เอดดินจากรำข้าวและความสามารถในการจับตัวกับบักเตรีที่ตรึงไนโตรเจนบริเวณราก

นาย ชูเกียรติ กอชนะกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2526

ISBN 974-562-467-5

008649

I16535502

Rice Bran Lectin and Its Agglutination with Nitrogen-Fixing Rhizospheric Bacteria

Mr. Chukiat Kortanakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1983

ISBN 974-562-467-5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Rice Bran Lectin and Its Agglutination with Nitrogen-Fixing Rhizospheric Bacteria.
By	Mr. Chukiat Kortanakul.
Department	Biochemistry.
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

....S. Bunnag.....Dean of Graduate School

(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

.....S. Subptosok.....Chairman

(Assistant Professor Sansern Subptosok)

.....Jariya Boonjawat.....Member

(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

.....P. Thipayathasana.....Member

(Associate Professor Pairor Thipayathasana, Ph.D.)

Vipada Suratanakavikul.....Member

(Assistant Professor Vipada Suratanakavikul, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เลคตินจากรำข้าวและความสามารถในการจับตัวกับบักเตรีที่ตรึงไนโตรเจนบริเวณราก
ชื่อนิสิต	นาย ชูเกียรติ กอชนะกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2525

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การศึกษาบทบาทของเลคตินจากรำข้าวในการจับตัวกับบักเตรีที่ตรึงไนโตรเจนบริเวณราก ขั้นแรกแยกเลคตินจากรำข้าวโดยการสกัดไขมันออกด้วยอะซีโตนแล้วสกัดส่วนที่เป็นโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (พี บี เอส) ได้โปรตีนทั้งหมดร้อยละ 3.5 ต่อน้ำหนักรำข้าว ซึ่งเมื่อทดสอบความสามารถในการจับตัวกับเซลเม็ดเลือดแดงของคนหมู่ เอ บี เอบี โอ และเซลเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่ย่อยบางส่วนออกด้วยทริพซินโดยวิธีไมโครไตเตอร์ พบว่าเลคตินจับตัวกับเซลเม็ดเลือดแดงของคนทุกหมู่ แต่จับตัวกับเซลเม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้ดีที่สุดให้ค่าไตเตอร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนเท่ากับ 0.77 ดังนั้นจึงใช้เซลเม็ดเลือดของกระต่ายที่ย่อยบางส่วนออกด้วยทริพซินในการติดตามวัดปริมาณเลคตินโดยวัดความสามารถในการจับตัวของเลคตินในขั้นตอนต่อไปของการทำเลคตินให้บริสุทธิ์ เมื่อนำสารละลายโปรตีนใน พี บี เอส นี้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0–60 % แล้วเอาตะกอนเลคตินไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้น 2 วิธีคือ 1) นำมาผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์–25 คอลัมน์ ดีอีเออี–เซฟาเด็ก–เอ–50 และคอลัมน์เซฟาเด็กซ์–100 สามารถแยกแฟรกชั่นของเลคตินที่ให้ค่าไตเตอร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนเท่ากับ 20 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 26 เท่าของสารละลายโปรตีนใน พี บี เอส 2) นำมาผ่านอะฟินิตี้คอลัมน์ เอน–อะเซทิล–ดี–กลูโคซามีน เซฟาโรส–4–บี สามารถแยกเลคตินให้ค่าไตเตอร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนเพิ่มขึ้นเป็น 20 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 26 เท่าของสารละลายใน พี บี เอส เท่ากับวิธีแรก

เมื่อนำเลคตินจากทั้ง 2 วิธีมาศึกษาโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรฟอรีซีส พบว่าให้เพียงแถบเดียวและผ่านบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์–75 ให้พีคของเลคตินที่สมมาตรเพียงพีคเดียวที่ตำแหน่งเดียวกันตามลำดับ ดังนั้นแสดงว่าเลคตินที่ทำให้บริสุทธิ์จากทั้ง 2 วิธีเป็นเนื้อเดียวกันและเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน เมื่อนำเลคตินจากรำข้าว

ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบความสามารถในการจับตัวและตัวยับยั้งกับเซลเม็ดเลือดแดงของกระต่ายที่ย่อยบางส่วนออกด้วยทริพซินและบักเตรีที่ตรึงไนโตรเจนบริเวณรากข้าวพบว่า 1) เลคตินบริสุทธิ์จากรำข้าวสามารถจับตัวกับเซลเม็ดเลือดแดงของกระต่ายและบักเตรีที่ตรึงไนโตรเจนบริเวณรากข้าวให้ค่าไตเตอร์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนเท่ากับ 20 2) ตัวยับยั้งในการจับตัวของเลคตินกับเซลเม็ดเลือดแดงของกระต่ายและบักเตรีที่ตรึงไนโตรเจนบริเวณรากข้าวคือ เอน-อะเซทีล-ดี-กลูโคซามีน

เมื่อนำเลคตินบริสุทธิ์จากรำข้าวนี้มาศึกษาโดยวิธี เจลฟิลเตรชั่นบนเซฟาเด็กซ์-75 และเอส-ดี-เอสโพลีอะครีลาไมด์เจลอีเลคโตรฟอรีซีสพบว่าเลคตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40,000และประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยซึ่งไม่เหมือนกันมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24,000, 18,000, 14,000 และ 6,000

เมื่อนำเลคตินมาหาปริมาณน้ำตาลโดยแอนโทรนรีเอคชั่นตรวจไม่พบน้ำตาลแสดงว่าเลคตินจากรำข้าวเป็นโปรตีนธรรมดาไม่ใช่ไกลโคโปรตีน

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้อาจตั้งสมมุติฐานได้ว่าเลคตินจากรำข้าวน่าจะเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรากข้าวและบักเตรีที่ตรึงไนโตรเจนบริเวณรากข้าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Rice Bran Lectin and Its Agglutination with Nitrogen-Fixing Rhizospheric Bacteria
Name	Mr. Chukiat Kortanakul
Thesis Advisor	Associate Professor Jariya Boonjawat,Ph.D.
Department	Biochemistry
Academic Year	1982

ABSTRACT

In order to study the role of rice bran lectin in agglutination with nitrogen-fixing rhizospheric bacteria, firstly lectin was isolated from rice bran by defatted with acetone , and extracted with phosphate buffer saline(PBS) resulted in 3.5% total protein according to rice bran weight. The agglutination activity was determined by the microtiter test, using trypsinized erythrocytes, which were human A, B, AB, O and rabbit erythrocytes. It agglutinated all types of human erythrocytes and showing the highest specific agglutination activity (titer/ mg protein = 0.77) with trypsinized rabbit erythrocytes. Therefore trypsinized rabbit erythrocytes were used to estimate the specific agglutination activity of rice bran lectin in all the further steps of purification. Precipitation with saturated $(NH_4)_2SO_4$ 0-60% resulted in lectin fraction which was further purified by 2 methods; 1) chromatography on Sephadex G-25 and DEAE-Sephadex A-50 columns, and then Sephadex G-100 column, resulted in the agglutination activity in titer/ mg protein of 20, and the protein was purified to 26 folds of the crude PBS extract 2) affinity chromatography on N-acetyl-D-glucosamine Sepharose 4B column increased the agglutination titer/mg protein to 20. The lectin was purified to 26 folds of the PBS extract, which was similar to the first method.

The polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration on

Sephadex G-75 column of rice bran lectin from 2 schemes of purification gave a single band and a single symmetrical peak at the same position respectively. Thus both of them were homogenous and should be the same protein. The agglutination and inhibition test of purified rice bran lectin with trypsinized rabbit erythrocytes and rice rhizospheric nitrogen-fixing bacteria showed that 1) it could agglutinate both trypsinized rabbit erythrocytes and nitrogen-fixing bacteria showing the same titer/mg protein of 20. 2) the agglutination of purified rice bran lectin with trypsinized rabbit erythrocytes and nitrogen-fixing bacteria were inhibited by N-acetyl-D-glucosamine.

