# การหาปริมาณเลกตินในรากและใบของข้าว (Oryza sativa L.) โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์

นาย ศรีเมฆ ชาวโพงพาง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-536-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15629

# Determination of Lectin in Root and Leaf of Rice (*Oryza sativa* L.) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Mr. Srimake Chaopongpang

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1989

ISBN 974-576-536-8

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Determination of Lectin in Root and Leaf of Rice (Oryza sativa L.) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. |
| By | Mr. Srimake Chaopongpang |
| Department | Biochemistry |
| Thesis Advisor | Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D. |
| | Assistant Professor Preeda Chaisiri, Ph.D. |

---

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

.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associate Professor Sanha Panichajakul,Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Jariya Boonjawat,Ph.D.)

.....Thesis Coadvisor

(Assistant Professor Preeda Chaisiri,Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Jiraporn Limpananont,Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ศรีเมฆ ชาวโพงพาง : การหาปริมาณเลกตินในรากและใบของข้าว (Oryza sativa L.) โดยวิธีเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนต์แอสเสย์(Determination of Lectin in Root and Leaf of Rice (Oryza sativa L.) by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. จริยา บุญญวัฒน์ ผศ.ดร. ปรีดา ชัยศิริ 109 หน้า

ทำการสกัดเลกตินจากเอมบริโอของข้าวพันธุ์ กข.7 และกข.25 ได้ความบริสุทธิ์ถึง 1,637 และ 1,362 เท่าตามลำดับ ได้ผลิตแอนติบอดีต่อเลกตินของข้าวพันธุ์ กข.7 ซึ่งมีค่าไตเตอร์เท่ากับ 16 จากการทำ a gar gel diffusion พบว่าแอนติบอดีต่อเลกตินของข้าวพันธุ์ กข.7 สามารถทำปฏิกริยาข้ามกับเลกตินของข้าว(Oryza sativa) พันธุ์อื่นๆได้ 30 พันธุ์ ข้าวป่าอีก 2 ชนิดรวมทั้งเลกตินจากข้าวสาลี(Wheat Germ Agglutinin) และทำปฏิกิริยาข้ามกับ เลกตินของข้าวพันธุ์ กข.25 ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อนำแอนติบอดีต่อเลกตินข้าวพันธุ์ กข.7 นี้ร่วมกับแอนติบอดีแพะต่ออิมมูโนกลอบบูลิน กระต่ายที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสซีนไอโซไธโอไซยาเนต เพื่อหาตำแหน่งของเลกตินในราก และใบของกล้าข้าวอายุ 4 และ 7 วัน ที่เจริญในที่มืด และมีแสงสว่าง พบเลกตินที่หมวกราก ปลายรากขนอ่อนและตามผิวของเซลล์บุผิวชั้นนอกของราก ส่วนที่ใบพบเลกตินเฉพาะที่รูคายน้ำ (hydathode)และปากใบเท่านั้น

ได้พัฒนาวิธี ELISA ทางอ้อมขึ้นเพื่อหาปริมาณเลกติน โดยใช้แอนติบอดีต่อเลกตินข้าวพันธุ์ กข.7 และแอนติบอดีแพะต่ออิมมูโนกลอบบูลินกระต่ายที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส วิธีนี้ให้ความไวสูงถึง 10 นาโนกรัมเลกตินต่อมิลลิลิตร ช่วงที่วัดได้ 10-60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ความถูกต้องสูงคือมีเปอร์เซนต์รีคอบเวอรี 92-98% และ%CV ภายในการทดลองเดียวกัน 2-7 % ระหว่างทดลอง 2-11 % ผลการหาปริมาณเลกตินในเอมบริโอของข้าว 28 พันธุ์ โดยวิธี ELISA ให้ค่าเฉลี่ยของ เลกติน 3218±1350 นาโนกรัม/50 เอมบริโอ การหาปริมาณเลกตินในราก และใบของกล้าข้าวอายุ 4-7 วันนั้น ได้พัฒนาวิธี ELISA ที่ดัดแปลงโดยที่เพลทต้องผ่านการเคลือบด้วยโอวัลบูมินก่อนซึ่งมีความไวเท่าวิธีแรกแต่ช่วงที่วัดได้ 10-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ % CV ในการทดลองเดียวกัน 4-11 % ระหว่างการทดลอง 2-13 % ปริมาณเลกตินในเอมบริโอข้าวที่หาโดยวิธีดัดแปลงนี้ได้ค่าใกล้เคียงกับวิธีเดิม คือมีความแตกต่างกัน 2-13 % และเมื่อใช้วิธีดัดแปลงนี้หาปริมาณเลกตินในใบของกล้าข้าวพันธุ์ กข.7พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างกล้าข้าวที่เจริญในที่มืดและที่มีแสงสว่าง ปริมาณของเลกตินสูงสุดในรากและใบสังเกตได้ชัดในข้าวอายุ 4 วัน การเปรียบเทียบเลกตินในกล้าข้าว 8 พันธุ์ พบว่าข้าวพันธุ์ นางมล เอส 4 ให้ค่าเลกตินสูงสุดทั้งในใบและราก (4230±1135 และ 92±20 นาโนกรัมต่อ 100 ต้น ตามลำดับ) และค่าต่ำสุดพบในใบ และรากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (589±151 และ 5 นาโนกรัมต่อ 100 ต้น ตามลำดับ) ปริมาณเลกตินในกล้าข้าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในใบและราก เมื่อเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ 2 และ 20 มิลลิโมลาร์ ลงในน้ำที่ใช้เลี้ยงกล้าข้าว

