมิแพ้ REF หลงเหลืออยู่เมื่อเติม SDS ร่วมด้วย ผู้วิจัยคาดว่าสาร SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวนี้ มีกลไกในการกำจัดโปรตีนคือเพียงช่วยละลายโปรตีนให้หลุดออกมาจากเนื้อยางเพิ่มมากขึ้นเท่านั้น ไม่ได้ช่วยในการย่อยโมเลกุลโปรตีนดังเช่นกลไกการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส อีกทั้ง SDS ยังทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพ (Denature) และไม่สามารถทำงานได้ในที่สุด ดังนั้นหากต้องการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยกลไกการย่อยโมเลกุลแล้ว ไม่ควรเติมสาร SDS เข้าร่วมในกระบวนการ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนภูมิจำนวน 4 ชนิด ด้วยเทคนิค Western blot ได้แก่ REF (Hev b1), SRPP (Hev b3), Acidic protein (Hev b5) และ Hevein (Hev b6.02) โดยสองชนิดแรกยึดเกาะอยู่บนพื้นผิวของเนื้อยางทั้งอนุภาคขนาดใหญ่และอนุภาคขนาดเล็ก ส่วน Acidic protein ละลายอยู่ในชั้น C serum ในขณะที่ Hevein จะพบอยู่ในส่วนของชั้น B-serum (Yeang, 2002; Yeang, 2004) ทั้งสี่ชนิดนี้ล้วน

เป็นโปรตีนที่ก่ออาการภูมิแพ้ชนิดรุนแรง (High allergenicity) (Yeang, 2004) ดังนั้นผลงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการสร้างความมั่นใจในการนำน้ำยางพาราโปรตีนต่ำนี้ไปใช้ประโยชน์มากขึ้น

มีนักวิจัยบางกลุ่มที่เสนอให้มีการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราด้วยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมโดยการปรับปรุงสายพันธุ์ต้นยางพาราไม่ให้สังเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้เหล่านี้ แต่ในความเป็นจริงนั้นอาจจะเป็นไปได้ยากในทางปฏิบัติ เพราะโปรตีนที่สำคัญบางชนิด ได้แก่ REF และ SRPP นั้นมีบทบาทในการช่วยสังเคราะห์เนื้อยางในต้นยางพารา ดังนั้นหากปราศจากโปรตีนเหล่านี้แล้วก็จะไม่สามารถผลิตยางพาราได้ ผู้วิจัยจึงคิดว่าวิธีการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์น่าจะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดในขณะนี้

โปรตีนภูมิแพ้ชนิด Acidic protein (Hev b5) ก็เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญอีกเช่น เนื่องจากมีความสามารถทนต่อความร้อนได้เป็นอย่างดี แม้จะนำไปผ่านความร้อนในหม้อนึ่งความดันไอก็ยังคงแสดงความเป็นสารก่อภูมิแพ้ได้เช่นเดิม (Sussman et al., 2002) ซึ่งงานวิจัยนี้ก็ได้ยืนยันเป็นที่เรียบร้อยแล้วว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถกำจัดโปรตีนชนิดนี้ได้ แต่งานวิจัยนี้ก็ได้พบข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* นั่นคือเอนไซม์ไม่มีความจำเพาะ (specificity) ต่อโปรตีนชนิด Hevein (Hev b6.02) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากโมเลกุลของ hevein มีขนาดเพียงประมาณ 4-5 kDa ซึ่งจัดว่าเป็นโปรตีนขนาดเล็ก จึงยังคงหลงเหลืออยู่ภายหลังการบ่มร่วมกับเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามในแง่ของกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากยางพารานั้น เราอาจสามารถกำจัดโปรตีนชนิดนี้ออกไปได้ด้วยการล้างด้วยน้ำเปล่าเพื่อละลายโปรตีนชนิดนี้ให้ออกไป

ในการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis ครั้งนี้ มีการใช้โปรตีนปริมาณ 40 μg ต่อช่องเจล ซึ่งเป็นปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างสูง เหมาะสำหรับเทคนิคการย้อมสีด้วย coomassie brilliant blue R-250 สามารถทำให้เห็นผลได้ชัดเจนและเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งต่างจากการย้อมอีก 2 วิธีที่เหลือ ที่พบว่าจำนวนแถบของโปรตีนลดลงหรือไม่ปรากฏ อาจเนื่องจากการย้อมทั้ง 2 วิธี โดยปกติแล้วต้องใช้ปริมาณโปรตีนต่อช่องเจลในปริมาณที่ต่ำกว่าจึงจะทำให้เห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจนขึ้น (Dyballa and Metzger, 2009; Anoname, 1994) หากปริมาณโปรตีนสูงเกินไปจะทำให้เห็นแถบโปรตีนไม่ชัดเจนในลักษณะที่เป็นแถบกว้างหรือลากยาว อันเนื่องมาจากมีความไว (sensitivity) ต่อสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนด้วย หากพิจารณาเฉพาะเทคนิค silver staining จะพบว่าสีของพื้นหลังค่อนข้างเข้มซึ่งอาจเกิดขึ้นถ้าใช้น้ำที่บริสุทธิ์ไม่พอ นอกจากนี้สารเมอร์แคปโตเอทานอลที่หลงเหลืออยู่ในเจลหลังการทำอิเลคโตรโฟรีซิส สามารถไปรบกวนการย้อมจึงทำให้โปรตีนบางชนิดไม่ติดสีย้อมหรือติดสีย้อมจางได้ ซึ่งไม่เฉพาะแต่โปรตีนเท่านั้นที่ติดสีย้อม DNA Lipopolysaccharide และ polysaccharide ก็สามารถติดสีย้อมนี้ด้วย จึงทำให้แถบที่เห็นในบางครั้งไม่สามารถบ่งชี้ได้แน่ชัดว่าเป็นโปรตีน (อาภัสรา, 2545) อย่างไรก็ตามถ้ามีการปรับปริมาณโปรตีนที่ใช้ต่อช่องเจล ให้มีปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ เพื่อให้เหมาะสมกับการย้อมทั้ง 2 วิธีนี้ ก็น่าจะให้ผลที่ดีเมื่อเทียบกับวิธี coomassie brilliant blue R-250 จากผลการทดลองในเบื้องต้นนี้พบว่า วิธี coomassie brilliant blue R-250 ยังมีความเหมาะสมในด้านอื่นๆ สำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนในเจลทั้งด้านการเป็นเทคนิคที่มีราคาถูก ไม่ซับซ้อน ทำได้ง่าย และปลอดภัยต่อผู้ทำการวิจัย (อาภัสสรา, 2545) ผลในครั้งนี้จะนำไปเป็นพื้นฐานในการวิเคราะห์โปรตีนขั้นสูงด้วยเทคนิค 2D-gel ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป

โปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ ที่พบในน้ำยางพาราสดนั้น ปัจจุบันได้มีผู้ศึกษาและรายงานมากมาย เทคนิคและเครื่องมือที่นิยมใช้ในการศึกษาคือเทคนิค 2D-gel electrophoresis นั่นเอง (Posch et al., 1997; Xiang et al., 2012) ที่ซึ่งสามารถแยกโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกันออกจากกันได้ จากนั้นจึงทำการศึกษาถึงลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนที่แยกได้แต่ละชนิดอีกครั้งด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ซึ่งข้อมูลที่ได้จากขั้นตอนนี้ก็จะถูกนำไปเทียบกับฐานข้อมูลอีกครั้งเพื่อระบุว่าเป็นโปรตีนชนิดใด ด้วยกระบวนการ

นี้ก็จะทำให้ทราบถึงการมีอยู่หรือหลงเหลือของโปรตีนแต่ละชนิดได้ แต่ในงานวิจัยระยะปีที่ 1 นี้ได้เสนอไว้เพียงการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis เท่านั้น แล้วจึงนำสภาวะที่ศึกษาได้เหล่านี้มาใช้สำหรับการวิเคราะห์ขั้นตอนที่เหลือในแผนงานระยะปีที่ 2 ต่อไป อย่างไรก็ตามในเบื้องต้น ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อทดสอบระบบเบื้องต้นในการแยกโปรตีนออกด้วยเครื่อง 2D-gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่าโปรตีนติดสีได้อย่างดี แต่จำนวนจุด (ชนิด) โปรตีนที่พบในน้ำยางพาราสดมีค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับรายงานวิจัยอื่นๆ ที่ตรวจพบกว่า 50 จุด (Xiang et al., 2012) ซึ่งผู้วิจัยสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากโปรตีนบางส่วนได้มีการเสียสภาพหรือสลายไประหว่างการเก็บรักษาและกระบวนการเตรียมโปรตีนขั้นตอนต่างๆ ก่อนนำมาวิเคราะห์ ดังนั้นในการดำเนินงานในระยะปีที่ 2 นี้ จะต้องให้ความสำคัญกับประเด็นเหล่านี้ให้มากขึ้น

