การโคลนนิ่งและสมบัติของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสจากน้ำยางของยางพารา (*Hevea brasiliensis*)

Cloning and Characterization of cDNA Clone Encoding Protease Inhibitor from Latex of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*)

ไอนิง มูซอ

Aining Musoor

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Prince of Songkla University
2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การโคลนนิ่งและสมบัติของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสจากน้ำยางของยางพารา (*Hevea brasiliensis*)

ผู้เขียน นางสาวไอนิง มูซอ

สาขาวิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……..……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

คณะกรรมการสอบ

…… ……..ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)

…….....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

…….....กรรมการ

(ดร.สุดารัตน์ กรึงไกร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

……..……

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การโคลนนิ่งและสมบัติของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสจากน้ำยางของยางพารา (*Hevea brasiliensis*)

ผู้เขียน นางสาวไอนิง มูซอ

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2550

บทคัดย่อ

การศึกษา cDNA library ของน้ำยางพารา พบยีนเส้นเต็มยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (*H*b-PI) มีขนาด 210 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนจำนวน 70 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 7.5 กิโลดาลตัน พบการแสดงออกสูงในวันแรกของการกรีด และระดับการแสดงออกมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการกรีดเพิ่มขึ้น เมื่อนำมาแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* โดยโคลนเข้ากับเวคเตอร์ pQE-40 และกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม *H*b-PI จะได้โปรตีนลูกผสม *H*b-PI ที่เชื่อมกับโปรตีน DHFR ทำให้มีขนาดรวม 33.5 กิโลดาลตัน ผลจากการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส พบว่า โปรตีนลูกผสม *H*b-PI สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน แต่ไม่ยับยั้งเอนไซม์ไคโมทริปซิน ซับทิลิซิน เอ และปาเปน โปรตีนลูกผสมดังกล่าวปริมาณ 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัม สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัม ได้ร้อยละ 9.5, 22.5, 36 และ 35.5 ตามลำดับ โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้โปรตีนลูกผสม *H*b-PI มีกิจกรรมสูงสุดอยู่ใน Tris-HCl buffer pH 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้โปรตีนลูกผสม *H*b-PI ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *M. luteus* และ *S. aureus* แต่ไม่แสดงสมบัติในการต่อต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในการตรวจสอบด้วยการเลี้ยงเซลล์ lymphoid ของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamai*)

Thesis Title	Cloning and Characterization of cDNA Clone Encoding Protease Inhibitor from Latex of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*)
Author	Miss Aining Musoor
Major Program	Biochemistry
Academic year	2007

ABSTRACT

cDNA library of *H. brasiliensis* was performed and found full-length of Protease Inhibitor (*H*b-PI) cDNA. An open reading frame encoding 210 bp was translated to be peptide length 70 amino acids. The molecular weight of *H*b-PI protein was 7.5 kDa. The expression level of *H*b-PI gene in 1 day tapping latex was highest and level was decreased when the day of tapping was increased up. The *H*b-PI gene was cloned to express in *E. coli* via pQE-40 expression vector. The recombinant *H*b-PI (r*H*b-PI) was fused with Dihydrofolate reductase (DHFR) proteins, so the molecular weight of this protein was 33.5 kDa. The inhibitory activity of r*H*b-PI was tested and the result showed that r*H*b-PI had the ability to inhibit only trypsin and unable inhibit chymotrypsin, subtilicin A and papain. The amount of r*H*b-PI 0.25, 0.50, 0.75 and 1.00 mg showed the ability to inhibit 0.02 mg trypsin for 9.5%, 22.5%, 36% and 35.5%, respectively. The suitable condition for highest activity was perfomed in Tris-HCl buffer pH 9 at 37°C. Beside that, r*H*b-PI 10 mg/ml was antimicrobial on Gram-positive bacterial, *M. luteus* and *S. aureus*, but was not showed the antiviral property on WSSV, investigation by culteration of lymphoid cell from pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamai*).

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ในการให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือด้านการค้นคว้าข้อมูล การทำวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ รวมทั้งทุกๆ เรื่องที่คอยพร่ำสอน ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย รวมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ และ ดร.สุดารัตน์ กรึงไกร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลา ในการตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี และสถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการวิจัย รวมถึงทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประเภททุนอุดหนุนโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบพระคุณ แดดี้ปา และมามี้แว ที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจมาตลอด ขอบคุณตัวเองที่มีความพยายาม ขอบคุณพวกเราชาว BT 310 ขอบคุณเพื่อนๆ ที่อยู่เคียงข้างเสมอ ขอบคุณสุภาพบุรุษตัว บ. สำหรับกำลังแรงกายและแรงใจที่ดีเสมอมา ขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอน ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกท่านที่มิได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ท้ายสุดขอกล่าวสรรเสริญและขอบคุณพระเจ้า (อามีน)

ไอนิง มูซอ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(5)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพ	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(9)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	17
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	18
วัสดุ	18
อุปกรณ์	23
วิธีการทดลอง	24
3. ผลการทดลอง	35
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	49
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	53
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก	64
ประวัติผู้เขียน	68

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของ Protease inhibitors	6
2	ตัวอย่าง Protease inhibitors ที่มีรายงานการศึกษาในพืชชนิดต่างๆ	7
3	Pathogenesis-related protein กลุ่มต่างๆ	11
4	พืชดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน Protease inhibitors จากแหล่งต่างๆ	16
5	ลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	21
6	สภาวะอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ Real time PCR	26
7	สารประกอบในปฏิกิริยา PCR	27
8	สภาวะอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR	27
9	ส่วนประกอบของโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส	31
10	บัฟเฟอร์ต่างๆในแต่ละช่วง pH ที่ใช้ในการศึกษา	32

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกการเข้าจับของ Protease inhibitors กับเอนไซม์โปรตีเอส	4
2	ระบบป้องกันตัวเองของพืชเมื่อถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้า	10
3	วิถี Wound signal transduction pathway	12
4	สารสื่อสัญญาณของเซลล์ข้างเคียง (Systemic signals)	14
5	ลำดับเบสและกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของยีน *Hb*-PI	35
6	เปรียบเทียบลำดับของยีน *Hb*-PI	37
7	เปรียบเทียบเปปไทด์จากการแปลรหัสของยีน *Hb*-PI	38
8	ค่า Relative mRNA expression level ของยีน *H*b-PI ในน้ำยางพารา ที่ระยะการกรีดต่างกัน	39
9	แถบ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *H*b-PI ด้วยเทคนิค PCR และการทำบริสุทธิ์ ยีน *H*b-PI	40
10	พลาสมิดที่มีชิ้นยีน *H*b-PI	41
11	แถบโปรตีนส่วนที่ละลายจากแบคทีเรียลูกผสม pQE และ pQE-*H*b-PI	42
12	แถบโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายจากแบคทีเรียลูกผสม pQE และ pQE-*H*b-PI	43
13	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Trypsin โดยโปรตีนลูกผสม *H*b-PI	44
14	กิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ที่ทำการทดสอบที่ระดับ pH ต่างๆ	45
15	กิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ที่ทำการทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ	46
16	จำนวน Copy ของไวรัส WSSV ที่วัดได้จากแต่ละชุดการทดลอง	48

ตัวย่อและสัญลักษณ์

%	=	percent
AMV	=	avian myeloblastosis virus
β	=	beta
bp	=	basepair
BSA	=	Bovine serum albumin
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
DI water	=	deionized water
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medim
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxyribonucleoside triphosphate
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
FCS	=	Fetal Calf Serum
IPTG	=	Isopropyl ß-D-thiogalacto-pyranoside
kDa	=	kilodalton
LB	=	Luria Bertaini
N	=	Normality
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
M	=	Molarity
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
PBS	=	phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pH	=	- Log hydrogen ion concentration
RNA	=	ribonucleic acid
RNase	=	Ribonuclease

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	=	N,N,N′,N′-tetrametyl-ethylenediamine
TCA	=	Trichloroacetic acid
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethyl) aminoethane hydrochloric acid
U	=	unit (s)
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่ประเทศไทยสามารถผลิตและส่งออกเป็นรายใหญ่ที่สุดในโลกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 เป็นต้นมา (เจริญ และคณะ, 2549) ซึ่งทำเงินรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมหาศาล จึงทำให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับยางพาราในหลายๆด้าน อาทิเช่น การปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ยางพาราที่ดี ให้ผลผลิตสูง ต้านทานโรคและศัตรูพืช มีคุณภาพน้ำยางดี ตลอดจนการนำผลผลิตไปใช้ประโยชน์ ซึ่งการใช้ประโยชน์จากน้ำยางพาราส่วนใหญ่จะใช้ในรูปของน้ำยางดิบเพื่อขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ถุงมือ ล้อรถยนต์ ฟองน้ำยางธรรมชาติ และ กาวยาง เป็นต้น นอกจากนี้ได้มีการศึกษาประโยชน์ทางอื่นจากองค์ประกอบที่มีในน้ำยางพาราอีกมากมายทั้งในระดับโปรตีนและระดับยีน เช่น การเสนอใช้การแสดงออกของยีนในน้ำยางพารามาเป็นตัวบ่งชี้ผลผลิตยางตั้งแต่ในระยะต้นกล้า (เปลื้อง, 2549) ซึ่งคาดว่าจะเป็นประโยชน์ในการช่วยลดระยะเวลาของกระบวนการพัฒนาสายพันธุ์ยางพารา หรือการสกัดเอนไซม์ ต่างๆ จากน้ำยางพาราเพื่อศึกษาสมบัติและการประยุกต์ใช้ (Yosof *et al*., 1998; Subroto *et al*., 1996; Jakel *et al*., 2003)

จากการศึกษาของ Martin (1991) พบเอนไซม์หลายชนิดที่มีสมบัติในการทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับการค้นพบยีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเองของพืช (defense-related genes) เช่น disease-resistant-related protein และ protease inhibitor (สารภี, 2550)

ตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (Protease inhibitor) เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ทั้ง พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Fan and WU, 2005) โดยทั่วไปจะเป็นโปรตีนขนาดเล็ก พบสะสมมากในเมล็ดและหัวหรือหน่อ (storage tissue) ของพืช (De Leo *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังพบกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆได้ เนื่องจากการถูกทำลายจากจุลินทรีย์ การกัดกินของแมลง หรือ การเกิดบาดแผล (Hermosa *et al*., 2006) Protease inhibitors สามารถทำหน้าที่ได้หลายรูปแบบ แต่ที่สำคัญคือ การเป็นเอนไซม์สำคัญในระบบป้องกันตัวเองของพืช (plant defense) ทำให้มีการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน Protease inhibitor อยู่ เพื่อให้พืชนั้นๆมีความต้านทานโรคจากจุลินทรีย์หรือต้านทานต่อแมลงศัตรูพืช (Dunaevsky *et al*., 2005) นอกจากนี้ Protease inhibitors ยังเข้าไปมี

บทบาทเกี่ยวกับสารที่ใช้ในการบำบัด เช่น สารต่อต้านจุลินทรีย์และสารต่อต้านไวรัส (Patick and Potts, 1998)

การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะประยุกต์ใช้ประโยชน์จากยีน *Hevea brasiliensis* Protease inhibitor (*Hb*-PI) ที่ค้นพบในน้ำยางพาราจากการศึกษาของสารภี (2550) โดยทำการโคลนและสังเคราะห์โปรตีนลูกผสมดังกล่าว เพื่อศึกษาสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส รวมทั้งความสามารถในการเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์และสารต่อต้านไวรัส

บทตรวจเอกสาร

1. ยางพารา

ยางพารา (Para rubber) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hevea brasiliensis* ถูกกำหนดโดย Dr. Jean Muller นักพฤกษศาสตร์ชาวสวิส (สมพงศ์, 2536) สามารถจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Division	Spermatophyta
Sub-division	Pteropsida
Class	Angiospermae
Sub-class	Dicotyledoneae
Order	Euphorbiales
Family	Euphorbiaceae
Genus	*Hevea*
Species	*brasiliensis*

จัดเป็นไม้ยืนต้นทรงพุ่ม มีระบบรากแบบ tap root system คือ มีรากแขนงแตกออกจากรากแก้ว ลำต้นมีขนาดใหญ่ประมาณ 1 เมตร ความสูงประมาณ 15-20 เมตร เปลือกมีสีคล้ำ บริเวณเปลือกอ่อนจะมีท่อน้ำยาง (latex vessels หรือ laticifer) อยู่มาก (นพรัตน์, 2536)

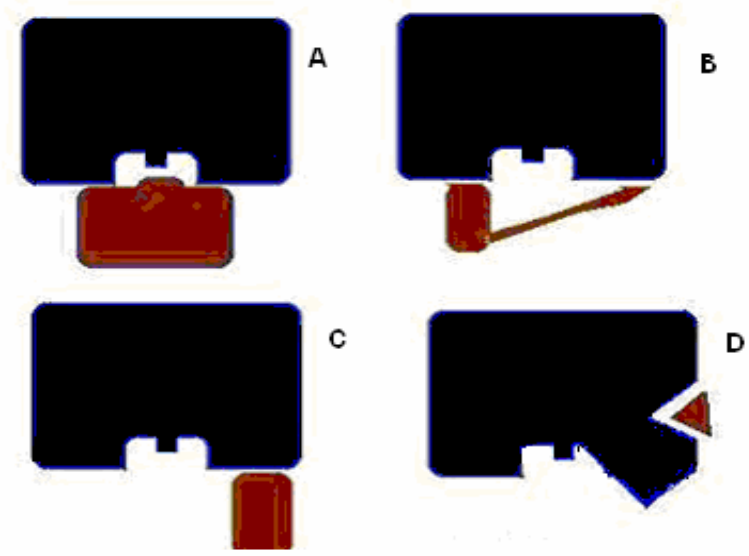
น้ำยางเป็นส่วนประกอบของไซโตพลาสซึมที่อยู่ภายในท่อน้ำยาง (Kush *et al*.,1990) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน ออกซิเจน และซัลเฟอร์ (Perrella and Gaspari, 2002) มีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม อยู่ในรูปของสารแขวนลอย โดยมีเนื้อยางประมาณร้อยละ 25-45 ของน้ำยางสด มีค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5-7.0 ความหนาแน่น 0.975-0.980 g/cm^3 (ไพโรจน์และทรงธรรม, 2549) จากการศึกษาส่วนประกอบของน้ำยางพาราโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง พบว่าน้ำยางจะแยกออกเป็นส่วนหลักๆ ได้แก่ ชั้นของเนื้อยาง ชั้นของไซโตซอล หรือเรียกว่า C-serum และชั้นของลูทอยด์ (Jakel *et al*., 2003)

จากพืชชั้นสูงที่สามารถผลิตน้ำยางได้กว่า 2,000 ชนิด พบว่า น้ำยางจากต้นยางพาราเป็นเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่มีการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Vankatachalam *et al*., 2007) ทั้งนี้เนื่องจากยางพาราสามารถให้ผลผลิตน้ำยางได้มากที่สุด และมีเนื้อยางที่มีคุณสมบัติทาง

วิทยาศาสตร์ดีกว่ายางชนิดอื่นๆ (กรมส่งเสริมการเกษตร, มปป.) และคุณสมบัติเด่นของน้ำยางพาราที่ยางสังเคราะห์ไม่สามารถเลียนแบบได้อย่างสมบูรณ์นั่นคือ ความยืดหยุ่น ความกระเด้งตัว และความทนทานต่อแรงดึง (อาซีซัน และคณะ, 2549)

2. Protease inhibitors

Protease inhibitors ส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมักเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำ (Roa and Soresh, 2007) การทำงานโดยทั่วไปของ Protease inhibitors คือ การยับยั้งหรือลดอัตราเร่งของปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) โดยจะเข้าไปจับกับเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Protease) แต่ละชนิดอย่างจำเพาะเจาะจง ในบริเวณ catalytic site ของเอนไซม์โปรตีเอส (Tremacoldi and Pascolati, 2002) เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่จับกันอย่างเสถียรด้วยพันธะไฮโดรเจน (Bode and Huber, 1992) กลไกของ Protease inhibitors ในการเข้าจับกับเอนไซม์โปรตีเอสมี 4 รูปแบบ (Habib and Khalid, 2007) คล้ายๆกับตัวยับยั้งทั่วๆไป นั่นคือ (1) การเข้าไปกีดขวางบริเวณ catalytic site ของเอนไซม์โปรตีเอสโดยตรง (2) การกีดขวางบริเวณ catalytic site ของเอนไซม์โปรตีเอสโดยอ้อม (3) การเข้าจับกับเอนไซม์โปรตีเอสบริเวณข้างๆหรือภายนอกบริเวณ catalytic site และ (4) การเข้าจับแบบ Allosteric (ภาพที่ 1) โดย Protease inhibitors ส่วนใหญ่จะเข้าจับกับเอนไซม์โปรตีเอสบริเวณ catalytic site โดยตรง (Tiffin and Guat, 2001)



ภาพที่ 1 กลไกการเข้าจับของ Protease inhibitors กับเอนไซม์โปรตีเอส (A) การเข้าไปกีดขวางบริเวณ catalytic site ของเอนไซม์โปรตีเอสโดยตรง (B) การกีดขวางบริเวณ catalytic site ของ

เอนไซม์โปรตีเอสโดยอ้อม (C) การเข้าจับกับเอนไซม์โปรตีเอสบริเวณข้างๆหรือภายนอกบริเวณ catalytic site (D) การเข้าจับแบบ Allosteric (Habib and Khalid, 2007)

การแบ่งกลุ่ม Protease inhibitors จะแบ่งตามชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสที่ตัวยับยั้งเข้าไปยับยั้งการทำงานได้ โดยแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ Serine Protease inhibitors, Cysteine Protease inhibitors, Metallo-Protease inhibitors และ Aspartic Protease inhibitors (Ryan,1990) ในแต่ละกลุ่มของ Protease inhibitors ยังสามารถแบ่งย่อยออกได้อีก (ตารางที่ 1) ตามความเหมือนของลำดับเบส (Laskoski and Kato, 1980 อ้างโดย Bode and Huber, 1992) โดยเฉพาะในกลุ่ม Serine Protease inhibitors ซึ่งเป็นชนิดที่มีรายงานการพบมากในพืชหลากหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง มะเขือเทศ ทานตะวัน ข้าวบาร์เลย์ และถั่วเหลือง เป็นต้น (Mello *et al.,* 2002; Habib and Khalid, 2007) และ Cysteine Protease inhibitors เป็นชนิดที่พบมากรองลงมา เช่น Cystatin ซึ่งได้มีการสกัดและทำการศึกษาสมบัติในพืชหลากหลายชนิด อาทิ ข้าวสาลี ทานตะวัน ถั่วเหลือง และข้าวโพด (Kuroda *et al*., 2001; Yoza *et al*.,, 2002; Connors *et al*., 2002; Haq *et al*., 2004) ส่วน Metallo-Protease inhibitors มีรายงานว่าพบในมันฝรั่งและมะเขือเทศ (Fan and Wu, 2005) Koiwa และคณะ (1997) กล่าวว่า Metallo-Protease inhibitors สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Carboxypeptidase A และ B ในกรณีของ Aspartic Protease inhibitors พบการศึกษา Protease inhibitors ในชนิดนี้ไม่มากนักเนื่องจากว่ามีปรากฏอยู่น้อยในพืช แต่ก็ยังมีรายงานว่า Protease inhibitors ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ Catheppsin D ได้ (Koiwa *et al*., 1997)

ตารางที่ 1 ชนิดของ Protease inhibitors

ชนิด	กลุ่มย่อย
Serine Protease inhibitors	Potato inhibitor 1 family Potato inhibitor 2 family Bowman-Birk family Soybean trypsin inhibitor family Bovine pancreatic trypsin inhibitor family *Streptomyces* subtilicin inhibitor family Squash seed inhibitor family Chelonianin family Hindurin family Serpin family
Cysteine Protease inhibitors	Cystatin Stefins
Metallo- Protease inhibitors	PCI family
Aspartic Protease inhibitors	