The molecular weight of purified rice bran lectin was estimated to be around 40,000 by gel filtration. By SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the purified rice bran lectin further dissociated into 4 nonidentical subuits, with molecular weights of about 24,000, 18,000, 14,000 and 6,000.

By anthrone reaction, no sugar was detected in the lectin. Thus, it was a simple protein, not glycoprotein.

From all these results, it was postulated that rice bran lectin might be a significant tool in the study of the relationship between rice root and nitrogen-fixing rhizospheric bacteria.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my supervisor, Dr. Jariya Boonjawat, for her valuable advice, encouragement, kindness and understanding throughout the course of this study and during the preparation of this thesis. Without these virtues of her, this work could not be accomplished.

I am very grateful to Assistant Professor Sansern Subptosok, Dr. Pairor Thipayathasana and Dr. Vipada Suratanakavikul for criticisms and valuable suggestions and also for their serving as committees.

I am indepted to the Faculty of Science, and the Graduate School, Chulalongkorn University for funding supports, and to the Department of Biochemistry for providing of the facilities.

Sincere appreciation is also expressed to all members of the Department of Biochemistry for assistance at various times in the course of this research.

Finally, I wish to thank my brothers and sisters for their helps in typing, preparing and copy this manuscript.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	viii
CONTENTS	ix
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER.	
I. INTRODUCTION	1
II. MATERIALS AND METHODS	5
III. RESULTS.	
1. PURIFICATION OF RICE BRAN LECTIN	17
1.1 Yield of defatted rice bran and total protein in crude PBS extract	17
1.2 Agglutination test with various erythrocytes	17
1.3 Ammonium sulphate fractionation	20
1.4 Column chromatography	20
1.4.1 Purification by ion exchange chromatography	20
a. Sephadex G-25 gel filtration	20
b. DEAE-Sephadex A-50 column	22
c. Sephadex G-100 column	22
1.4.2 Purification by affinity chromatography	25
a. N-acetyl-D-glucosamine Sepharose 4B column	25

2. Agglutination activity of rice bran lectin ... 25
3. Homogeneity of purified rice bran lectin ... 27
3.1 Polyacrylamide gel electrophoresis 27
3.2 Gel filtration on Sephadex G-75 column 31
4. Biological properties of purified rice bran lectin 31
4.1 Inhibition study of hemagglutination activity with various sugars 31
4.2 Agglutination of purified rice bran lectin with nitrogen-fixing rhizospheric bacteria 34
4.3 Inhibition study of agglutination activity with nitrogen-fixing rhizospheric bacteria 34
5. Effect of boiling on the agglutination activity of purified rice bran lectin 37
6. Sugar content..... 37
7. Subunit structure 37
IV. DISCUSSION 40
REFFERENCES 46
BIOGRAPHY 50

LIST OF TABLES.

Table. page

1. Yield of defatted rice bran and total protein in crude PBS extract 18
2. Agglutination test of crude PBS extract with various types of trypsinized erythrocytes. 19
3. Summary of purification of rice bran lectin ... 29

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES.

Figure. page

1. Elution profile of PBS dialysate on Sephadex G-25 column 21
2. Elution profile of pooled protein fraction A on DEAE-Sephadex A-50 column 23
3. Elution profile of pooled fraction B_2 on Sephadex G-100 column 24
4. Elution profil of PBS dialysate on N-acetyl-D-glucosamine Sepharose 4B column 26
5. Agglutination activity(titer) of rice bran lectin during purification 28
6. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern 30
7. Estimation of the molecular weight of purified rice bran lectin on Sephadex G-75 column 32
8. Inhibition study of hemagglutination activity .. 33
9. Agglutination of purified rice bran lectin with nitrogen- fixing rhizospheric bacteria 35
10. Inhibition study of agglutination activity with nitrogen-fixing rhizospheric bacteria 36
11. Estimation of the molecular weight of the subunits of purified rice bran lectin on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 39

ABBREVIATIONS.

B	Blue dextran 2000
BSA	Bovine serum albumin
K	Potassium chromate
N	Nitrogen
NF	Nitrogen free
PBS	Phosphate buffer saline

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย