# การพัฒนาวิธีอิมมูโนแอสเสย์สำหรับตรวจวัดโปรตีนที่เป็นแอลเลอเจนในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ

เรืออก กิติพงษ์ หาญเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-681-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17362180

# DEVELOPMENT OF IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF PROTEIN ALLERGENS IN NATURAL RUBBER PRODUCTS

Lieutenant Kitiphong Harncharoen

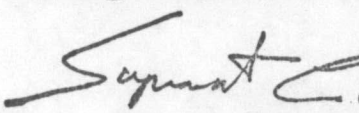
A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Biological Sciences
Faculty of Science
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic year 1996

ISBN 974-636-681-5

| | |
|---|---|
| Thesis Title | :Delvelopment of Immunoassay for the Detection of Protein Allergens in Natural Rubber Products |
| By | Lieutenant Kitiphong Harncharoen |
| Program | Biological Sciences |
| Thesis Advisor | Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D. |
| Thesis Co-advisor | Mr. Pienpak Tasakorn, Ph.D. |

---

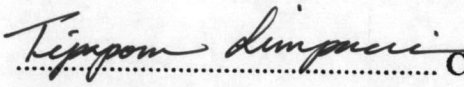
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Doctor of Philosophy.



..... Dean of Graduate School

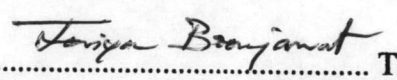
( Professor Supawat Chutivongse, M.D. )

THESIS COMMITTEE



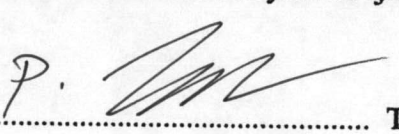
..... Chairman

( Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D. )



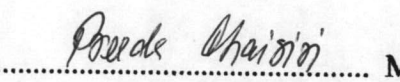
..... Thesis Advisor

( Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D. )



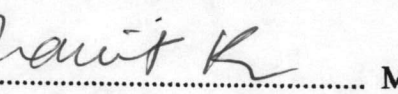
..... Thesis Co-advisor

( Mr. Pienpak Tasakorn, Ph.D. )



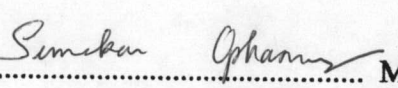
..... Member

( Associate Professor Preeda Chaisiri, Ph.D. )



..... Member

( Associate Professor Thanit Kusamran, Ph.D. )



..... Member

( Dr.Suwirakorn Ophaswongse, M.D. )

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กิติพงษ์ หาญเจริญ : การพัฒนาวิธีอิมมูโนแอสเสย์สำหรับตรวจวัดโปรตีนที่เป็นแอลเลอเจนในผลิตภัณฑ์ยางธรรมชาติ (DEVELOPMENT OF IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF PROTEIN ALLERGENS IN NATURAL RUBBER PRODUCTS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.จริยา บุญญวัฒน์. อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.เพียรพรรค ทัศดร. 115 หน้า. ISBN 974-636-681-5.