สรุปผลการวิจัย

จากการใช้เทคนิค Western blot ในการตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์โปรติเอสผงที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในน้ำยางพาราสด พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ แต่ไม่สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein (Hev b6.02) ส่วนการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ นั้น จะได้ทำการตรวจสอบต่อไปด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis ที่ซึ่งเบื้องต้นพบว่าสีย้อมโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดคือสี coomassie brilliant blue R-250 และความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์โปรตีนจากน้ำยางพาราสดคือที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

หากวิเคราะห์ว่าความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อยอดนั้นจะต้องขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัย นั่นคือ ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ และต้นทุนการผลิต ก็จะพบว่างานวิจัยนี้ยังมีข้อด้อยในด้านต้นทุนของการผลิตเอนไซม์ ที่ยังคงสูง ดังนั้นควรมีการศึกษาพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์ต้นทุนต่ำในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มโอกาสแข่งขันในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยก็ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยแห่งชาติ:ยางพารา ในการอนุมัติทุนวิจัยในปีงบประมาณ 2556 ภายใต้โครงการคุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 (ปีที่ 2) เพื่อศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ของเอนไซม์โปรติเอส และโครงการการพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสต้นทุนต่ำสำหรับผลิตน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ คาดว่าจะทำให้โอกาสในการนำผลงานวิจัยไปใช้ในเชิงพาณิชย์มีมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ และ พรสิทธิ์ วงศ์บุญฑริก. “การเตรียมและสมบัติบางประการของยางโปรตีนต่ำ”. *วารสารสงขลานครินทร์*, 19(2540): 223-229.

อาภัสสรา ชูเทศะ. (2545). *เอกสารประกอบการบรรยายการอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิค Electrophoresis ในงานวิจัย คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.* กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Beezhold, D.H., Kostyal, D.A. and Tomazic-Jezic, V.J. 2002. Measurement of latex proteins and assessment of latex protein exposure. Methods 27: 46-51.

Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote., and Lumyong, S. (2002). Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally Fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia* 28: 241-245.

Dyballa, N., and S. Metzger. (2009) Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. *Journal of Visualized Experiments, 30*(e1431), 1-5.

Klinklai, W., Kawahara, S., Mizumo, T., Yoshizawa, M., sakdapipanich, J.T., Isono, Y., and Ohno, H. 2003. Depolymerization and ionic conductivity of enzymatically deproteinized natural rubber having epoxy group. *European Polymer Journal* 39:1707-1712.

Klinklai, W., Kawahara, S., Mizumo, T., Yoshizawa, M., Yoshizawa, M., Isono, Y. and ohno, H. 2004. Ionic conductivity of highly deproteinized natural rubber having epoxy group mixed with alkali metal salts. Solid State Ionics 168: 131-136.

Rattanasom, N., Thammasiripong, U. and Suchiva, K. 2005. Mechanical properties of deproteinized natural rubber in comparison with synthetic *cis*-1,4 polyisoprene vulcanizates: gum and black-filled vulcanizates. *Journal of Applied Polymer Science* 97: 1139-1144.

Palosuo, T. 1997. Latex allergens. *Rev. fr. Allergol*. 37: 1184-1187.

Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.

Posch, A., Chen, Z, Wheeler, C., Dunn, M.J., Raulf-Heimsoth, M. and Baur, X. 1997. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol*. 99: 385-395.

Raulf-Heimsoth, M., Posch, A. Chen, Z. and Baur, X. 1997. Cross-reactivity between natural rubber latex and food allergens. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 4: 169-173.

Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Kurup, V.P. 2002. Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 110: S33-S39.

Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Liss, G. 2002. Latex allergy: historical perspective. *Methods* 27: 3-9.

Tomazic, V.J. and Lucas, A.D. 2002. Protein and allergen assays for natural rubber latex products. *J Allergy Clin Immunol*. 110: S40-S46.

Tomazic, V.J., Withrow, T.J. and Hamilton, R.G. 1995. Characterization of the allergen(s) in latex protein extracts. *J Allergy Clin Immunol*. 95: 635-642.

Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A., and Shono, M. 1995. One of the rubber latex allergens is a lysozyme. *J Allergy Clin Immunol*. 96: 677-686.

Yeang, H.Y., Arif, S.A.M., Yusof, F., and Sunderasan, E. 2002. Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods* 27: 32–45.

Yeang, H., Arif, S.A.M. Raulf-Heimsoth, M., Loke, Y., Sander, I., Sulong, S.H., Lau, C. and Hamilton, R.G. 2004. Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *J Allergy Clin Immunol*. 114: 593-598.

Ylitalo, L., Alenius, H., Turjanmaa, K., Palosuo, T., and Reunala, T. 1998. IgE antibodies to prohevein, and rubber elongation factor in children with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 102: 659-664.

Xiang, Q, Xia, K., Dai, L., Kang, G., Li, Y., Nie, Z., Duan, C. and Zeng, R. 2012. Proteome analysis of the large and the small rubber particles of *Hevea brasilliensis* using 2D-DIGE. Plant Physiology and Biochemistry 60: 207-213.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผน กิจกรรมที่ดำเนินการ และผลที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	**กิจกรรม**	**กิจกรรมที่ดำเนินการ**	**ผลที่ได้รับ**
เพื่อศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในยางโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นโดยโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10	เตรียมเอนไซม์โปรติเอสผง	เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและผ่านขั้นตอนการทำเอนไซม์ผง	ได้เอนไซม์โปรติเอสผงสำหรับใช้ตลอดงานวิจัย
	เตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำ	บ่มเอนไซม์โปรติเอสร่วมกับน้ำยางพาราสด	ได้น้ำยางพาราโปรตีนต่ำ
	วิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot	วิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot	ทราบว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hev b1, Hev b3 และ Hev b5 ได้
	วิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis (หาสภาวะที่เหมาะสม)	เปรียบเทียบเทคนิคการย้อมสีโปรตีนและเปรียบเทียบความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมในการแยกโปรตีน	ทราบว่าสีย้อมโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดคือสี coomassie brilliant blue R-250 และความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์โปรตีนจากน้ำยางพาราสดคือที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ภาคผนวก 3
ร่างบทความงานวิจัย

คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10

Biological and physical properties of deproteinized rubber prepared by *Bacillus subtilis* MR10 protease

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน[1*], สุทธิพร นันติ[1], ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์[2], เอกวิทย์ ตรีเนตร[3]

[1] สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
[2] สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
[3] สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

*Corresponding author: pairote@mju.ac.th

บทคัดย่อ

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 มีศักยภาพในการใช้ลดปริมาณโปรตีนของยางพาราเพื่อผลิตเป็นยางพาราโปรตีนต่ำ แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานยืนยันได้ว่าโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในน้ำยางพาราสดได้ถูกกำจัดออกไปหรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เสนอให้ทำการตรวจสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot และ 2D-gel electrophoresis ผลการทดสอบพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ แต่ไม่สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein (Hev b6.02) ส่วนการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ นั้น จะทำการตรวจสอบต่อไปด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis ที่ซึ่งเบื้องต้นพบว่าสีย้อมโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดคือสี coomassie brilliant blue R-250 และความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์โปรตีนจากน้ำยางพาราสดคือที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ABSTRACT

Protease enzyme produced from *Bacillus subtilis* MR10 has shown a potential in decreasing of para rubber proteins for deproteinized rubber production. However, no evidence has been shown that the allergenic proteins in natural rubber latex have been degraded. Thus, detection of the remaining allergenic proteins was introduced in this study using Western blot and 2D-gel electrophoresis technique. The results revealed that high risk allergenic proteins; i.e. rubber elongation factor (REF; Hev b1), small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) and acidic protein (Hev b5) were degraded, while hevein (Hev b6.02) could not be destroyed. In case of the other allergenic proteins, they were further investigated using 2D-gel electrophoresis technique. It was preliminary found that the suitable protein staining technique was using coomassie brilliant blue R-250 and the optimal polyacrylamide gel concentration was at 12.5% (w/v).