จากข้างต้นจะเห็นว่าพืชเป็นแหล่งที่มีรายงานการพบ Protease inhibitors มากกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ Birk (2003) กล่าวว่าการค้นคว้าเรื่อง Protease inhibitors ในพืชนั้นได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและยาวนานกว่า 70 ปีมาแล้ว ทั้งนี้เนื่องจากความหลากหลายทางชีวภาพและความอุดมสมบูรณ์ในธรรมชาติ ทำให้พืชเป็นแหล่งที่มีการค้นพบ Protease inhibitors ใหม่ๆ มากมาย (Roa and Soresh, 2007) ตารางที่ 2 แสดงถึงตัวอย่าง Protease inhibitors ที่พบในพืชชนิดต่างๆ จากรายงานของ Fan และ Wu (2005) กล่าวว่า ถั่วเหลืองเป็นพืชชนิดแรกที่มีการสกัดแยก Protease inhibitors และพบว่ามีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Trypsin ปัจจุบันนี้มีรายงานการค้นพบ Protease inhibitors ในพืชกว่า 129 ชนิด และพบ Protease inhibitors กว่า 495 ตัว (De Leo *et al*., 2002)

Protease inhibitors ในพืชจะพบสะสมอยู่ในเมล็ดและหัวหรือหน่อของพืช มีปริมาณสูงถึง ร้อยละ 10 ของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อเยื่อนั้นๆ (De Leo *et al*., 2002) และอาจพบในเนื้อเยื่อส่วน

อื่นๆ เช่น ราก ใบ และ ดอก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการถูกกระตุ้นจากภายนอก เช่น การเกิดบาดแผลจากการกัดกินของแมลงหรือการถูกทำลายจากจุลินทรีย์ก็เป็นได้ (Sin and Chye, 2004)

ตารางที่ 2 ตัวอย่าง Protease inhibitors ที่มีรายงานการศึกษาในพืชชนิดต่างๆ

Source	Type of protease inhibitor	Target protease
Glycine max	Soybean Kunitz trypsin inhibitor	Trypsin, Chymotrypsin
Hordeum vulgare	Barley subtilisin inhibitor	Subtilisin,Alpha-amylase
Solanum tuberosum	Kunitz cysteine peptidase inhibitor 1	Cysteine proteases
Sagittaria sagittifolia	Proteinase inhibitor A inhibitor unit	Trypsin, Chymotrypsin, Kallikerin
Acacia confusa	Trypsin inhibitor	Trypsin and alphachymotrypsin
Eleusine coracana	Ragi seed trypsin/amylase inhibitor	Alpha amylase
Momordica charantia	Trypsin inhibitor MCTI-1	Pancreatic elastase
Momordica charantia	Trypsin inhibitor MCTI-II	Trypsin
Cucumis sativus	Trypsin inhibitor CSTI-IV	Trypsin
Solanum tuberosum	Chymotrypsin inhibitor I	Chymotrypsin, Trypsin
Momordica charantia	Glutamyl peptidase II inhibitor	Glu S.griseus protease , Subtilisin
Sinapis alba	Mustard trypsin inhibitor	Beta-trypsin
Onchocerca volvulus	Onchocystatin	Cysteine proteinase

ดัดแปลงจาก Habib and Khalid (2007)

3. บทบาทและหน้าที่ของ Protease inhibitors

จากข้อมูลส่วนใหญ่ที่มีรายงานหน้าที่ของ Protease inhibitors จะเห็นว่าความสนใจในการศึกษาวิจัยจะมุ่งเน้นไปที่คุณสมบัติในการควบคุมกระบวนการย่อยสลายโปรตีนและการเป็นสาระสำคัญในระบบป้องกันตัวเองของพืช แต่ Protease inhibitors ยังมีสมบัติและหน้าที่ได้อีกหลายรูปแบบซึ่งขึ้นอยู่กับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและเนื้อเยื่อที่พบ (Clark *et al*., 1997; Leung, 2000) ซึ่งพอจะแบ่งคร่าวๆได้แก่

3.1 การเป็นโปรตีนสะสม (Storage proteins)

Protease inhibitors จะพบอยู่ในเนื้อเยื่อสะสม เช่น หัวหรือหน่อของพืชในปริมาณสูงถึงร้อยละ 10 ขององค์ประกอบของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อเยื่อนั้นๆ (De Leo *et al*., 2002) ทำให้มีรายงานบางฉบับกล่าวว่า Protease inhibitors จะทำหน้าที่เป็นโปรตีนสะสม (Mosolov and Valueva, 2005) ข้อพิสูจน์ที่สนับสนุนการสรุปนี้ คือการตรวจพบ Protease inhibitors ใน แวคิวโอล และ protein bodies เช่นเดียวกับโปรตีนสะสม (Biosen,1983; Wingate *et al*., 1991) และยังพบว่า Protease inhibitors บางชนิดเป็นโปรตีนชนิดเดียวกับโปรตีนสะสม เช่น กรณีของ trypsin inhibitor จากข้าวบาร์เลย์ กับ 2S storage protein ของ Castor-oil (Odani *et al*., 1983) และในอีกกรณีหนึ่งคือการที่โปรตีนสะสมมีคุณสมบัติเหมือนกับ Protease inhibitors เช่น 2S albumin psophocarpin B โดยพบว่าจะทำหน้าที่ยับยั้ง serine protease (Roy and Singh,1988 อ้างตาม Mosolov *et al.,* 2001)

3.2 การควบคุมกระบวนการย่อยสลายโปรตีนภายใน (endogenous proteolytic processes)

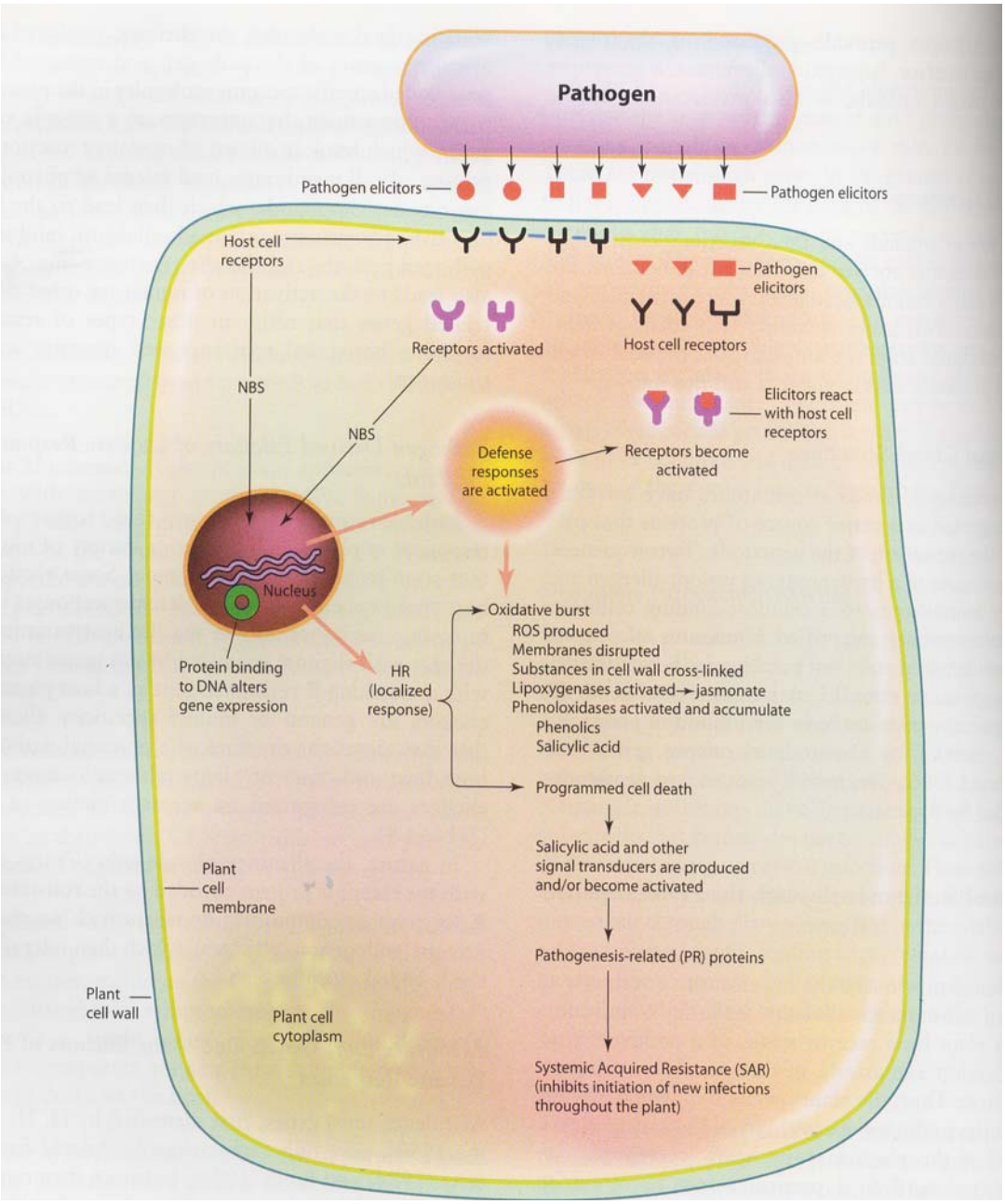
จากการตรวจพบปริมาณ Protease inhibitors ในเมล็ดที่ระดับความเข้มข้นสูงในระยะพักตัวของเมล็ด (seed dormancy) และปริมาณ Protease inhibitors จะลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะของการงอก (Germination) (Ridchardson, 1977) ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่าเมล็ดพืชอาจจะต้องการกลไกในการป้องกันการย่อยสลายของโปรตีนที่สะสมอยู่ภายในเมล็ด จากเอนไซม์โปรตีเอสก่อนเข้าสู่กระบวนการงอก (Koiwa *et al*., 1997) และเมื่อเข้าสู่กระบวนการงอกปริมาณ Protease inhibitors จะลดลงเพื่อทำให้เอนไซม์โปรตีเอสสามารถทำหน้าที่ย่อยโปรตีนที่สะสมอยู่ได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้เมล็ดเจริญได้ในที่สุด (Enari and Mikala, 1967 อ้างโดย Mosolov and Valueva, 2005) เช่น ในเมล็ดข้าวพบว่ามี Oryzacystatins I และ II มาทำหน้าที่ในการกดดันกิจกรรมของ cysteine proteases โดย Protease inhibitors ทั้งสองจะถูกสังเคราะห์ขึ้นในระยะพักตัวของเมล็ดจนถึงใกล้เข้าสู่ระยะของการงอก (Kondo *et al*., 1990) นอกจาก cystatins แล้ว trypsin inhibitor ก็มีรายงานการตรวจพบในเมล็ดของผักกาดหอม และ ลูกเดือย ซึ่งจะทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสในเมล็ดเช่นเดียวกัน (Mosolov and Valueva, 2005) และยังพบว่าในใบของมันฝรั่ง และถั่วฝักยาว จะมีการสร้าง Protease inhibitors มาทำหน้าที่ยับยั้ง proteases ที่เกิดขึ้นในใบ เช่น PLPI 6,6 จะทำหน้าที่ยับยั้ง PLCP-2 โดยปฏิกิริยาการยับยั้งนี้จะเกิดอยู่ในส่วนเดียวกับที่มีเอนไซม์โปตีเอสอยู่ (Pompe-Novak *et*

al., 2002) จึงทำให้แน่ใจได้ว่า Protease inhibitors นี้ทำหน้าที่ในการควบคุมเอนไซม์โปรตีเอส ภายในพืชเองด้วยเช่นกัน

3.3 การป้องกันตัวเองของพืช (Plant defense)

การเข้าทำลายเซลล์พืชของแมลงและจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะมีการหลั่งเอนไซม์โปรตีเอส โดยแมลงจะใช้เอนไซม์ Serine proteases, cysteine proteases และ metalo-protease อย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกันในการทำลายผนังเซลล์ของพืช (Koiwa *et al*., 1997) และในกรณีการบุกรุกของจุลินทรีย์ ในระหว่างกระบวนการ penetration และ colonization ก็จะมีการหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสออกมาเพื่อย่อยโปรตีนบนผนังเซลล์พืชเช่นกัน (Ryan, 1990) ดังนั้นพืชจึงต้องตอบสนองกระบวนการดังกล่าวด้วยระบบป้องกันตัวเอง ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีการรวมกลไกต่างๆหลายระบบ ไม่ว่าจะเป็น Hypersensitive response (HR), การสร้าง phytoalexin รวมทั้ง การสร้าง pathogenesis-related protein (PR-protein) (ภาพที่ 2)

PR-protein แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 17 กลุ่ม (ตารางที่ 3) PR-protein ที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่จะป้องกันเชื้อที่มีฤทธิ์การทำลายต่ำถึงปานกลางและไม่จำเพาะต่อเชื้อ (Legrand *et al*., 1987) จากตารางที่ 3 จะเห็นว่า Protease inhibitors เป็น PR-protein ชนิดหนึ่ง (PR-6) จึงถือได้ว่า Protease inhibitors มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืชเช่นกัน และข้อพิสูจน์ที่สำคัญ คือการศึกษาการเจริญของตัวอ่อนแมลงบนอาหารที่มีส่วนผสมของ Protease inhibitors พบว่า ตัวอ่อนไม่สามารถเจริญได้ อีกทั้งการทดสอบกิจกรรมของ Protease inhibitors ต่อเอนไซม์โปรตีเอสจากระบบทางเดินอาหารของแมลง พบว่า ความสามารถของเอนไซม์โปรตีเอสลดลง (Reeck *et al*., 1997)



ภาพที่ 2 ระบบป้องกันตัวเองของพืชเมื่อถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้า (Agrios, 2005)

NBS คือ Nuclear-Binding Site

ตารางที่ 3 Pathogenesis-related protein กลุ่มต่างๆ

Families	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	Antifungal
PR-2	Tobacco PR-2	b-1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	chitinase type I,II, IV,V,VI,VII
PR-4	Tobacco 'R'	chitinase type I,II
PR-5	Tobacco S	thaumatin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P_{69}	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase type III
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	Peroxidase
PR-10	Parsley 'PR1'	'ribonuclease-like'
PR-11	Tobacco 'class V' chitinase	chitinase, type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	thionin
PR-14	Barley LTP4	lipid-transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	'oxalate oxidase-like'
PR-17	Tobacco PRp27	unknown

ที่มา van Loon และคณะ (2006)

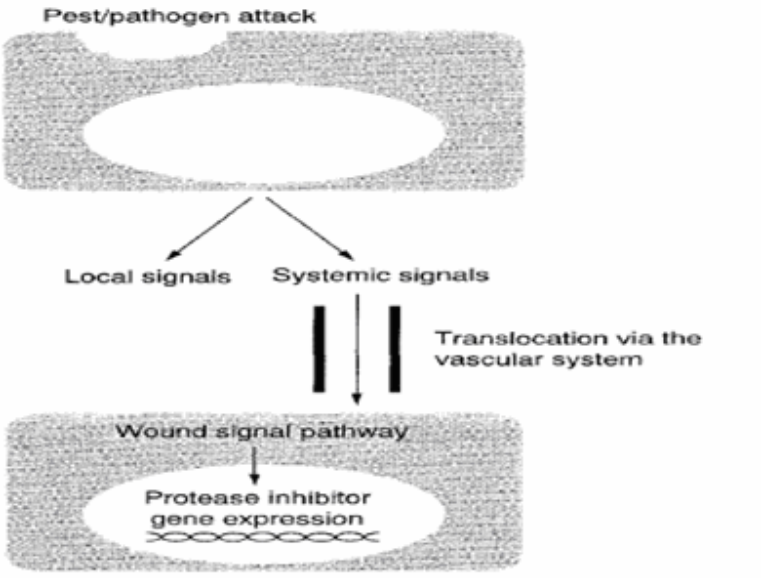
เมื่อกล่าวถึงการเกิดบาดแผลในสัตว์ เนื้อเยื่อจะมีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าโดยการเกิดการอักเสบ (Inflammation) ซึ่งกลไกการตอบสนองนี้จะมีเอนไซม์โปรตีเอสเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น เม็ดเลือดขาวจะหลั่งเอนไซม์ neutrophils elastase ออกมา (Hiemstra *et al*., 2002) ซึ่งจะทำให้สัตว์มีระบบภูมิคุ้มกันในการต่อต้านการติดเชื้อต่ำลง โดยการไปทำลาย phagocyte surface receptor และ opsonins (Stockley, 1994) ดังนั้นร่างกายจึงต้องมีการสร้างตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสตัวนี้ เพื่อป้องกันการถูกทำลายจากเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งได้แก่ alpha 1-protease inhibitor, secretory

leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) และ elastase-specific inhibitor (elafin) (Hiemstra *et al.,* 1998)

นอกจากการต่อต้านการอักเสบด้วยกลไกข้างต้นแล้ว Protease inhibitors ยังมีบทบาทเกี่ยวกับปฏิกิริยาการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผลได้เช่นกัน (Hiemstra *et al*., 2002) จากการศึกษากรณีการเกิดบาดแผลบริเวณผิวหนังของมนุษย์จะมีการตรวจพบ SLPI เพิ่มสูงขึ้น (Wingens *et al*., 1998) และการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณ SLPI กับการซ่อมแซมเนื้อเยื่อในหนู พบว่า ในเนื้อเยื่อที่ไม่ปรากฏ SLPI จะมีผลทำให้การรักษาบาดแผลใช้ระยะเวลายาวนานกว่าเนื้อเยื่อที่มี SLPI (Ashcroft *et al*., 2000)

4. การแสดงออกของยีน Protease inhibitors

ยีน Protease inhibitors จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเซลล์ถูกทำลาย โดยผ่านวิถี wound signal transduction pathway (ภาพที่ 3) การกระตุ้นจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ที่เกิดบาดแผล (local) และเซลล์ข้างเคียง (systemic)



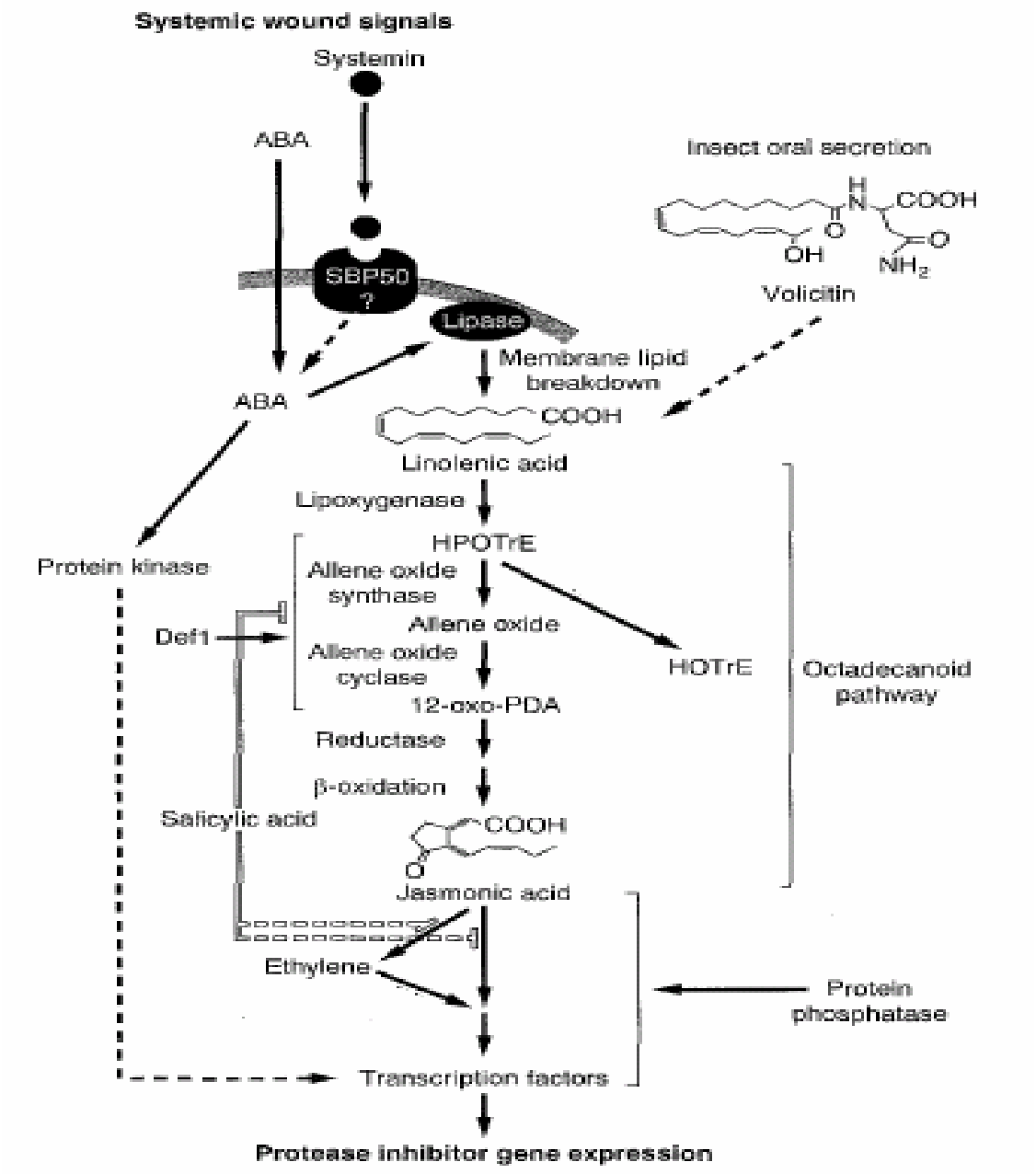
ภาพที่ 3 วิถี Wound signal transduction pathway ซึ่งเป็นวิถีกระตุ้นการแสดงออกของยีน Protease inhibitors (Koiwa *et al*., 1997)

การกระตุ้นในเซลล์ที่เกิดบาดแผลนั้น จะมีสารสื่อสัญญาณ (local signals) เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งได้แก่ pectic oligosaccharide ที่หลุดมาจากผนังเซลล์ของพืชเมื่อมีบาดแผล หรือ ผนังเซลล์ของเชื้อราที่มีส่วนของ chitosan อยู่ โดยสารเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้น (elicitors) ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน Protease inhibitors (Koiwa *et al*., 1997) สารสื่อสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดบาดแผลจะไม่มีการเคลื่อนที่ไปยังเซลล์อื่นๆของพืช และจะกระตุ้นเฉพาะภายในเซลล์ที่เกิดบาดแผลเท่านั้น โดยจะมี receptor บริเวณ plasma membrane เป็นตัวรับสารสื่อสัญญาณดังกล่าว เช่น β-glucan-elicitor-binding protein (GEBP) (Umemoto *et al*., 1997)

ในกรณีของเซลล์ข้างเคียงก็จะมีการส่งสารสื่อสัญญาณจากเซลล์ที่เกิดบาดแผล ซึ่งจะเคลื่อนผ่านระหว่างเซลล์ในระบบท่อลำเลียง โดยจะเรียกสารสื่อสัญญาณเหล่านี้ว่า Systemic signals (ภาพที่ 4) เช่น systemin และ abscisic acid (ABA)

Systemin เป็นเปปไทด์ขนาด 18 อะมิโน (AVQSKPPSKRDPPKMQTD) การสังเคราะห์ systemin จะสังเคราะห์ในรูปของ prosystemin ขนาด 200 อะมิโน โดย systemin จะอยู่บริเวณปลาย C (Peña-Cortés *et al*., 1995) และจะมี systemin-binding protein (SBP50) เป็นตัวรับ systemin เข้าสู่เซลล์ จากนั้น MQTD motif จะถูกตัดออก เพื่อใช้ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน Protease inhibitors (Koiwa *et al*., 1997)

abscisic acid (ABA) เป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งที่พบอยู่ทั่วไป การไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน Protease inhibitors โดย ABA นี้ เกิดขึ้นได้ 2 ทาง คือ ผ่านทางกระบวนการของ protein kinase และ ผ่านทางกระบวนการ linolenic acid signaling pathway ซึ่งประกอบด้วย octadecanoid pathway จากวิถีเหล่านี้จะเห็นว่า Jasmonic acid จะเป็นผลผลิตสุดท้ายที่เกิดขึ้นในวิถี และมีรายงานว่า Jasmonic acid สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ Protease inhibitors ได้ดี (Wasternack and Parthier, 1997)



ภาพที่ 4 สารสื่อสัญญาณของเซลล์ข้างเคียง (Systemic signals) (ดัดแปลงจาก Koiwa *et al.*, 1997)

5. การประยุกต์ใช้ Protease inhibitors

5.1 การสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์

ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นให้พืชมีความต้านทานต่อโรคและแมลงเพิ่มสูงขึ้น จึงได้มีการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมเข้ามาใช้ในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์ที่สามารถผลิตสารที่เป็นอันตรายต่อแมลงหรือเชื้อโรคต่างๆมากขึ้น และจากคุณสมบัติของ Protease inhibitors ในระบบการป้องกันตัวเองของพืช จากการถูกทำลายด้วยแมลงหรือเชื้อโรคนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์ ที่มียีน Protease inhibitors เพื่อให้พืชสามารถต้านทานต่อโรคและแมลงได้มากขึ้น (Dunaevsky *et al*., 2005) และเนื่องด้วยลักษณะเด่นของ Protease inhibitors นั่นคือมีขนาดเล็กและมีความจำเพาะสูงต่อเอนไซม์โปรตีเอสจากระบบทางเดินอาหารของแมลงและเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (Ussuf *et al*., 2001) จึงมีความเหมาะสมมากที่จะนำ Protease inhibitors ไปใช้สร้างพืชดัดแปลงพันธุ์ ตารางที่ 4 แสดงพืชดัดแปลงพันธุ์ที่ใช้ Protease inhibitors จากแหล่งต่าง ๆ มาสร้างพืชที่มีความต้านทานต่อแมลงและโรคจากจุลินทรีย์

5.2 การใช้เป็นสารที่ใช้ในการบำบัด (Therapeutic agent)

จากการสังเกตเห็นว่าเชื้อโรคส่วนใหญ่จะหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสในระยะแรกของการบุกรุกทำลายเซลล์พืช (Movahedy and Heale, 1990 อ้างตาม Valueva and Mosolov, 2004) และพบว่า Protease inhibitors ในพืชสามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อโรคได้ เช่น เชื้อ *Fusarium solani, F. culmorum, F. oxysporum, Botrytis cinerea* และ *Alternaria alternate* (Mosolov *et al*., 1976; Mosolov *et al*., 2001; Dunaevsky *et al*., 1996)

นอกจากนี้ยังพบว่า Protease inhibitors ยังมีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของไวรัสได้อีก เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า เอนไซม์โปรตีเอส มีบทบาทในกระบวนการ protein processing ใน life cycle ของไวรัส เช่น picornavirus (Kondo *et al*., 2000) ดังนั้นจึงทำให้มีผู้สนใจนำ Protease inhibitors ไปใช้ประโยชน์ในทางยา (Pharmaceutics) กันอย่างกว้างขวาง (Patick and Potts, 1998)

ตารางที่ 4 พืชดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน Protease inhibitors จากแหล่งต่างๆ

Inhibitor	Transformed plant	Insect
Cowpea trypsin inhibitor (CpTI)	Tobacco	*Manduca sexta*
	Tobacco	*Spodoptera litura*
	Rice	*Sesamia inferens* *Chilo suppressalis*
	Potato	*Lacnobiaoleracea*
	Apple	*Coleoptera, Lepidoptera*
	Lettuce, tomato	*Coleoptera, Lepidoptera*
	Strawberry	*Coleoptera, Lepidoptera*
Potato PI-I and PI-II	Tobacco	*Manduca sexta*
Potato PI-II	Rice	*Sesamia inferens*
Potato chymotrypsin inhibitor	Tobacco	*Chrysodeixis eriosoma*
Sweet potato TI	Tobacco	*Spodoptera litura*
Sweet potato TI	Cauliflower	*Pieris conidia*
Rice cysteine inhibitor	Poplar	*Chrysomela tremulae*
Barley TI	Wheat	*Sitotroga cerealella*
Corn cystatin	Rice	*Sitophilus zeamatis*
Tobacco PI	Tobacco, pea	*Helicoverpa armigera*
Cysteine protease inhibitor	Tobacco	*Tobacco etch virus, Potato virus*
Bean a-amylase inhibitor	Pea	*Bruchus pisorum*

ดัดแปลงจาก Ussuf และคณะ (2001)

วัตถุประสงค์

1. โคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI จาก cDNA library ของน้ำยางพารา
2. ศึกษาสมบัติของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Protease)
3. ตรวจสอบความสามารถของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ในการเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ และสารต่อต้านไวรัส

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	BDH
Acetic acid	J.T.Baker
Acrylamide	Merck
Ammonium Persulfate (APS)	Fluka
Azocasein	Sigma
Bisacrylamide (N,N-methylethylenediamine)	Merck
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
Bromophenol blue	Fluka
Calcium chloride	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma
Chloroform	LAB-SCAN
Dithiothreitol (DTT)	USB
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck
Ethyl alcohol	LAB-SCAN
Forlin ciocalteus's reagent	Merck
Glucose	Fluka
Glycerol	Fisher
Glycine	BDH

สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (ต่อ)

สารเคมี	**บริษัทที่ผลิต**
Hydrochloric acid	Merck
Isopropyl alcohol	LAB-SCAN
Magnesium chloride-hexahydrat reist	Merck
Methyl alcohol	LAB-SCAN
Potassium acetate	Merck
Skim milk	CARLO ERBA reagent
Sodium acetate	Merck
Sodium chloride	LAB-SCAN
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Aps Ajex Finechem
Sodium hydroxide pellets	BDH
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Fluka
Trichloroacetic acid (TCA)	CARLO ERBA reagent
Triethylamine	CARLO ERBA reagent
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	Fluka
Tryptone	Himedia
Tween 20	USB
Yeast extract	USB

1.2 **สารเคมีเกรดอนูชีววิทยา** (Molecular biology grade)

สารเคมี	**บริษัทที่ผลิต**
100 bp DNA ladder	Promega
Agarose	Sigma
Antibiotic-Antifungal	GIBCO
Ampicillin	Sigma
AMV Reverse Transcriptase	Promega
Chymotrypsin	Sigma
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTP)	Promega
Dulbecco's Modified Eagle Medim (DMEM)	GIBCO
Ethidium bromide	Sigma
Fetal Calf Serum (FCS)	GIBCO
Isopropyl ß-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG)	USB
Low Molecular Weight Calibration Kit	Amersham Biosciences
Papain	Sigma
Proteinase K	Sigma
QIAprep®Miniprep Kit	QIAGEN
Random primer	Promega
Ribonuclease A (Rnase A)	Sigma
*Sal*I	Promega
Subtillicin A	Sigma
SYBR®Green Supermix	BIO-RAD
Taq DNA polymerase	QIAGEN
Trizol® reagent	Invitrogen
Ribonuclease A (Rnase A)	Sigma
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system	Promega

2. จุลินทรีย์

2.1 แบคทีเรีย

- *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10 F' มีลักษณะ Genotype : F' {*lac*I^{q}*Tn*10(Tet^{R})} *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lacZ*ΔM15 Δ*lac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 Δ (*ara-leu*)7697 ga/U ga/K *rps*L (Str^{R}) *end*A1 *nup*G (Invitrogen, Natherlands)
- *E. coli* สายพันธุ์ M15 [pREP4] มีลักษณะ Genotype : F' Δ(*mcr*A) 183 Δ (*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*) 173 *end*A1 *sup*E44 thi-1 *rec*A1 *gyr*A96 *rel*A1 *lac*A1 *lac*F' *pro*AB *lac*I^{q} ZΔM15*Tn*10 (Tet^{r}) (QAIGEN, Germany)
- *Streptococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Micrococcus luteus* จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา
- *Pseudomonas aeruginosa* จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.2 ไวรัส

ไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus; WSSV) จากห้องปฏิบัติการ Molecular Biology and Biotechnology II ของ รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ

3. อณูชีวโมเลกุล (Molecular Biology molecules)

3.1 พลาสมิดเวคเตอร์

- pGEM® T-Easy vector (Promega, USA)
- pQE-40 vector (QIAGEN, Germany)

3.2 ไพร์เมอร์ (Oligonucleotide Primer)

ตารางที่ 5 ลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer name	Sequence	Expected Size (bp)
Hb-PI forward	5´- GGTACCATGGCAAGTCAGTGTCC - 3´	210
Hb-PI reverse	5´- CAAGTCGACTTAGCCAATGACC - 3´	
WSSV FQ-P3	5´-AAGCATCGTGGAGACTCTTGC- 3´	129
WSSV FQ-P4	5´- GAAGATTCGCCGCTCATACC- 3´	

3.3 ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษา

ยีน *Hevea brasiliensis* Protease inhibitor (*Hb*-PI) จาก cDNA library ของน้ำยางพาราจากการศึกษาของ สารภี (2550)

4. ตัวอย่างน้ำยางพารา

ตัวอย่างน้ำยางพาราที่ใช้ในการศึกษาเป็นน้ำยางธรรมชาติจากต้นยางพารา สายพันธุ์ RRIM 600 อายุประมาณ 7-10 ปี ที่มีระยะการกรีดต่างๆกันดังนี้ คือ 1 วัน, 3 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

5. ตัวอย่างกุ้ง

กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamai*) ระยะตัวเต็มวัยที่ปลอดเชื้อ อายุ 2-3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 10-15 กรัม

อุปกรณ์

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต รุ่น ulltraspac III (Pharmacia)

เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น TouchDown (บริษัท HYBRID)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น 2200 C SCS (บริษัท Precisa)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204 (บริษัท Mettler Toledo)

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง รุ่น Cyberscan 1000 (บริษัท Eutech Cybernectics)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น RC 5B (บริษัท Sorvall)

เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะรุ่น Biofuge pico (บริษัท Sorvall)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า รุ่น 1000/500 (บริษัท BIO-RAD)

เครื่องย้ายโปรตีน รุ่น AE-6675 & AE-6675L (บริษัท ATTA)

เครื่องผลิตคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) (บริษัท MSE)

เครื่องบดด้วยมือ (Homoginizer) รุ่น S-250 (บริษัท Ikeda Scientific)

ตู้ปราศจากเชื้อ Laminar flow (บริษัท Nuaire)

ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส (บริษัท Heraeus)

ตู้เลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (บริษัท Labline)

ตู้อบเครื่องแก้ว (บริษัท Labline)

เครื่องดูดความชื้นระบบสุญญากาศ รุ่น B-169 (บริษัท Buchi)

เครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ รุ่น Gel Doc 1000 (บริษัท BIO-RAD)

หม้อนึ่งความดัน รุ่น HA-300 MII (บริษัท Hirayama)

ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO)

ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (บริษัท SANYO)

ตู้ดูดควัน (บริษัท Major)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (บริษัท Mammert)

เครื่อง Microplate reader รุ่น ELX 800 UV (บริษัท Bio-Tek instuments)

เครื่อง Real time PCR รุ่น fluorescence detection Mx3000P™ (บริษัท Stratagene)

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีน Protease inhibitor

นำลำดับเบสของยีน Protease inhibitor ที่สนใจ (*Hevea brasiliensis* Protease inhibitor: *Hb*-PI) จาก cDNA library ของน้ำยางพาราจากการศึกษาของ สารภี (2550) มาศึกษาลำดับเบสเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) และแสดงผลการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม ClustralX และ GenDoc

2. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Hb*-PI ในน้ำยางพาราด้วยเทคนิค Real time RCR

2.1. การเตรียมตัวอย่างน้ำยางพารา

ตัวอย่างน้ำยางพาราที่ใช้ในการศึกษาเป็นน้ำยางธรรมชาติจากต้นยางพารา สายพันธุ์ RRIM 600 อายุประมาณ 7-10 ปี ที่มีระยะการกรีดต่างๆกันดังนี้ คือ 1 วัน, 3 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ตัวอย่างน้ำยางดังกล่าวจะเก็บไว้ในขวดแก้วที่ปราศจากเอนไซม์ RNAse และเติม Trizol reagent ปริมาตร 1 เท่าของน้ำยางพารา และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

2.2. การสกัด Total RNA จากตัวอย่างน้ำยางพารา

นำตัวอย่างน้ำยางพาราจากข้อ 2.1 มาสกัด total RNA ด้วยวิธีใช้ Trizol reagent (GIBCO BRL, USA) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำน้ำยางพาราที่ผสมกับ Trizol reagent ในหลอดทดลองและทำการบดตัวอย่างด้วยเครื่องบดด้วยมือ (homogenizer) จากนั้นนำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที แยกส่วนของสารละลายและนำมาเติม Chloroform 0.2 เท่าของปริมาณ Trizol reagent ที่ใช้เริ่มต้น บ่มภายใต้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผลจากการหมุนเหวี่ยงจะทำให้ได้สารละลายที่แบ่งเป็น 2 ชั้น นำสารละลายชั้นบนมาทำการตกตะกอน RNA ด้วยการเติม isopropyl alcohol ปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ได้ บ่มไว้ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้ตะกอน RNA จากตัวอย่าง ทำการล้างตะกอน RNA

ดังกล่าวด้วยการเติม 75% ethanol ที่เย็นจัด และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500xg ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนของ ethanol ทิ้ง และนำตะกอน RNA ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องดูดความชื้นระบบสุญญากาศ (vacuum pump) นำตะกอน RNA ที่แห้งแล้วมาละลายด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาคุณภาพและปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร

2.3. การเตรียม cDNA จาก Total RNA

Total RNA ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 จะถูกเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วยวิธี Reverse transcription ตามวิธีของบริษัท Stratagene (USA) โดยนำ Total RNA 4 ไมโครกรัม บ่มกับ Random primer 100 นาโนกรัม ภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และทำให้เย็นโดยนำไปบ่มบนน้ำแข็งอีก 5 นาที จากนั้นเติม RT reaction ซึ่งประกอบด้วย 0.6 mM dNTP, Reverse transcription buffer, 0.2 U AMV และน้ำที่ปราศจาก RNase ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร นำไปบ่มภายใต้อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้ผลผลิตเป็น cDNA

2.4. การศึกษาการแสดงออกของยีน Protease inhibitor ด้วยเทคนิค Real time PCR

นำ cDNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างน้ำยางพาราที่ระยะการกรีดต่างๆ (จากข้อ 2.3) มาใช้ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *Hb*-PI ในน้ำยางพารา ด้วยเทคนิค Real time PCR เริ่มต้นด้วยการนำ cDNA ข้างต้น ปริมาตร 300 นาโนกรัม ผสมกับ forward primer และ reverse primer ของยีน *Hb*-PI (ตารางที่ 5) อย่างละ 20 pmol เติมสารประกอบ iQ™SYBR®Green Supermix (BIO-RAD,USA) และน้ำปราศจาก ไอออน (DI water) ปริมาณสุทธิ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง fluorescence detection Mx3000P™ (Stratagene, CA) สภาวะอุณหภูมิและจำนวนรอบที่ใช้ในการศึกษาแสดงดังตารางที่ 6 ในการศึกษาการแสดงออกจะใช้ยีน 18S rRNA QuantumRNA™ 18S Internal Standard (Ambion,USA) เป็น internal standard

การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของยีน *Hb*-PI และ 18S rRNA เตรียมโดยใช้ยีนบริสุทธิ์ของแต่ละยีนในช่วง 1×10^3 ถึง 1×10^7 copies

ตารางที่ 6 สภาวะอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ Real time PCR

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
95	5	1
94	0.50	40
55	0.50	
72	0.50	