จากการศึกษาปฏิกิริยาข้ามของข้าว 32 สายพันธุ์ กับแอนติบอดีต่อเลกตินข้าวพันธุ์ กข.7 พบว่าบางพันธุ์มีลักษณะของเลกตินเหมือนกับพันธุ์ กข.7 และบางพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับพันธุ์ กข.7 นอกจากนี้บางพันธุ์ยังมีเลกตินมากกว่าหนึ่งชนิด เลกตินจากข้าวทุกพันธุ์ที่ทดสอบรวมทั้งข้าวสาลี มีปฏิกิริยาข้ามกับเลกตินข้าวพันธุ์ กข.7 ปริมาณเลกตินพบสูงสุดในเอมบริโอ และลดลงตามลำดับเมื่อมีการงอกของต้นกล้าข้าว และเลกตินในรากวิสามัญของข้าวในระยะออกรวงสามารถตรวจพบได้เฉพาะที่ปลายราก

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

SRIMAKE CHAOPONGPANG : DETERMINATION OF LECTIN IN ROOT AND LEAF OF RICE (Oryza sativa L.) BY ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JARIYA BOONYAWAT, Ph.D., ASSIS. PROF. PREEDA CHAISIRI, Ph.D. , Ed.D. 109 pp.

Lectin was purified from embryos of rice cv RD 7 and RD 25 to the purity of 1,637 and 1,632 fold of crude extracts respectively. Production of antibody against lectin was achieved yielding serum titer 16 for cv RD 7, and it was able to cross-react with lectin RD 25 completely by technique of agar gel diffusion. The antibody showed cross-reaction with lectin from 30 cultivars (Oryza sativa L.) 2 wild rice species and WGA (Wheat Germ Agglutinin). The antibody against lectin RD 7 was used in combination with FITC-goat antirabbit immunoglobulin to localize the lectin in root and leaf of rice seedlings on day 4 and day 7 grown under dark condition. Lectin was located on the root cap, root hair tip, and also on epidermal cells. In the leaf, lectin was observed on hydathode and stoma.

The indirect ELISA method was developed using lectin RD 7 antibody and goat antirabbit immunoglobulin conjugated with alkaline phosphatase which showed the high sensitivity of 10 ng lectin/ml, and assay range of 10-60 ng/ml , its accuracy was high(92-98 % recovery), with % CV of intra-assay 2-7%and interassay of 2-11%. Lectin can be quantitated in embryo of 28 rice cultivars by ELISA exhibiting the average value of 3218$\pm$ 1350 nanogram/50 embryos. The quantitative determination of root and leaf lectin in 4-7 day old seedling required modification of ELISA method by albumin precoating which gave the same sensitivity as the first method, but wide assay range of 10-100 ng/ml. The per cent CV of intra-assay and interassay was 4-11% and 2-13% respectively. It was found by this method that seedlings of rice cv RD 7 grown under dark and light condition differed in leaf lectin content. Maximum lectin content in leaf and root were significantly observed on day 4. Comparison of lectin contents in seedlings among 8 rice cultivars, showed the highest value in NMS 4 both in leaf and root (4230$\pm$ 1135 and 92$\pm$20 ng/100 plants), and the lowest in KDML 105 (598$\pm$151 and 5 ng/100 plants) . Lectin inseedling was significantly decreased both in the leaf and root when grown under 2 and 20 m$MNH_4Cl$.

Study on the cross-reaction among 32 rice varieties to antibody against lectin RD 7 , indicated that some varieties contained lectin identical to RD 7, and the others are partially identical, however some varieties contained lectin more than one form . Lectin from all varieties of rice tested and wheat(WGA) shared a common antigenic determinant to lectin RD 7. The quantity of lectin was comparatively high in embryo , and gradually decreased in developmental seedling. In flowering stage lectin was merely detected in adventitious root tip.

ภาควิชา ชีวเคมี ..... ลายมือชื่อนิสิต ..... Srimake Chaopongpang

สาขาวิชา ชีวเคมี .....

ปีการศึกษา 2531 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... Jariya Boonyawat

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude to my advisor, Dr. Jariya Boonjawat, and Dr. Preeda Chaisiri for their kindness, understanding, invaluable supervision, encouragement, and financial supports throughout my study.