ข้อมูลจากการศึกษาในหลายประเทศแสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากน้ำยางธรรมชาติ ทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ที่เกี่ยวข้องกับอิมมูโนโกลบุลินชนิด อี (IgE) สามารถก่อให้เกิดอาการได้ตั้งแต่อาการน้อยๆ คือมีผื่นเกิดขึ้นเฉพาะบริเวณสัมผัส จนถึงเสียชีวิตในกรณีที่เกิดการแพ้แบบเฉียบพลัน (anaphylaxis) บุคลากรทางด้านการรักษาพยาบาล และเด็กที่ได้รับการผ่าตัดซ้ำหลายครั้ง โดยเฉพาะผู้ที่มีความผิดปกติของกระดูกสันหลังมาแต่กำเนิด (spina bifida) มีอัตราเสี่ยงของการแพ้โปรตีนในน้ำยางสูงกว่าปกติ อุบัติการของอาการแพ้ต่อโปรตีนในน้ำยางและกลุ่มประชากรที่มีอัตราเสี่ยงสูงยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทย วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอุบัติการของการพบอิมมูโนโกลบุลินชนิด อี ที่จำเพาะต่อโปรตีนในน้ำยาง เมื่อเปรียบเทียบอัตราเสี่ยงระหว่างกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดี 352 ราย กับ ผู้ป่วยที่มีอาการแพ้ทั่วๆไป 200 ราย พบว่าซีรัมผู้บริจาคโลหิตมีอิมมูโนโกลบุลินชนิด อี ที่จำเพาะกับโปรตีนในน้ำยางอยู่ ร้อยละ 4.5 ส่วนกลุ่มผู้ป่วยภูมิแพ้มีอิมมูโนโกลบุลินชนิด อี ที่จำเพาะกับโปรตีนในน้ำยางอยู่ ร้อยละ 11.0 แสดงว่ากลุ่มผู้ป่วยภูมิแพ้มีอัตราเสี่ยงต่อการแพ้โปรตีนในน้ำยางสูงกว่าถึง 2.6 เท่าของกลุ่มผู้บริจาคโลหิต โดยการใช้ซีรัมของผู้ที่มี อิมมูโนโกลบุลินชนิด อี ตรวจสอบโปรตีนจากน้ำยาง สามารถระบุขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่น่าจะก่อให้เกิดอาการแพ้หรือแอลเลอเจนได้จากโปรตีนในน้ำยางสี่พันธุ์คือ RRIM600, GT1, PB5/51 และ KRS165 ซึ่งไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ยาง โปรตีนที่พบในการศึกษานี้เป็นโปรตีนที่มีขนาด 14, 18, 25.5, 30, 38 และ 52 kD โปรตีนที่เป็นแอลเลอเจนเหล่านี้ เมื่อนำไปแยกออกจากโปรตีนอื่น โดยวิธีเจลเพอร์มีเอชันโครมาโตกราฟี (gel permeation chromatography) แล้วนำมาฉีดเข้ากระต่ายสามารถทำให้กระต่ายสร้าง อิมมูโนโกลบุลินชนิด จี (IgG) ที่จำเพาะกับโปรตีนที่เป็นแอลเลอเจนเหล่านี้ โดยมีไตเตอร์ 8-16 ในสัปดาห์ที่ 7 ของการฉีด และนำไปใช้พัฒนาวิธีอิมมูโนแอสเสย์ (Immunoassay) แบบแข่งขันทางอ้อม (indirect competitive ELISA) พบว่าสามารถใช้ตรวจหาระดับของแอลเลอเจนในน้ำยาง 4 พันธุ์ และในโปรตีนที่สกัดจากถุงมือยาง และยางรถยนต์ได้ ในช่วง 10-100 นาโนกรัม โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเบี่ยงเบนในการทดลองพร้อมกันน้อยกว่า ร้อยละ 5 และเมื่อทำการทดลองหลายครั้ง ค่าสัมประสิทธิ์ความเบี่ยงเบนมีค่าน้อยกว่า ร้อยละ 10 ในการพัฒนาวิธีดอทบลอท (dot blot) ได้คิดค้นวิธีกำจัดสีพื้นของตัวอย่างด้วยวิธีถ่ายโอนโปรตีนจากตัวอย่างแผ่นยางไปสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลสทำให้การอ่านผลมีความแน่นอน นอกจากนี้ได้คิดค้นวิธีการลาเทกซ์พาร์ติเดิลแอคกลูติเนชันอินฮิบิชัน (latex particles agglutination inhibition) พบว่าสามารถใช้ตรวจหาโปรตีนแอลเลเจนได้ แต่อนุภาคยางที่ใช้เป็นตัววัดมีความเสถียรในช่วงเวลาจำกัด ผลสรุปจากงานวิจัยนี้แสดงว่าคนไทยทั้งที่มีสุขภาพดีและโดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยภูมิแพ้ทั่วไปมีความเสี่ยงต่อการเกิดอาการภูมิแพ้ต่อโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติเช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้ในต่างประเทศ จึงควรมีชุดตรวจสอบที่ จำเพาะต่อแอลเลอเจน ในน้ำยางธรรมชาติ สำหรับใช้ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