คำนำ

โปรตีนหลายชนิดที่อยู่ในน้ำยางพาราสดสามารถก่อให้ เกิดอาการแพ้ (Allergy) ขึ้นแก่ผู้สวมใส่ผลิตยางพารา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถุงมือยาง โดยอาการแพ้นี้มีทั้งแบบเฉียบพลันและค่อยเป็นค่อยไป (ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์, 2540) อาการมีตั้งแต่เพียงระคายเคืองเมื่อสวมใส่ถุงมือ (Irritant contact dermatitis) ไปจนถึงอาการที่เรียกว่า anaphylaxis ซึ่งมีความรุนแรงมาก (Sussman et al., 2002) ดังนั้น ในกระบวนการผลิตจึงต้องกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกเสียก่อน วิธีการกำจัดโปรตีนมีตั้งแต่การล้างด้วยน้ำเปล่า แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกไปได้หมดเสียทีเดียว มีรายงานว่าโปรตีนบางชนิดในน้ำยางธรรมชาติสามารถถูกทำลายได้โดยการปรับสภาวะให้เป็นด่างแก่ เช่น การเติมแอมโมเนีย แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในน้ำยางจะทำให้เกิดผลกระทบต่อคุณสมบัติกายภาพของน้ำยางได้ (Moris and Lakin, 1995 อ้างโดย Perrella and Gaspari, 2002) ปัจจุบันวิธีที่ใช้กำจัดโปรตีน คือ การนำน้ำยางดิบไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนซีรัมทิ้งไป แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนส่วนที่เกาะกับอนุภาคยางออกไปได้ ซ้ำยังทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นเพิ่มขึ้นจาก 25 เปอร์เซ็นต์เป็น 50 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย (Perrella and Gaspari, 2002) ผู้วิจัยจึงได้เสนอวิธีการใช้เอนไซม์โปรติเอส (Proteases) เข้าช่วยในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางเนื่องจากสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้งในส่วน serum และ rubber phase โดยเอนไซม์โปรติเอสนี้ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* แต่อย่างไรก็ตามแม้โปรติเอสจะสามารถย่อยโปรตีนได้มากเพียงใด แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าโปรติเอสไม่มีความจำเพาะ (Specificity) ต่อโปรตีนภูมิแพ้ที่สนใจ ทำให้โปรตีนภูมิแพ้เหล่านี้ยังคงค้างอยู่ในน้ำยางพารา ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ข้อสงสัยดังกล่าวจึงควรมีการตรวจสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ภายหลังการบ่มน้ำยางพาราสดร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส

หากต้องการศึกษาถึงโปรตีนแต่ละชนิดทั้งเชิงคุณภาพและ/หรือปริมาณแล้ว พบว่าวิธีในเชิงหลักการของ electrophoresis (เช่น SDS-PAGE และ 2-dimensional electrophoresis) และ Immunoblotting (เช่น LEAP, RAST inhibition assay และ ELISA inhibition test) ได้รับความนิยมมากจากนักวิจัย (Raulf-Heimsoth et al., 1997; Breezhold et al., 2002; Tomazic-Jezic and Lucas, 2002) นอกจากนี้การใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประ กอบของโปรตีนก็มีรายงานด้วยเช่นกัน (Tomazic and Lucas, 2002) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้จะได้นำเสนอวิธีการตรวจสอบโปรตีนภูมิแพ้ที่หลงเหลืออยู่ในน้ำยางพาราหลังการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เทคนิค Western blot และ 2D-gel electrophoresis ซึ่งคาดว่าจะสามารถยืนยันประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์

Bacillus subtilis (MR10) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA)

2. น้ำยางพารา

ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง (สกย.) จังหวัดเชียงใหม่

3. การเตรียมโปรติเอสผงจากเชื้อ Bacillus subtilis

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในอาหารเหลว casein medium ปริมาณ 150 ml เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลายส่วนใส นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (80% Saturation) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนโปรตีนที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายกลับในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 15 ml จากนั้นทำการไดอะไลซีส (12 kDa cut-off) โดยแช่ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซีสไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง โปรติเอสผงที่ได้ให้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอสด้วยวิธีการที่อ้างอิงจาก Chantawannakul และคณะ (2002) และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ด้วยวิธี Lowry' s method และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ

4. การเตรียมน้ำยางพาราโปรตีนต่ำสำหรับใช้ในงานวิจัย

ผสมน้ำยางพาราสดกับน้ำกลั่นในสัดส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นเติมโปรติเอสในสัดส่วนโปรติเอส 500 ยูนิตต่อน้ำยางพารา 100 ml พร้อมทั้งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 45 °C 20 ชั่วโมง

5. การวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของโปรตีนผสมในซีรั่มของน้ำยางโปรตีนต่ำ

สำหรับการแยกโปรตีนตามขนาดจะใช้วิธี SDS-PAGE ในการวิเคราะห์ โดยใช้เจลสำเร็จรูป Amersham ECL Gel 12%, 10 wells โดยเตรียมสารละลาย 1x Electrode Running Buffer เติมลงใน Amersham ECL Gel Box ปริมาตร 180 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียมเจล โดยทำการชะเจลและใส่เจลลงใน Amersham ECL Gel Box ปิดฝาให้สนิท และเชื่อม Amersham ECL Gel Box กับ Power supply โดย Pre-run เจลเป็นเวลา 12 นาทีที่กำลังไฟฟ้า 150 V จากนั้นเปิดฝาเพื่อถอดหวีออกจากเจล เติม 1X Running Buffer ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงไป โดยใช้ตัวอย่าง 15 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย ตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร และสีย้อม 10 ไมโครลิตร ลงในแต่ละ well ทำการ Run gel เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่กำลังไฟฟ้า 150 V จากนั้นถอด เจลออกจาก Amersham ECL Gel Box ทำการย้อมสีเจลเป็นเวลา 5 นาที และล้างสีออกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6. การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot

นำน้ำยางโปรตีนต่ำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 30 นาที เพื่อแยกส่วนเนื้อยางและชั้นซีรั่ม ใช้หลอดหยดปลายแหลมเป็นอุปกรณ์ดูดเก็บรวบรวมส่วนซีรั่ม แล้วแบ่งเก็บไว้เป็นส่วนๆ(Aliquot) ในตู้แช่อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของโปรตีนระหว่างรอการวิเคราะห์ และทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) ในส่วนของชั้นซีรั่มด้วยวิธี Modified Lowry's method

7. การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการแช่ PVDF membrane ในเมทานอลเป็นเวลา 5 นาที และนำไปแช่ใน Transfer buffer อย่างน้อย 15 นาที หลังจากนั้นทำการหยดตัวอย่างซีรั่ม 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น membrane และรอจนกระทั่งแห้ง จากนั้นล้างด้วย TSB buffer นาน 10 นาที 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10-15 ml บ่มต่อด้วย non-fat milk ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่น PVDF ไปบ่มร่วมกับ Anti-latex antigen monoclonal antibody แต่ละชนิด (Hev b3, Hev b5 และ Hev b6.02) (อัตราการเจือจาง 1: 10,000 in 4% non-fat milk) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาให้ล้าง PVDF ด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 15 นาที และล้างด้วย TSB buffer อีก 1 ครั้ง ต่อไปให้นำแผ่น PVDF ดังกล่าวมาบ่มร่วมกับ Goat anti-mouse IgG HRP (อัตราการเจือจาง 1:10,000 in 4% non-fat milk) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น PVDF เช่นเดิมด้วย TBST และ TSB buffer

การตรวจสอบผลทำได้โดยนำแผ่น PVDF นี้ไปทำปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจสอบชนิด chemiluminescent detection kit (Pierce, super signal Chemiluminence) 5 นาที จากนั้นเตรียมสารเคมีสำหรับล้างฟิล์มโดยผสมน้ำกลั่นกับสารละลาย Fixer ในอัตราส่วน 4:1 และผสมน้ำกลั่นกับสารละลาย Developer ในอัตราส่วน 4:1 เช่นเดียวกัน นำแผ่น PVDF มาประกบลงบนแผ่นฟิล์ม X-ray ในที่มืดเป็นเวลา 5-60 นาที หรือข้ามคืน ขึ้นกับกรณีแล้วล้างฟิล์มโดยแช่แผ่นฟิล์มในสารละลาย Fixer เป็นเวลา 30 วินาที และแช่ในสารละลาย Developer เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดอย่างรวดเร็ว ผึ่งแผ่นฟิล์มให้แห้ง แล้วสังเกตแถบสีดำที่เกิดขึ้น

8. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเริ่มต้นของซีรั่มน้ำยางพาราโปรตีนต่ำแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธี Modified Lowry และ Micro assay ก่อนที่จะนำเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ต่อไป จากนั้นทำการวิเคราะห์รูปแบบเบื้องต้นของการกระจายตัวของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เครื่องมือ Hoefer รุ่น SE250 ใช้เจลขนาด 10 x 8 cm ซึ่งในหัวข้อนี้จะทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 2 ประเด็น ได้แก่

1) <u>เทคนิคการย้อมสี</u> ได้แก่ สีย้อม coomassie brilliant blue R-250 สีย้อม fast and sensitive colloidal coomassie G-250 และ สีย้อม silver staining โดยทำการศึกษาบนเจลความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนในตัวอย่างปริมาณ 40 ไมโครกรัม

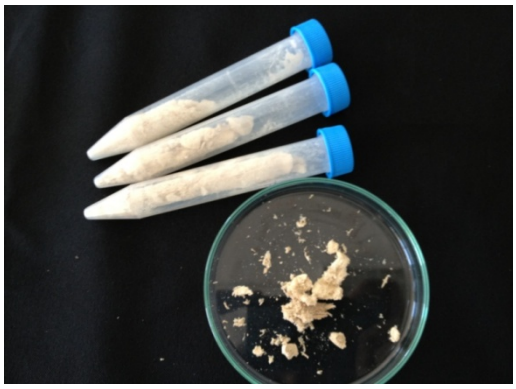
2) <u>ความเข้มข้นของเจล</u> ได้แก่ ความเข้มข้นของเจลที่ 7.5% 12.5% และ 15% ทั้งที่เป็นสภาวะ reducing (เติม β-mecaptoethanol) และสภาวะ non-reducing (ไม่เติม β-mecaptoethanol)

ผลการวิจัย

1. กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสผงที่ผลิตขึ้นจากงานวิจัยครั้งนี้มีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่นแสดงดังในภาพที่ 1 ซึ่งทั้งนี้ภายหลังจากผ่านกระบวนการเตรียมหลายๆ ขั้นตอนแล้ว พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง แสดงผลดังตารางที่ 1 และ

สุดท้ายเมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแล้ว กิจกรรมของเอนไซม์หลงเหลืออยู่ทั้งสิ้น 120,422.53 Unit/กรัมของเอนไซม์ผง และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 169.78 unit/มิลลิกรัมของโปรตีน ซึ่งเอนไซม์ที่เตรียมขึ้นนี้ก็จะได้นำมาใช้ตลอดการวิจัย



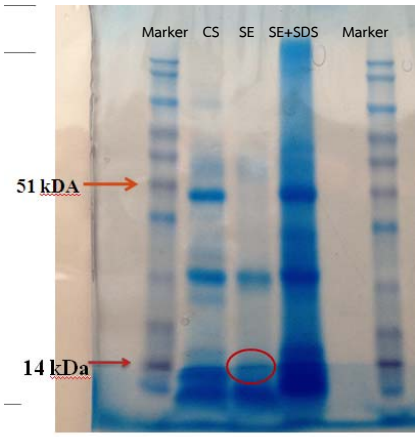
ภาพที่ 1 แสดงเอนไซม์โปรติเอสผงที่ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

ตารางที่ 1 แสดงผลกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่หลงเหลืออยู่ภายหลังจากผ่านขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ผง

ขั้นตอนการเตรียม	กิจกรรมเอนไซม์ทั้งหมด (Unit)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (U/mg)	Recovery yield (%)
Crude enzyme	238560	2832.90	8.32	100.00
ตกตะกอน+dialysis	118800	205.20	578.94	49.80
ทำแห้งแบบเยือกแข็ง	24633	145.09	169.78	10.32

2. การวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของโปรตีนผสมในซีรั่มของน้ำยางโปรตีนต่ำ

น้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้ได้จากการบ่มน้ำยางร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 500 ยูนิต ต่อน้ำยาง 100 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเอาชั้นซีรั่มออกมาวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE อย่างไรก็ตาม ชุดการทดลองควบคุมก็ได้ดำเนินการควบคู่กันไปจำนวน 2 ชุดการทดลอง นั่นคือน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์และน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์ร่วมกับ SDS ความเข้มข้น 0.2% (w/v) เมื่อผ่านการวิเคราะห์แล้ว ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โปรตีนบางส่วนได้หายไปหรือลดลงภายหลังจากการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไป ยกตัวอย่างเช่นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 14 และ 50 kDa ในขณะที่การเติมเอนไซม์ร่วมกับสาร SDS นั้นกลับพบว่าเอนไซม์ไม่สามารถทำงานเพื่อย่อยโปรตีนได้ ดังนั้นจึงยังคงตรวจพบแถบโปรตีนดังเดิม



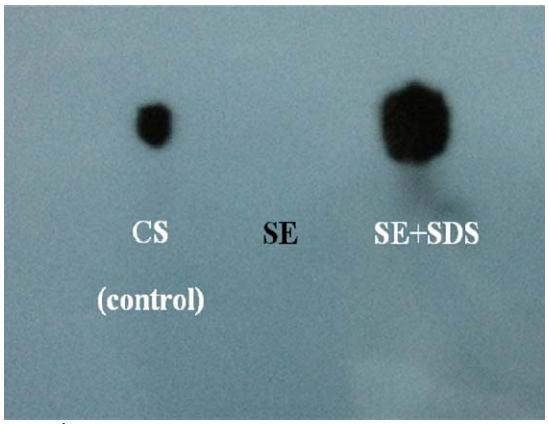
ภาพที่ 2 แสดงการตรวจสอบโปรตีนในน้ำยางพาราโปรตีนต่ำด้วยเทคนิค SDS-PAGE
หมายเหตุ:
CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์และสาร SDS
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส
SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสร่วมกับสาร SDS (0.2% w/v)

3. การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot

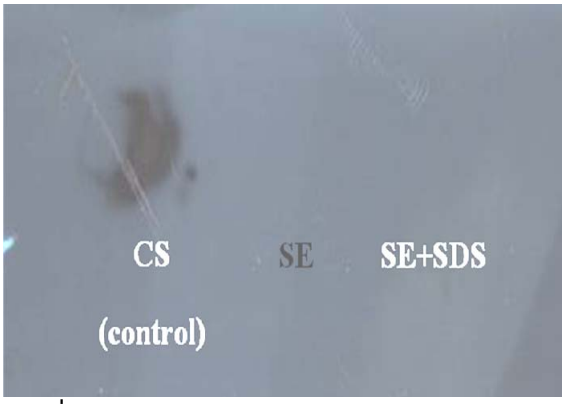
งานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิค Western blot ในการวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) Acidic protein (Hev b5) และ Hevein (Hev b6.02) ในน้ำยางพาราโปรตีนต่ำเปรียบเทียบกับอีก2 ชุดการทดลอง คือน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์และน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์ร่วมกับ SDS ความเข้มข้น 0.2% (w/v) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3-6 ซึ่งก็พบว่าในกรณีของโปรตีน REF และ SRPP นั้น จะตรวจพบโปรตีนดังกล่าวเฉพาะในตัวอย่างน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์โปรติเอสและน้ำยางพาราที่เติมโปรติเอสร่วมกับสาร SDS แต่ในขณะที่น้ำยางพาราที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสเพียงอย่างเดียวนั้น จะไม่สามารถตรวจพบโปรตีนภูมิแพ้ทั้งสองชนิดนี้หลงเหลืออยู่ แต่เมื่อพิจารณาการศึกษาโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Acidic protein แล้วนั้นกลับพบผลการศึกษาที่แตกต่างกันเล็กน้อย นั่นคือตรวจพบ Acidic protein เพียงในตัวอย่างน้ำยางพาราสดเท่านั้น แต่ไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในตัวอย่างอื่นๆ เลย ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าโปรติเอสช่วยกำจัด Acidic protein ด้วยเช่นกัน และสุดท้ายกรณีของการศึกษา

โปรตีนชนิด Hevein ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่ายังคงตรวจพบโปรตีนชนิดนี้ในตัวอย่างน้ำยางพาราทุกชุดการทดลอง นั้นอาจหมายความว่าโปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* นี้ไม่สามารถโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein นี้ได้

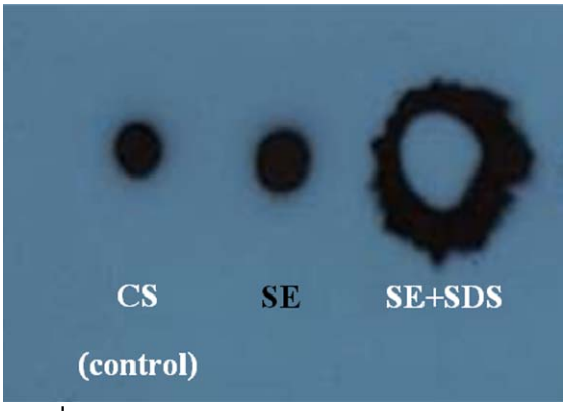
ภาพที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1)
หมายเหตุ:
CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส
SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)



ภาพที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3)
หมายเหตุ:
CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส
SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)



ภาพที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Acidic protein (Hev b5)
หมายเหตุ:
CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส
SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)

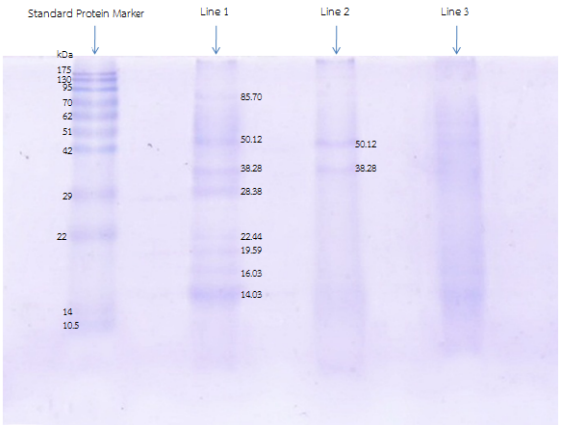


ภาพที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein (Hev b6.02)
หมายเหตุ:
CS คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด
SE คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส
SE+SDS คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)

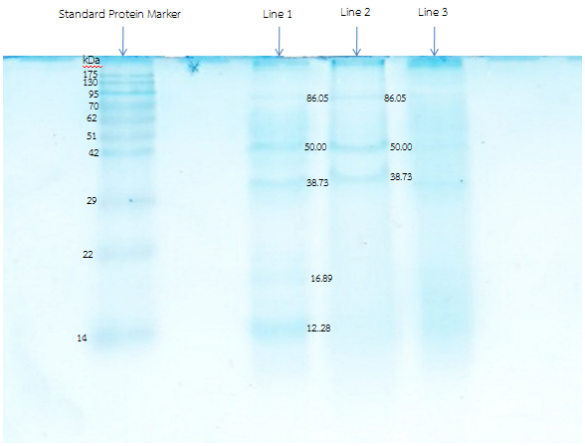
4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis

ในการวิเคราะห์การกระจายตัวของโปรตีนผสมจากตัวอย่างแหล่งต่างๆ ด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ชัดเจนที่สุด ซึ่งสภาวะแรกที่ได้ทำการศึกษาคือ เทคนิคการย้อมสีโปรตีน ซึ่งเปรียบเทียบกันทั้งสิ้น 3 เทคนิค พบว่าภายหลังจากศึกษา

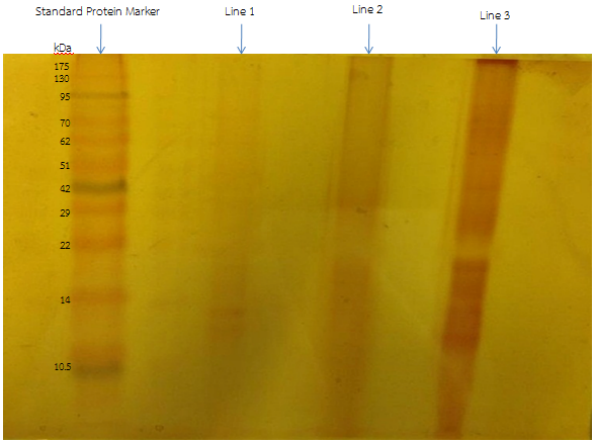
โดยใช้โปรตีนปริมาณ 40 μg ในเจลความเข้มข้น 12.5% นั้น การย้อมด้วยวิธีการ coomassie brilliant blue R-250 จะปรากฏแถบโปรตีนปรากฏมากที่สุดจำนวน 8 แถบ ได้แก่ 85.70, 50.12, 38.28, 28.38, 22.44, 19.59, 16.03 และ 14.03 kDa ในตัวอย่างน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์ (CS) ส่วนน้ำยางพาราที่เติมเพียงเอนไซม์โปรติเอส (SE) ปรากฏเพียง 2 แถบ ได้แก่ 50.12 และ 38.28 kDa ในขณะที่น้ำยางพาราที่เติมทั้งเอนไซม์โปรติเอสและ SDS นั้น ไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจนเห็นเป็นเพียงรอยลากยาวเท่านั้น ซึ่งโดยรวมแล้วจะเห็นว่าเทคนิคการย้อมสีดังกล่าวให้ผลของแถบโปรตีนที่ค่อนข้างชัดเจนมาก (ภาพที่ 7) และเมื่อเทียบกับการย้อมด้วยวิธี fast and sensitive colloidal coomassie G-250 และ silver staining พบว่าการย้อมด้วย fast and sensitive colloidal coomassie G-250 ให้แถบของโปรตีนมากที่สุดในตัวอย่างน้ำยางพาราที่ไม่เติมเอนไซม์ (CS) เพียง 5 แถบ ได้แก่ 86.05, 50.00, 38.73, 16.89 และ 12.28 kDa ส่วนน้ำยางพาราที่เติมเพียงเอนไซม์โปรติเอส (SE) ปรากฏเพียง 3 แถบ ได้แก่ 86.05, 50.00 และ 38.73 kDa และน้ำยางพาราที่เติมทั้งเอนไซม์โปรติเอสและ SDS ก็ยังคงเห็นเพียงรอยลากยาวของโปรตีนเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 8) ส่วนกรณีการย้อมด้วย silver staining นั้นก็พบว่าโปรตีนทั้ง 3 ตัวอย่าง ไม่สามารถระบุแถบของโปรตีนได้ชัดเจน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้การย้อมสีด้วยวิธี coomassie brilliant blue R -250
หมายเหตุ:
Line 1 คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด (CS)
Line 2 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส (SE)
Line 3 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)



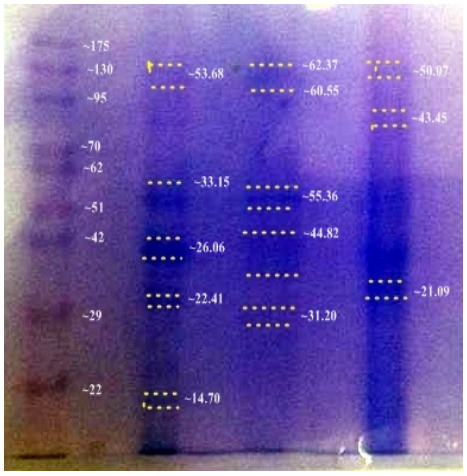
ภาพที่ 8 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้การย้อมสีด้วยวิธี fast and sensitive colloidal coomassie G-250
หมายเหตุ:
Line 1 คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด (CS)
Line 2 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส (SE)
Line 3 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)