I am very grateful to Associate Professor Sanha Phanichajakul, and Associate Professor Jiraporn Limpananont for serving as thesis committee, and their criticisms and valuable suggestion

Thanks are also expressed to all staff and member students of Biochemistry Department for their help in laboratory with sincere and friendship.

Finally, I wish to thank Dr. Vorapee Suwatanaviroj for her kindness supports of my study, and thank my all coworkers for their kindness throughout my research. I wish to thank Mr. Adisorn Sawetvivatana and his relatives for providing residence over this research period.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURES.....xii

CHAPTER

I INTRODUCTION

1.1 Rice.....1

1.2 Development of rice plant.....3

1.3 Disease of rice.....6

1.4 Lectin.....7

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Rice.....20

2.2 Lectin.....20

2.3 Lectin purification.....23

2.4 Hemagglutination assay.....26

2.5 Protein determination.....27

2.6 Polyacrylamide gel electrophoresis.....28

2.7 Preparation of antisera against rice lectin cv RD 7 and RD 25 .....29

Page

2.9 Preparation of crude extract lectin for immunodiffusion.....32

2.8 Immunodiffusion technique.....30

2.10 Immunofluorescent localization of rice lectin in leaf and root .....32

2.11 Development of ELISA procedure.....34

III RESULTS

3.1 Purification of rice lectin (cv RD 7 and RD 25)....40

3.2 Homogeneity of rice lectin.....45

3.3 Antibody production.....47

3.4 Lectin distribution in root and leaf of rice.....49

3.5 Relationship among lectins of different rice varieties.....53

3.6 Development of ELISA method.....58

3.7 Lectin contents in embryo of various rice cultivars67

3.8 Lectin in vegetative tissues of developmental rice seedlings cv RD 7.....67

3.9 Comparison of lectin in vegetative tissues among varieties of rices.....74

3.10 Effect of exogenous nitrogen on lectin content....77

3.11 The role of lectin in plant protection.....77

page

IV DISCUSSION

4.1 Purification of rice lectin.....79

4.2 Antibody against rice lectin.....80

4.3 Distribution of lectin in different tissues of rice.....82

4.4 Interrelationship of lectin among rice varieties...83

4.5 Development of ELISA method.....84

4.6 Lectin content in embryo.....86

4.7 Lectin in developmental rice seedling and effect of $NH_4Cl$.....86

REFERENCES.....90

APPENDIX I.....99

APPENDIX II.....100

APPENDIX III.....103

BIOGRAPHY.....109

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# LIST OF TABLES

Page

Table 1.1 Compilation of some properties of plant lectins.....10

Table 1.2 The practical techniques used for lectin assay in plant tissues.....12

Table 1.3 Some properties of Gramineae lectin.....16

Table 2.1 Rice varieties used in this research project.....21-22

Table 3.1 Purification of rice lectin from embryo of rice (Oryza sativa L., cv RD 7 and Rd 25).....41

Table 3.2 The list of rice varieties, species and WGA in circumscribed wells as shown in Fig.3.9.....55

Table 3.3 The precision of the ELISA method.....65

Table 3.4 The per cent error of internal standard.....66

Table 3.5 Lectin content in embryo of rice.....68

Table 3.6 Comparison of normal and modified procedures for lectin determination in vegetative tissues of rice seedlings (RD 7).....69

Table 3.7 Comparison of lectin content in embryo of rice determined by both ELISA method.....72

Table 3.8 Lectin distribution in root and leaf of rice (RD 7) seedlings under light and dark conditions.....73

Table 3.9 Lectin content in root and leaf of 8 rice cultivars.76

Table 3.10 Effect of $NH_4Cl$ on lectin content in root and leaf..78

page

Table 4.1 Resistant and susceptible rice cultivars.....88

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# LIST OF FIGURES

Page

Figure 1.1 Seedling of rice on day 7 grown under dark.....5

Figure 3.1 Separation of rice lectin on chitin column.....42

Figure 3.2 The elution profiles of lectin on SP-Sephadex ion exchange column.....43

Figure 3.3 Polyacrylamide gel electrophorogram of rice lectin RD 7 and RD 25.....46

Figure 3.4 Immunization scheme and antibody titer against lectin RD 7 and RD 25.....48

Figure 3.5 Distribution of lectin on the root surface of rice RD 7.....51

Figure 3.6 Distribution of lectin on the leaf surface of rice (RD 7).....53

Figure 3.7 Cross-reactivity between antibody against lectin RD 7 and other varieties.....56

Figure 3.8 Titer determination of the first antibody against lectin.....59

Figure 3.9 Optimum dilution curves for lectin ranging from Ø-1ØØ ng/well.....61

Figure 3.1Ø Optimum dilution curves for lectin ranging from Ø-1Ø ng/well.....63

Figure 3.11 Standard curve of modified ELISA.....71