##C 525011 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCES
KEY WORD:
LATEX ALLERGEN / IMMUNOGLOBULIN E / IMMUNOASSAY

KITIPHONG HARNCHAROEN : DEVELOPMENT OF IMMUNOASSAY FOR THE DETECTION OF PROTEIN ALLERGENS IN NATURAL RUBBER PRODUCTS. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. JARIYA BOONJAWAT, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : MR. PIENPAK TASAKORN, Ph.D. 115 pp. ISBN 974-636-681-5.

Natural rubber latex has been identified as a source of protein allergens in many countries. A number of current information suggests that soluble proteins in latex cause hypersensitivity in sensitized individuals. The IgE-mediated sensitization to latex protein has been reported from mild local urticaria to fatal anaphylaxis. The health care workers and children with multiple surgery, especially spina bifida, have been shown as having increased risk for latex allergy. Little is known about the prevalence of latex allergy in Thai population and the population at risk. The objective of this studies was to determine the prevalence of the anti-latex protein IgE-antibodies. When relative risk between 352 healthy blood donors and 200 general allergic patients were compared, it had been found that 4.5% of the blood donor group had anti-latex protein IgE-antibodies whereas 11.0% of the general allergic group had such IgE. This result indicated that the allergic patients had 2.6 time higher risk than the healthy ones. By using the specific IgE positive sera, the molecular weight of protein allergens could be identified in four rubber clones: RRIM600, GT1, PB5/51 and KRS165. There was no difference among the clones observed. The identified-allergens were 14, 18, 25.5, 30, 38 and 52 kD polypeptides. They were fractionated from other soluble proteins in rubber latex clear sera by gel permeation chromatography. Pooled fractions of protein allergen could be used to immunize rabbits to produce allergen specific antisera (IgG) of titer 8-16 in the 7th week of immunization. An indirect competitive Enzyme-linked immunosorbent assay had been developed by the rabbits IgG antibodies and used for quantitative analysis of allergens in latex of the four rubber clones and in the extracted-soluble proteins of natural rubber gloves and tires. The coefficient of variation was lower than 5% in the intra-assay, and lower than 10 % in the inter-assay. Concentration of the allergens in the extractable protein could be determined in the range of 10-100 ng/well. A dot blot method had been modified to reduce interference by background color of the specimens through transfer of protein onto nitrocellulose film. In addition a latex particle agglutination inhibition method had been devised to detect protein allergens effectively. However, the latex particles were stable for a limited period. It was concluded that both healthy and allergic Thai people had a risk to allergy by latex protein with the same prevalence as reported in other countries. Therefore, a specific latex allergen detection kit was required for the quality control of natural rubber products.

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my deepest gratitude and appreciation to Assoc. Prof.Dr. Jariya Boonjawat, for her encouragements, suggestion, discussions, financial supports and helpful guidance throughout this study. I would like to acknowledge my thesis co-advisor Dr. Pienpak Tasakorn and also would like to acknowledge my thesis committee Assist. Prof.Dr. Tipaporn Limpaseni, Assoc.Prof.Dr. Preeda Chaisiri, Assoc.Prof.Dr. Thanit Kusamran from Dept. Biochemistry faculty of Science, Mahidol University and Dr. Suwirakorn Ophaswongse Dip. Board of Dermatology, Thailand and Cert. in Dermatology, U.C.S.F, USA, for their kind advices and invaluable suggestions.