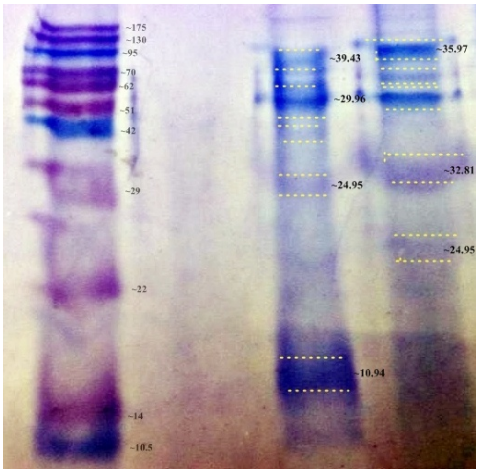
ภาพที่ 9 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้การย้อมสีด้วยวิธี silver staining
หมายเหตุ:
Line 1 คือซีรั่มของน้ำยางพาราสด (CS)
Line 2 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอส (SE)
Line 3 คือซีรั่มของน้ำยางพาราที่เติมเอนไซม์โปรติเอสและสาร SDS (0.2% w/v)

เมื่อได้ทราบเทคนิคการย้อมสีที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการกระจายตัวของโปรตีนแล้ว จึงได้ทำการศึกษาสภาวะที่สองนั่นคือความเข้มข้นของ polycrylamide gel ซึ่งจากปรกติที่ใช้ในระดับ 12.5% ก็ได้ทดสอบเพิ่มเติมที่

ระดับความเข้มข้น 7.5% และ 15% ผลการทดสอบก็แสดงดังภาพที่ 10(A) และ 10(B) ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าความเข้มข้นเจลที่ 7.5% แม้แถบของโปรตีนที่ได้จะมีการแยกออกจากกันได้กว้างขึ้น แต่พบว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็กนั้น หลายตัวได้หลุดออกจากแผนเจล โดยสังเกตจากโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนตัวอย่าง ซึ่งในที่นี้โปรตีนภูมิแพ้ที่ต้องการศึกษาจะมีขนาดที่ต่ำกว่า 70 kDa ลงมา ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นนี้จึงไม่น่าเหมาะสมนักในการศึกษาขั้นต่อไป ส่วนการใช้ความเข้มข้นของเจลที่ 15% พบว่าโปรตีนขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ไม่สุดขอบเจลทำให้แถบของโปรตีนมีการอัดตัวเป็นแถบขนาดใหญ่ไม่เกิดการแยกของโปรตีนหลายๆ แถบเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นของเจลระดับ 12.5% (ภาพ 7) ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้น 12.5% นี้ จึงน่าจะเป็นความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมที่สุดในการแยกโปรตีนผสมจากน้ำจากน้ำยางพารา และเป็นพื้นฐานสำคัญเพื่อใช้ศึกษาโปรตีนด้วยวิธี 2D-gel electrophoresis ต่อไป



(A)



(B)

ภาพที่ 10 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และเทคนิคสีย้อมย้อม coomassie brilliant blue R-250 ในเจลเข้มข้น 7.5% (A) และ 15% (B)

วิจารณ์ผลการวิจัย

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้นครั้งนี้ก็ยังคงสามารถนำมาใช้งานได้สะดวกดังเช่นทุกครั้งที่ผ่านมา แต่ประเด็นปัญหาที่ยังคงพบคือ อายุการเก็บรักษาของเอนไซม์ผง ที่พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงตลอดเวลา แม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากหลายปัจจัยไม่ว่าจะเป็นผลึกน้ำแข็งจากความชื้นที่หลงเหลืออยู่ในเอนไซม์ผงซึ่งจะทำลายโครงสร้างของโปรตีน รวมถึงสภาวะออกซิเดชั่นที่เกิดกับโมเลกุลโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาจเกิดกับกรดอะมิโน cysteine ดังนั้นการทดลองนำสารที่มีคุณสมบัติยืดอายุการเก็บรักษาของเอนไซม์มาผสมลงในเอนไซม์โปรติเอสนี้จึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง สารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้แก่ สารกลุ่ม cryoprotectant (ลดการเกิดผลึกน้ำแข็ง) สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อน สารกลุ่ม Metal chelator (คงสภาพโปรตีนในสภาวะ Reduced) และ reducing agent (ป้องกันโมเลกุลโปรตีนจากสภาวะออกซิเดชั่น) อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์จากขั้นตอนการเตรียมโปรติเอสผงนี้ ก็จะเห็นได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ถูกเก็บเกี่ยวได้ในแต่ละขั้นตอนจะลดลง ในขั้นตอนแรกของการตกตะกอนโปรตีนและไดอะไลซีสนั้น คาดว่าที่เก็บเกี่ยวได้น้อยอาจจะเนื่องจากประสิทธิภาพการปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนโปรตีน ทำให้เก็บได้ไม่หมด ครั้งต่อไปสามารถปรับปรุงเทคนิคการเก็บตะกอนด้วยการกรองแทนการปั่นเหวี่ยง แต่ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็งก็ทำให้กิจกรรมโปรติเอสลดลงไปอย่างมากเช่นกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วผู้วิจัยลงความเห็นว่าขั้นตอนนี้อาจจะไม่จำเป็นต่อไป เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ไม่สามารถควบคุมได้ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นส่งผลเสียต่อโครงสร้างของเอนไซม์ ทั้งยังใช้เวลาและเครื่องมือราคาสูง กระทบต่อต้นทุนการผลิต ทางออกที่ผู้วิจัยเสนอคือ ให้เตรียมเอนไซม์โปรติเอสในรูปสารละลายเอนไซม์เข้มข้นแทน นั่นคือเมื่อผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนเรียบร้อยแล้ว ก็ทำการละลายกลับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม พร้อมทั้งเติมสารกลุ่มต่างๆ ที่มีคุณสมบัติยืดอายุการเก็บรักษาแทน ด้วยกระบวนการเช่นนี้คาดว่าจะทำให้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่มีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์มากขึ้น

โปรตีนภูมิแพ้ชนิด REF ได้เคยถูกตรวจสอบมาแล้วในงานวิจัย 54500045 (การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ) โดยในครั้งนั้นได้พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ MR10 นี้สามารถกำจัด REF ได้ แต่ในการวิจัยครั้งนี้ ได้แสดงเพิ่มเติมถึงผลของการเติมสาร SDS (Sodium dodesyl sulfate) ที่มีต่อประสิทธิภาพการกำจัด REF เนื่องจากพบว่างานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมาได้มีการเติมสารชนิดนี้ร่วมกับ

เอนไซม์เพื่อลดปริมาณโปรตีนในเนื้อยางพาราลง (ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์, 2540, Klinklai et al., 2003; Klinklai et al., 2004; Rattanasom et al., 2005) ซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าการเติมสาร SDS ลงในน้ำยางพาราร่วมกับการเติมเอนไซม์โปรติเอส ทำให้ช่วยลดปริมาณโปรตีนในส่วนเนื้อยางลงได้จริงเช่นเดียวกับการเติมเพียงเอนไซม์อย่างเดียว (ไม่ได้แสดงผลการทดลองในรายงาน) อย่างไรก็ตาม แม้จะลดปริมาณโปรตีนได้ใกล้เคียงกัน แต่กลับพบว่ายังคงมีโปรตีนภูมิแพ้ REF หลงเหลืออยู่เมื่อเติม SDS ร่วมด้วย ผู้วิจัยคาดว่าสาร SDS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวนี้ มีกลไกในการกำจัดโปรตีนคือเพียงช่วยละลายโปรตีนให้หลุดออกมาจากเนื้อยางเพิ่มมากขึ้นเท่านั้น ไม่ได้ช่วยในการย่อยโมเลกุลโปรตีนดังเช่นกลไกการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส อีกทั้ง SDS ยังทำให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพ (Denature) และไม่สามารถทำงานได้ในที่สุด ดังนั้นหากต้องการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยกลไกการย่อยโมเลกุลแล้ว ไม่ควรเติมสาร SDS เข้าร่วมในกระบวนการ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนภูมิจำนวน 4 ชนิด ด้วยเทคนิค Western blot ได้แก่ REF (Hev b1), SRPP (Hev b3), Acidic protein (Hev b5) และ Hevein (Hev b6.02) โดยสองชนิดแรกยึดเกาะอยู่บนพื้นผิวของเนื้อยางทั้งอนุภาคขนาดใหญ่และอนุภาคขนาดเล็ก ส่วน Acidic protein ละลายอยู่ในชั้น C serum ในขณะที่ Hevein จะพบอยู่ในส่วนของชั้น B-serum (Yeang, 2002; Yeang, 2004) ทั้งสี่ชนิดนี้ล้วนเป็นโปรตีนที่ก่ออาการภูมิแพ้ชนิดรุนแรง (High allergenicity) (Yeang, 2004) ดังนั้นผลงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการสร้างความมั่นใจในการนำน้ำยางพาราโปรตีนต่ำนี้ไปใช้ประโยชน์มากขึ้น