I wish to acknowledge to STDB for financial supports and the scolarship. Special thanks are due to Rear Admiral Dr. Nipa Eusuparattana for her permision to collect the specimens in Phrapinklao Hospital, Naval Hospital. Special thanks due to all staffs of the Red Cross Branch, Phapinklao Hospital and staffs of Children Hospital for supplying the patient's sera. I would like to thank to staffs of Rayong Bangkok Rubber Co., Ltd. and Pong Rad Rubber Research Station for supplying Latex specimens. Also, I would like to thank the Department of Biochemistry Faculty of Science, Chulalongkorn University and the staffs for providing the facilities in laboratory, chemicals and equipment.

Finally, I wish to express my deepest thanks to my family, my teachers and friends in the Faculty of Science, and the Language Institute, Chulalongkorn University who always give me encouragement, knowledge and friendship.

# CONTENTS


| | | PAGE |
|---|---|---|
| THAI ABSTRACT | | i |
| ENGLISH ABSTRACT | | ii |
| ACKNOWLEDGMENT | | iii |
| LIST OF TABLES | | vi |
| LIST OF FIGURES | | vii |
| ABBREVIATION | | viii |
| CHAPTER 1 | INTRODUCTION | 1 |
| | 1.1 Background and literature review | 1 |
| | 1.2 Natural rubber | 3 |
| | 1.3 Allergy | 21 |
| | 1.4 Latex allergy | 29 |
| | 1.5 The rational and purposes of this studies | 34 |
| CHAPTER 2 | MATERIALS AND METHODS | 36 |
| | 2.1 Natural latex specimens | 36 |
| | 2.2 Preparation of latex proteins | 37 |
| | 2.3 Human serum samples | 39 |
| | 2.4 Specific anti-latex IgE antibody detection | 40 |
| | 2.5 Rabbit IgG against latex allergens preparation | 43 |
| | 2.6 Allergens detection with rabbit IgG | 46 |
| CHAPTER 3 | RESULTS | 49 |
| | 3.1 Natural latex specimen | 49 |
| | 3.2 Preparation of latex proteins form clear serum (C-serum) | 50 |
| | 3.3 Human serum samples | 56 |
| | 3.4 Latex allergens | 56 |
| | 3.5 Rabbit IgG against latex allergens | 66 |
| | 3.6 Specific detection of rubber allergens in NR product | 66 |
| CHAPTER 4 | DISCUSSION | 88 |

PAGE

REFERENCES..... 94

APPENDIX..... 101

BIOGRAPHY..... 115

# LIST OF TABLES


| TABLE | | PAGE |
|---|---|---|
| 1.1 | Taxonomy of the rubber tree | 8 |
| 3.1 | DRC of latex specimens and collection dates | 51 |
| 3.2 | Soluble protein concentration in C-sera of four-rubber clones | 52 |
| 3.3 | C-serum protein recovery after acetone precipitation and dialysis | 53 |
| 3.4 | Donor's occupational information | 58 |
| 3.5 | Occupational information of general allergy adults patients | 59 |
| 3.6 | Distribution of positive EAST results for anti-latex IgE in atopic and control 352 study subjects by age and sex | 60 |
| 3.7 | The frequency of latex protein antigens that react with specific IgE in atopic and control sera | 63 |
| 3.8 | Number of latex proyein antigens that react with specific IgE sera from atopic and control groups | 63 |
| 3.9 | EAST positive results classified by occupation | 65 |
| 3.10 | EAST positive results classified by allergic symptom | 65 |
| 3.11 | Allergen detection in natural latex | 75 |
| 3.12 | Amount of allergen detection in samples of natural latex examination gloves and used-rubber tires | 77 |
| 3.13 | Specificity of indirect competitive ELISA | 78 |
| 3.14 | Presition of the indirect competitive ELISA | 79 |

# LIST OF FIGURES


| FIGURE | | PAGE |
|---|---|---|
| 1.1 | World natural rubber production and major rubber producers | 4 |
| 1.2 | Latex rubber tapping | 5 |
| 1.3 | The general organization of *Hevea brasiliensis* bark at tapping cut level. | 13 |
| 1.4 | Outline of rubber biosynthesis in the latex of the rubber tree | 16 |
| 1.5 | Formation of isopentenyl diphosphate from acetyl-CoA in rubber biosynthesis | 17 |
| 1.6 | Polymerisation of isopentenyl diphosphate to form rubber | 18 |
| 1.7 | Role of the immune system in allergy | 26 |
| 1.8 | Diagram of heavy chain genes IgM-expressing mouse B cells | 27 |
| 2.1 | Immunostaining procedure | 42 |
| 2.2 | Illustration of indirect anti-latex allergen ELISA | 45 |
| 3.1 | SDS-PAGE analysis of C-serum proteins in 15% polyacylamide gell | 55 |
| 3.2 | Positive EAST of the test sera | 61 |
| 3.3 | IgE immuno blots of acetone presipitation proteins | 62 |
| 3.4 | Comparision of the distribution of C-serum latex protein | 67 |
| 3.5 | Double diffusion gel of rabbit anti-latex allergen according to Ouchterlony (1980) method | 68 |
| 3.6 | Kinetics of appearance of anti-latex C-serum allergens immunoglobulin G (IgG) | 69 |
| 3.7 | Optimization of anti-latex allergen IgG antobody | 70 |
| 3.8 | A pooled allergen curve of indirect competitive ELISA | 73 |
| 3.9 | Correlation between % completition of indirect competitive ELISA and latex total protein | 74 |
| 3.10 | Correlation between % completition of indirect competitive ELISA and protein extracted from gloves and used tires | 76 |
| 3.11 | The latex dot blot protein assay | 82 |

PAGE

3.12 Modified dot blot assay..... 83

3.13 Filter paper saturated with allergen for positive control..... 84

3.14 Modified-dot blot specificity..... 85

3.15 Latex particles agglutination completition technique..... 86

3.16 Specificity of latex particles agglutination inhibition technique..... 87

# ABBREVIATION

| | |
|---|---|
| $A_{405}$ | Absorbancy at wavelength of 405 nanometer |
| cfu | Colony forming unit |
| C-serum | Clear serum |
| cv | coeffician variation |
| DRC | Dry rubber content |
| EAST | Enzyme allergosorbentest test |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| FCA | Freund's complete adjuvant |
| FDA | Food drug administration |
| FIA | Freund's incomplete adjuvant |
| g | Gram |
| HA | High ammonia latex |
| hr | Hour |
| hrs | Hours |
| ha | Hectare |
| HIV | Human immunodeficiency virus |
| IFN | Interferon |
| IgA | Immunoglobulin A |
| IgG | Immunoglobulin G |
| IgD | Immunoglobulin D |
| IgE | Immunoglobulin E |
| IgM | Immunoglobulin M |
| IL | Interleukin |
| Jan. | January |
| kD | KiloDalton |
| km | Kilometer |
| l | Liter |

| | |
|---|---|
| LP | Latex particle |
| M | Molarity |
| mg | Milligram |
| ml | Milliliter |
| min | Minute |
| mM | Millimolarity |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| ng | Nanogram |
| nm | Nanometer |
| NR | Natural rubber |
| NRL | Natural rubber latex |
| NSS | Normal saline solution |
| PAGE | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| PBS | Phosphate buffer saline |
| RAST | Radio allergosorbent test |
| REF | Rubber elongation factor |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| TEMED | N,N,N′,N′-tetramethylenediamine |
| Tris | Tri hydroxymethyl aminomethane |
| TSC | Total solids content |
| v/v | Volume by volume |
| w/w | Weight by weight |
| $^{o}C$ | Degree Celcius |
| µg | Microgram |
| µl | Microliter |