มีนักวิจัยบางกลุ่มที่เสนอให้มีการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราด้วยการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ต้นยางพาราไม่ให้สังเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้เหล่านี้ แต่ในความเป็นจริงนั้นอาจจะเป็นไปได้ยากในทางปฏิบัติ เพราะโปรตีนที่สำคัญบางชนิด ได้แก่ REF และ SRPP นั้นมีบทบาทในการช่วยสังเคราะห์เนื้อยางในต้นยางพารา ดังนั้นหากปราศจากโปรตีนเหล่านี้แล้วก็จะไม่สามารถผลิตยางพาราได้ ผู้วิจัยจึงคิดว่าวิธีการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์น่าจะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดในขณะนี้

โปรตีนภูมิแพ้ชนิด Acidic protein (Hev b5) ก็เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญอีกเช่น เนื่องจากมีความสามารถทนต่อความร้อนได้เป็นอย่างดี แม้จะนำไปผ่านความร้อนในหม้อนึ่งความดันไอก็ยังคงแสดงความเป็นสารก่อภูมิแพ้ได้เช่นเดิม (Sussman et al., 2002) ซึ่งงานวิจัยนี้ก็ได้ยืนยันเป็นที่เรียบร้อยแล้วว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถกำจัดโปรตีนชนิดนี้ได้ แต่งานวิจัยนี้ก็ได้พบข้อจำกัดในการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* นั่นคือเอนไซม์ไม่มีความจำเพาะ (specificity) ต่อโปรตีนชนิด Hevein (Hev b6.02) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากโมเลกุลของ hevein มีขนาดเพียงประมาณ 4-5 kDa ซึ่งจัดว่าเป็นโปรตีนขนาดเล็ก จึงยังคงหลงเหลืออยู่ภายหลังการบ่มร่วมกับเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามในแง่ของกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากยางพารานั้น เราอาจสามารถกำจัดโปรตีนชนิดนี้ออกไปได้ด้วยการล้างด้วยน้ำเปล่าเพื่อละลายโปรตีนชนิดนี้ให้ออกไป

ในการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis ครั้งนี้ มีการใช้โปรตีนปริมาณ 40 μg ต่อช่องเจล ซึ่งเป็นปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างสูง เหมาะสำหรับเทคนิคการย้อมสีด้วย coomassie brilliant blue R-250 สามารถทำให้เห็นผลได้ชัดเจนและเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ซึ่งต่างจากการย้อมอีก 2 วิธีที่เหลือ ที่พบว่าจำนวนแถบของโปรตีนลดลงหรือไม่ปรากฏ อาจเนื่องจากการย้อมทั้ง 2 วิธี โดยปกติแล้วต้องใช้ปริมาณโปรตีนต่อช่องเจลในปริมาณที่ต่ำกว่าจึงจะทำให้เห็นแถบโปรตีนได้ชัดเจนขึ้น (Dyballa and Metzger, 2009; Anoname, 1994) หากปริมาณโปรตีนสูงเกินไปจะทำให้เห็นแถบโปรตีนไม่ชัดเจนในลักษณะที่เป็นแถบกว้างหรือลากยาว อันเนื่องมาจากมีความไว (sensitivity) ต่อสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนด้วย หากพิจารณาเฉพาะเทคนิค silver staining จะพบว่าสีของพื้นหลังค่อนข้างเข้มซึ่งอาจเกิดขึ้นถ้าใช้น้ำที่บริสุทธิ์ไม่พอ นอกจากนี้สารเมอร์แคปโตเอทานอลที่หลงเหลืออยู่ในเจลหลังการทำอิเลคโตรโฟรีซิส สามารถไปรบกวนการย้อมจึงทำให้โปรตีนบางชนิดไม่ติดสีย้อมหรือติดสีย้อมจางได้ ซึ่งไม่เฉพาะแต่โปรตีนเท่านั้นที่ติดสีย้อม DNA Lipopolysaccharide และ polysaccharide ก็สามารถติดสีย้อมนี้ด้วย จึงทำให้แถบที่เห็นในบางครั้งไม่สามารถบ่งชี้ได้แน่ชัดว่าเป็นโปรตีน (อาภัสรา, 2545) อย่างไรก็ตามถ้ามีการปรับปริมาณโปรตีนที่ใช้ต่อช่องเจล ให้มีปริมาณความเข้มข้นต่ำๆ เพื่อให้เหมาะสมกับการย้อมทั้ง 2 วิธีนี้ ก็น่าจะให้ผลที่ดีเมื่อเทียบกับวิธี coomassie brilliant blue R-250 จากผลการทดลองในเบื้องต้นนี้พบว่า วิธี coomassie brilliant blue R-250 ยังมีความเหมาะสมในด้านอื่นๆ สำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนในเจลทั้งด้านการเป็นเทคนิคที่มีราคาถูก ไม่ซับซ้อน ทำได้ง่าย และปลอดภัยต่อผู้ทำการวิจัย (อาภัสสรา, 2545) ผลในครั้งนี้จะนำไปเป็นพื้นฐานในการวิเคราะห์โปรตีนขั้นสูงด้วยเทคนิค 2D-gel ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป

โปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ ที่พบในน้ำยางพาราสดนั้น ปัจจุบันได้มีผู้ศึกษาและรายงานมากมาย เทคนิคและเครื่องมือที่นิยมใช้ในการศึกษาคือเทคนิค 2D-gel electrophoresis นั่นเอง (Posch et al., 1997; Xiang et

al., 2012) ที่ซึ่งสามารถแยกโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกันออกจากกันได้ จากนั้นจึงทำการศึกษาถึงลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนที่แยกได้แต่ละชนิดอีกครั้งด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS ซึ่งข้อมูลที่ได้จากขั้นตอนนี้ก็จะถูกนำไปเทียบกับฐานข้อมูลอีกครั้งเพื่อระบุว่าเป็นโปรตีนชนิดใด ด้วยกระบวนการนี้ก็จะทำให้ทราบถึงการมีอยู่หรือหลงเหลือของโปรตีนแต่ละชนิดได้ แต่ในงานวิจัยระยะปีที่ 1 นี้ได้เสนอไว้เพียงการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis เท่านั้น แล้วจึงนำสภาวะที่ศึกษาได้เหล่านี้มาใช้สำหรับการวิเคราะห์ขั้นตอนที่เหลือในแผนงานระยะปีที่ 2 ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการใช้เทคนิค Western blot ในการตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์โปรติเอสผงที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในน้ำยางพาราสด พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ แต่ไม่สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hevein (Hev b6.02) ส่วนการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ นั้น จะได้ทำการตรวจสอบต่อไปด้วยเทคนิค 2D-gel electrophoresis ที่ซึ่งเบื้องต้นพบว่าสีย้อมโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดคือสี coomassie brilliant blue R-250 และความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่เหมาะสมเพื่อใช้วิเคราะห์โปรตีนจากน้ำยางพาราสดคือที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

เอกสารอ้างอิง

ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ และ พรสิทธิ์ วงศ์บุญฑริก. “การเตรียมและสมบัติบางประการของยางโปรตีนต่ำ”. *วารสารสงขลานครินทร์*, 19(2540): 223-229.

อาภัสสรา ชูเทศะ. (2545). *เอกสารประกอบการบรรยายการอบรมเชิงปฏิบัติการเทคนิค Electrophoresis ในงานวิจัย คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.* กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Beezhold, D.H., Kostyal, D.A. and Tomazic-Jezic, V.J. 2002. Measurement of latex proteins and assessment of latex protein exposure. Methods 27: 46-51.

Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote., and Lumyong, S. (2002). Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally Fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia* 28: 241-245.

Dyballa, N., and S. Metzger. (2009) Fast and Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteins in Polyacrylamide Gels. *Journal of Visualized Experiments, 30*(e1431), 1-5.

Klinklai, W., Kawahara, S., Mizumo, T., Yoshizawa, M., sakdapipanich, J.T., Isono, Y., and Ohno, H. 2003. Depolymerization and ionic conductivity of enzymatically deproteinized natural rubber having epoxy group. *European Polymer Journal* 39:1707-1712.

Klinklai, W., Kawahara, S., Mizumo, T., Yoshizawa, M., Yoshizawa, M., Isono, Y. and ohno, H. 2004. Ionic conductivity of highly deproteinized natural rubber having epoxy group mixed with alkali metal salts. Solid State Ionics 168: 131-136.

Rattanasom, N., Thammasiripong, U. and Suchiva, K. 2005. Mechanical properties of deproteinized natural rubber in comparison with synthetic *cis*-1,4 polyisoprene vulcanizates: gum and black-filled vulcanizates. *Journal of Applied Polymer Science* 97: 1139-1144.

Palosuo, T. 1997. Latex allergens. *Rev. fr. Allergol*. 37: 1184-1187.

Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.

Posch, A., Chen, Z, Wheeler, C., Dunn, M.J., Raulf-Heimsoth, M. and Baur, X. 1997. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol*. 99: 385-395.

Raulf-Heimsoth, M., Posch, A. Chen, Z. and Baur, X. 1997. Cross-reactivity between natural rubber latex and food allergens. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 4: 169-173.

Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Kurup, V.P. 2002. Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 110: S33-S39.

Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Liss, G. 2002. Latex allergy: historical perspective. *Methods* 27: 3-9.

Yeang, H.Y., Arif, S.A.M., Yusof, F., and Sunderasan, E. 2002. Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods* 27: 32–45.

Yeang, H., Arif, S.A.M. Raulf-Heimsoth, M., Loke, Y., Sander, I., Sulong, S.H., Lau, C. and Hamilton, R.G. 2004. Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *J Allergy Clin Immunol*. 114: 593-598.

Ylitalo, L., Alenius, H., Turjanmaa, K., Palosuo, T., and Reunala, T. 1998. IgE antibodies to prohevein, and rubber elongation factor in children with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 102: 659-664.

Xiang, Q, Xia, K., Dai, L., Kang, G., Li, Y., Nie, Z., Duan, C. and Zeng, R. 2012. Proteome analysis of the large and the small rubber particles of *Hevea brasilliensis* using 2D-DIGE. Plant Physiology and Biochemistry 60: 207-213.

ภาคผนวก 4
ร่างโปสเตอร์งานวิจัย

ภาคผนวก 5
ชี้แจงข้อคิดเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ

<u>สรุปข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิต่อรายงานความก้าวหน้าโครงการรอบ 8 เดือน</u>
<u>“คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจาก</u>
<u>แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10” สัญญาเลขที่ RDG5550059</u>

ข้อคิดเห็น/ ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
<u>ความเห็นด้านวิชาการ (Technical)</u> 1. ในขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ด้วยเทคนิค Western blot ผู้วิจัยต้องการจะ Reconfirm ผลการวิจัยซึ่งอาจจะไม่ทันตามแผน ขณะนี้ยังไม่แน่นอนว่าจะต้องต่อเวลาหรือไม่	ผู้วิจัยยกเลิกแผนงาน Reconfirm ผลการวิจัยด้วยเทคนิคอื่นแล้ว เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องระยะเวลา ทั้งนี้ด้วยเทคนิค Dot blot (Western blot) ที่ใช้อยู่ก็สามารถตอบคำถามเรื่องการหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ได้แล้ว ซึ่งเป็นประเด็นที่ผู้วิจัยกำหนดไว้ในวัตถุประสงค์ของงานวิจัย
2. รายงานยังขาดในส่วนของทดสอบความเสถียรของน้ำยางที่ลดโปรตีนภูมิแพ้	เป็นประเด็นที่สำคัญ ที่จะต้องทำการทดสอบ ซึ่งผู้วิจัยก็จะได้ให้ความสำคัญในแผนการวิจัยระยะปีที่สองต่อไป
3. นักวิจัยควรลองลดปริมาณ SDS ให้น้อยลง แต่ไม่ควรเอาออกหมด เพราะสารนี้มีส่วนช่วยในเรื่องความเสถียรตอน compound น้ำยาง	ผู้วิจัยจะได้ทดลองศึกษาหาปริมาณสาร SDS ที่เหมาะสมและไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ต่อไป เพื่อประโยชน์ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ ซึ่งประเด็นนี้จะได้ศึกษาละเอียดยิ่งขึ้นในงานวิจัยระยะปีที่สองที่จะมีการทดสอบขึ้นรูปเป็นถุงมือยางทางการแพทย์

ภาคผนวก 6

ชี้แจงข้อคิดเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ

<u>สรุปข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิต่อร่างรายงานฉบับสมบูรณ์</u>

<u>“คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10” สัญญาเลขที่ RDG5550059</u>

ข้อคิดเห็น/ ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
ความเห็นด้านการพิมพ์ (Editorial) <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1</u> 1. มีเขียนผิดบางแห่ง และได้ขีดเส้นไว้ให้สำหรับส่วนที่ต้องแก้ไข	ได้ทำการทบทวน และพบข้อบกพร่องในการพิมพ์เช่น สะกดผิด และการเว้นช่องว่างระหว่างคำ เป็นต้น จึงได้ทำการแก้ไขเรียบร้อยแล้ว (หมายเหตุ: ไม่ได้รับร่างรายงานคืน)
ความเห็นด้านวิชาการ (Technical) <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1</u> 1. ให้นักวิจัยตรวจสอบ เอกสารแนบของสัญญา RDG5550059 ซึ่ได้ระบุการนำน้ำยางโปรตีนต่ำไปทดลองขึ้นรูปถุงมือทางการแพทย์นั้น ยังไม่ปรากฏการรายงานของส่วนนี้ ขอให้ชี้แจงเพิ่มเติมด้วย	ภายหลังตรวจสอบเนื้อหาในเอกสารแนบสัญญาแล้วพบข้อความดังกล่าวระบุไว้ในหน้าที่ 7 จริง (ตารางแผนกิจกรรม) โดยระบุไว้ในส่วนของ “ผลที่คาดว่าจะได้รับ” ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเป็นความผิดพลาดของผู้วิจัยในการใช้คำสื่อสารควรใช้ประโยคที่กล่าวว่า “ได้นำยางโปรตีนต่ำสำหรับนำไปวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ที่หลงเหลือ***<u>เพื่อ</u>***นำไปขึ้นรูปเป็นถุงมือทางการแพทย์” ไม่ใช่ “ได้นำยางโปรตีนต่ำสำหรับนำไปวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ที่หลงเหลือ***<u>และ</u>***นำไปขึ้นรูปเป็นถุงมือทางการแพทย์” เพราะในแผนงานปีที่หนึ่งนี้ ยังไม่ได้มุ่งไปในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ ดังวัตถุประสงค์ที่ระบุในสัญญาหน้าที่ 6 ว่า “เพื่อศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในยางโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นโดยโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10” อย่างไรก็ตาม การศึกษาการขึ้นรูปเป็นถุงมือยางทางการแพทย์นั้น ก็จะได้ศึกษาในแผนงานปีที่สองต่อไป
2. ในหัวข้อเสนอแนะ ควรระบุเพื่อเติมเกี่ยวกับประเด็นวิจัยต่อของปี 56 ตามที่ได้รับอนุมัติไปแล้ว เพื่อให้เห็นความต่อเนื่องของการวิจัย	ได้มีการระบุเนื้อหาเพิ่มเติมในหัวข้อเสนอแนะแล้ว
<u>ข้อสังเกต</u> 1. ยังไม่ควรเผยแพร่ผลงานของปีงบประมาณ 2555 เนื่องจากยังมีการทำวิจัยต่อเนื่อง	ผู้วิจัยรับทราบ