3. **การสร้างแบคทีเรียลูกผสมที่มียีน *Hb*-PI**

3.1. **การสร้างพลาสมิดลูกผสม pG□M-*Hb*-PI เพื่อเตรียมชิ้นยีน *Hb*-PI ที่มีตำแหน่งตัดจำเพาะของ *Kpn*I และ *Sal*I**

3.1.1. **การเตรียมพลาสมิด** pBK-CMV-*Hb*-PI

ทำการสกัดพลาสมิด pBK-CMV-*Hb*-PI จาก cDNA library ของน้ำยางพารา เพื่อใช้เป็น DNA ต้นแบบในการเพิ่มจำนวนยีน *Hb*-PI โดยมีวิธีการดังนี้ นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่มียีน *Hb*-PI เพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB broth ที่เติม Kanamycin 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงแบบเขย่าภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 1 นาที และเติม solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 10 mM EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางไว้ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติม solution II (0.2 N NaOH และ 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที และเติม solution III (5 M potassium acetate, glacial acetic acid) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลานาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใสในหลอดใหม่ และเติม Isopropyl ethanol 1.5 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ได้ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลานาน 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอน DNA ที่ได้ด้วย 70% ethanol จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000xg นาน 5 นาที เท ethanol ทิ้ง ทำให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI water) และตรวจสอบ พลาสมิด ที่ได้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis

3.1.2. การเพิ่มจำนวนยีน *H*b-PI

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *H*b-PI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) โดยใช้พลาสมิด pBK-CMV-*H*b-PI (จากข้อ 3.1.1.) เป็น DNA ต้นแบบในการเพิ่มจำนวน และใช้ ไพร์เมอร์ของยีน *H*b-PI (ตารางที่ 5) ผสมกับสารประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (ตารางที่ 7) ให้เข้ากัน นำไปทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนภายใต้สภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 8 และวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR ที่ได้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 7 สารประกอบในปฏิกิริยา PCR

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA template (200 ng)	1
10 µM forward primer	2.5
10 µM reverse primer	2.5
25 mM $MgCl^2$	2.5
10x PCR buffer	2.5
10 mM dNTP	1
Taq DNA polymerase	1
DI water	12
ปริมาตรสุทธิ	25

ตารางที่ 8 สภาวะอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำ PCR

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ (รอบ)
94	2	1
94	2	30
55	1	
72	1	
72	10	1

3.1.3. การทำบริสุทธิ์ยีน *Hb*-PI

นำยีน *Hb*-PI ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR มาทำบริสุทธิ์โดยใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega, USA) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ต่อไปนี้ นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาแยกแถบ DNA ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis จากนั้นตัดเจล บริเวณที่เป็นแถบ DNA ของ ยีน *Hb*-PI โดยเทียบกับ 100 base pairs marker มาเติม Membrane Binding Solution 1 มิลลิลิตรต่อเจล 1 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนเจลละลาย นำสารละลายย้ายลงใน SV mini column บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง นำ SV mini column มาล้างด้วย Membrane Wash Solution 500 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้าย SV mini column ไว้บนหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจาก nuclease ชะส่วนของ DNA ออกจาก SV mini column โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 1 นาที นำ DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณ DNA ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร

3.1.4. การเชื่อมยีน *Hb*-PI เข้ากับ pG□M®-T □asy vector

นำยีน *Hb*-PI บริสุทธิ์ 10 นาโนกรัม มาทำการเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pGEM®-T Easy (Promega, USA) 50 นาโนกรัมโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA Ligase 3 Units ประกอบกับ 10X Ligation Buffer 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

3.1.5. การนำเวคเตอร์เข้าสู่เซลล์ *E. coli* (Transformation)

นำ ligation reaction จากข้อ 3.1.4. มาบ่มกับ competent cells ของ *E. coli* TopF′10 ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปอุ่นทีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และวางไว้บนน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมอาหารเหลว LB broth ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มเลี้ยงแบบเขย่า ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นแบ่งเชื้อ 100 ไมโครลิตร มา Spread บนอาหารแข็ง LB agar ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้อบภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง

3.1.6. การคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม pG□M-*Hb*-PI

ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เกิดขึ้นจากข้อ 3.1.5. โดยการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีนั้นๆ มาเทียบกับพลาสมิด pGEM®-T Easy vector ที่ไม่มียีน *H*b-PI อยู่ วิธีการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีของแบคทีเรียทำได้ตามวิธีการดังข้อ 3.1.1.

3.1.7. ตรวจสอบโคโลนีที่มีพลาสมิดลูกผสม pG□M- *H*b-PI

การตรวจสอบพลาสมิดที่มียีน *H*b-PI นั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือการทำ PCR ตามวิธีข้อ 3.1 โดยใช้พลาสมิดนั้นๆเป็น DNA ต้นแบบ และอีกวิธีหนึ่ง คือ การตัดยีน *H*b-PI จากพลาสมิดที่คัดเลือกได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Sal*I โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ พลาสมิด 10 ไมโครกรัม, Restriction 10X Buffer, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 units และ น้ำปราศจากไอออน (DI water) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น ตรวจสอบผลโดยการทำ 1.2% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ 100 bp marker

3.2. การสร้างพลาสมิดลูกผสม pQ□-*H*b-PI เพื่อใช้ในการสร้างโปรตีน *H*b-PI

3.2.1. การเตรียมเวคเตอร์ pQ□-40

ทำการตัดเวคเตอร์ pQE-40 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Sal*I ตามกระบวนการข้อ 3.1.7. จากนั้นทำบริสุทธิ์เวคเตอร์โดยใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega, USA) ตามข้อ 3.1.3.

3.2.2. การเตรียมชิ้นยีน *H*b-PI ที่มีบริเวณจดจำของ *Kpn*I และ *Sal*I

นำพลาสมิด pGEM- *H*b-PI ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วจากข้อ 3.1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Sal*I ตามกระบวนการข้อ 3.1.7. จากนั้นทำบริสุทธิ์ชิ้นยีน *H*b-PI โดยใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega, USA) เช่นเดียวกับเวคเตอร์ pQE-40

3.2.3. การสร้างแบคทีเรีย *E. coli* M15 ที่มีพลาสมิดลูกผสม pQ□-*H*b-PI

นำเวคเตอร์ pQE-40 ที่ได้จากข้อ 3.2.1 และชิ้นยีน *H*b-PI จากข้อ 3.2.2 มาเชื่อมเข้าด้วยกันและนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ตามวิธีในข้อ 3.1.4. ถึงข้อ 3.1.7. โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli* M15 เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการสังเคราะห์โปรตีน *H*b-PI

4. การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม *H*b-PI

4.1. การชักนำการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม *H*b-PI

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* M15 ที่มีพลาสมิดลูกผสม pQE-*H*b-PI จากข้อ 3.2 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่เติม Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Kanamycin 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 220 รอบต่อนาที นาน 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารใหม่ เขย่าเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เป็น 0.5 – 0.7 นำมาชักนำการสร้างโปรตีนด้วยการเติม Isopropyl thiogalactoside (IPTG) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว และนำไปเขย่าเลี้ยงอีกประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายด้วย 0.05 M Tris-HCl pH 8 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง โดยใช้เครื่อง sonicator ที่ระดับ 200 – 300 w จำนวน 5 – 6 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนของโปรตีนที่ละลาย (soluble protein) และนำส่วนที่ของตะกอนโปรตีน (insoluble protein) มาละลายด้วยด้วย 0.05 M Tris-HCl pH 8

4.2. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยโพลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970)

นำโปรตีนที่ต้องการวิเคราะห์มาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (loading buffer) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้ววางไว้บนน้ำแข็งทันที จากนั้นเตรียมแผ่นเจลโพลีอะคริลาไมด์ 12% ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 9 นำส่วนผสมของชั้น separating gel เทลงในช่องระหว่างกระจกปริมาตร 3 ใน 4 ส่วนของความสูงของกระจก และใช้น้ำกลั่นเติมบนผิวเจลเพื่อปรับผิวหน้าเจลให้เรียบ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลเกิดการโพลิเมอร์ไรซ์อย่างสมบูรณ์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นเทส่วนของน้ำกลั่นออกแล้วเติมส่วนผสมของชั้น stacking gel จนเต็มและเสียบหวีลงในช่องระหว่างกระจกไม่ให้มีฟองอากาศ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวให้ดึงหวีออกแล้วนำแผ่นกระจกที่มีเจลอยู่ไปประกอบเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิส และเติม Tris-glycine buffer ลงในเครื่องให้ท่วมผิวหน้าเจล จากนั้นหยอดตัวอย่างโปรตีนที่

ต้องการวิเคราะห์ลงในแต่ละช่องของเจลและผ่านกระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบแล้วให้แกะเจลออกจากกระจกแล้วนำไปย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง. ล้างสีส่วนเกินออกด้วย Destain I เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ Destain II จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 9 ส่วนประกอบของโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส (SDS-PAGE)

ส่วนประกอบ	12% Separating gel (ml)	4% Stacking gel (ml)
30%Acrylamide-bisacrylamide	2.0	0.5
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.3	-
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.38
10% SDS	0.05	0.03
10% APS	0.05	0.03
TEMED	0.002	0.003
Distill water	1.7	2.1
รวม	5	3

4.3. การหาปริมาณโปรตีน

ใช้วิธี Lowry's method ในการหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน นำโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาตรมาเติม สารละลาย A ประกอบด้วย Copper tartrate carbonate solution (0.1%(w/v) $CuSO_4.5H_2O$, 2%(w/v) $NaCO_3$, 1%(w/v) Sodium tatrate), 5%(w/v) SDS และ 0.8 M NaOH อัตราส่วน 1: 2: 1 ตามลำดับ หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย B (2N Folin ciocateus' reagent ในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร และเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA

5. การศึกษาสมบัติของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI

5.1. การศึกษาสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Protease)

5.1.1. การศึกษากิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (ดัดแปลงจาก Kreger และ Lockwood, 1981)

การศึกษากิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส จะใช้วิธี azocasein digestion method ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำเอนไซม์โปรตีเอส 100 ไมโครลิตร (Trypsin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Chymotrypsin 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Subtilicin A 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Papain 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาบ่มกับตัวอย่างโปรตีน 100 ไมโครลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 1.5% azocasein 100 ไมโครลิตร และบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาเติม 5% TCA 700 มิลลิลิตร วางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg จากนั้นนำสารละลายที่ได้ 500 ไมโครลิตรมาผสมกับ 0.5 N NaOH 500ไมโครลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Percentage of inhibition) ของตัวอย่างโปรตีนนั้นๆ ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Percentage of inhibition} = \frac{A_{440}\ \text{trypsin} - (A_{440}\ \text{sample} - A_{440}\ \text{sample blank}) \times 100}{A_{440}\ \text{trypsin}}$$

5.1.2. การศึกษาผลกระทบของ pH ต่อกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI

วิธีการศึกษาผลของ pH ต่อกิจกรรมของ *H*b-PI ในการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส จะใช้ 0.05 M ของบัฟเฟอร์ต่างๆ (ตารางที่ 10) ในการละลายโปรตีนตัวอย่างและ azocasein จากนั้นทำการทดสอบเช่นเดียวกับ 5.1.1

ตารางที่ 10 บัฟเฟอร์ต่างๆในแต่ละช่วง pH ที่ใช้ในการศึกษา

ช่วง pH	บัฟเฟอร์
5.0	Acetate buffer
7.0	Phosphase buffer
9.0	Tris-HCl
11.0	Glycine-NaOH

5.1.3. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI

ผลของอุณหภูมิของต่อกิจกรรมของ *H*b-PI ในการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส จะทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 5.1.1 เช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิต่างๆ เป็น 25, 37, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส

5.2. การศึกษาสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ในการทดลองครั้งนี้จะใช้เชื้อซึ่งผลิตโปรตีเอสในการเข้าทำลายเซลล์ ซึ่งได้แก่ *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Streptococcus aureus* (ATCC 25923) การหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ใช้วิธีของ Blond และคณะ (2002) ดังนี้ ทำการเจือจางโปรตีนลูกผสม *H*b-PI แบบ serial dilution ด้วย PBS ใน 96- well plate จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง mid-logarithmic phase นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชม. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร มา spread บนอาหารแข็ง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อแยกสมบัติ bacteriostatic หรือ bactericidal

5.3. การศึกษาสมบัติในการยับยั้งไวรัสดวงแดงดวงขาว

5.3.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์กุ้ง

ทำการแยกส่วนของ Lymphoid จากกุ้งขาวที่ยังมีชีวิต นำมาล้างด้วย อาหาร DMEM และแช่ lymphoid นั้นลงในอาหาร DMEM-PS 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆเพื่อให้เซลล์ lymphoid แยกออกจากกัน นำเซลล์จำนวน 1 x 10^4 เซลล์ ในอาหารปริมาตร 40 ไมโครลิตร มาบ่มเลี้ยงใน 96-well plate เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นเติมอาหาร DMEM - PS 200 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะกับก้นหลุม

5.3.2. การทดสอบปฏิกิริยาการลบล้างฤทธิ์ของไวรัสตัวแดงดวงขาว

นำเซลล์กุ้งที่ได้จากข้อ 5.3.1 มาล้างเซลล์ที่ไม่ได้เกาะกับก้นหลุมออกด้วย PBS และบล็อก plate ด้วย 4% skim milk ที่ละลายใน PBS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

จากนั้นเติมไวรัสที่บ่มกับโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI นาน 1 ชั่วโมง ลงไปในแต่ละหลุมของ 96-well plate นำไปบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง. และล้างออกด้วย PBS จำนวน 6 ครั้ง เพื่อกำจัดไวรัสที่ไม่จับกับเซลล์ออก จากนั้นชะเซลล์จับกับไวรัสที่ออกจากก้นหลุมด้วย proteinase K ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นต้มสารละลายที่ได้นาน 10 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000xg นำส่วนของ supernatant ของแต่ละหลุมมาทำ Q-PCR เพื่อหาค่าจำนวนกอปปี้ของจีโนมไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้ไพร์เมอร์ FQ-P3 และ FQ-P4 (Yuan et al., 2007)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การศึกษาลำดับเบสและกรดอะมิโน ของยีน Protease inhibitor

จากการทำ cDNA library ของน้ำยางพารา พบยีน *Hevea brasiliensis* Protease Inhibitor (*Hb*-PI) (accession no. EU295479) ประกอบด้วยเบส 416 bp ที่มีส่วน open reading frame จำนวน 210 bp พบตำแหน่งของ polyadenylation signal (ขีดเส้นใต้) และ Poly A tail ดังแสดงในภาพที่ 5

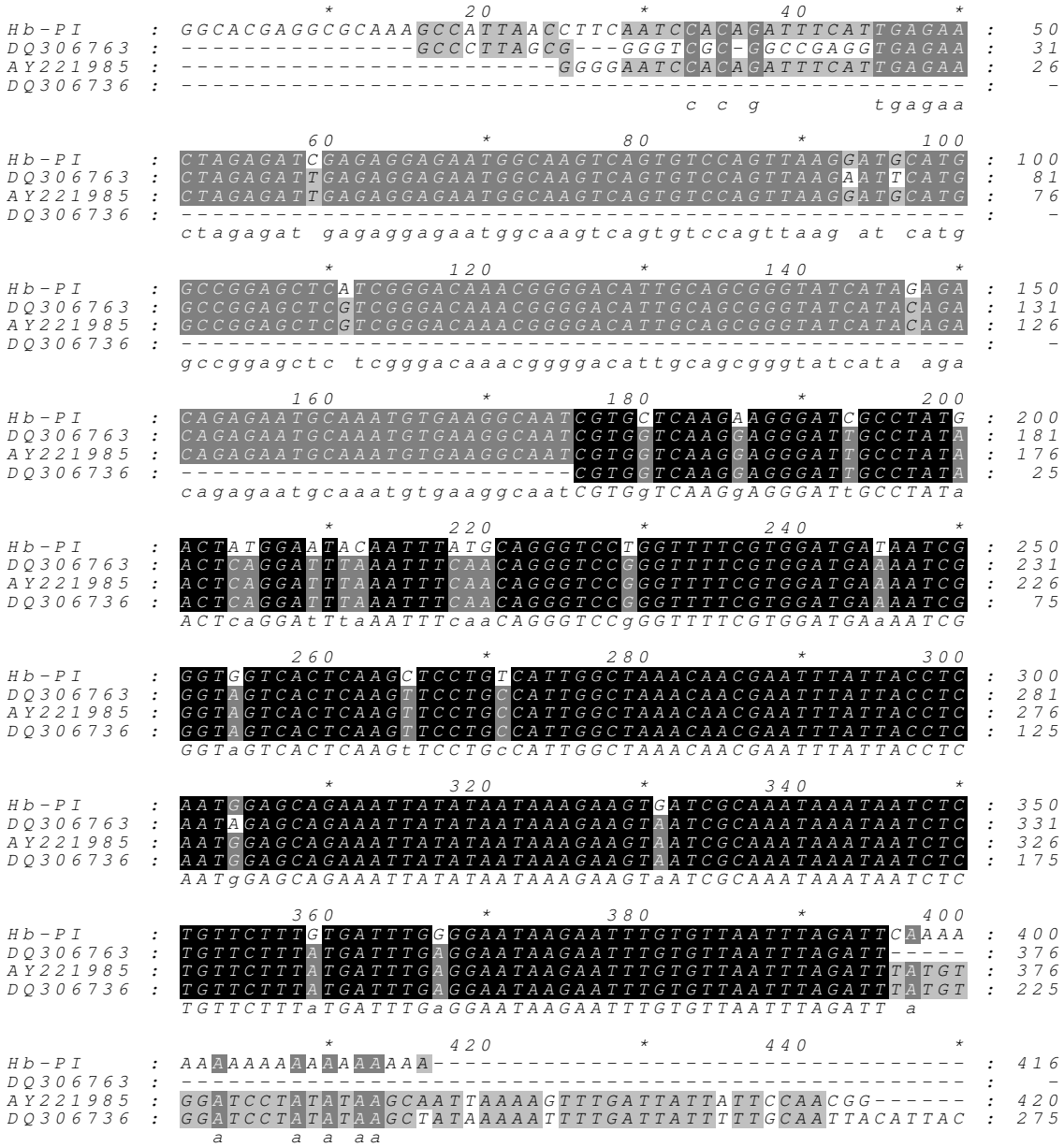
```
GGCACGAGGCGCAAAGCCATTAACCTTCAATCCACAGATT      40
TCATTGAGAACTAGAGATCGAGAGGAGAATGGCAAGTCAG      80
                                  M  A  S  Q

TGTCCAGTTAAGGATGCATGGCCGGAGCTCATCGGGACAA     120
  C  P  V  K  D  A  W  P  E  L  I  G  T

ACGGGGACATTGCAGCGGGTATCATAGAGACAGAGAATGC     160
 N  G  D  I  A  A  G  I  I  E  T  E  N

AAATGTGAAGGCAATCGTGCTCAAGAAGGGATCGCCTATG     200
A  N  V  K  A  I  V  L  K  K  G  S  P  M

ACTATGGAATACAATTTATGCAGGGTCCTGGTTTTCGTGG     240
   P  M  E  Y  N  L  C  R  V  L  V  F  V

ATGATAATCGGGTGGTCACTCAAGCTCCTGTCATTGGCTA     280
 D  D  N  R  V  V  T  Q  A  P  V  I  G

AACAACGAATTTATTACCTCAATGGAGCAGAAATTATATA     320
*

ATAAAGAAGTGATCGCAAATAAATAATCTCTGTTCTTTGT     360
GATTTGGGGAATAAGAATTTGTGTTAATTTAGATTCAAAA     400
AAAAAAAAAAAAAAAA                             416
```

ภาพที่ 5 ลำดับเบสและกรดอะมิโนจากการแปลรหัสของยีน *Hevea brasiliensis* Protease Inhibitor (*Hb*-PI) (accession no. EU295479)

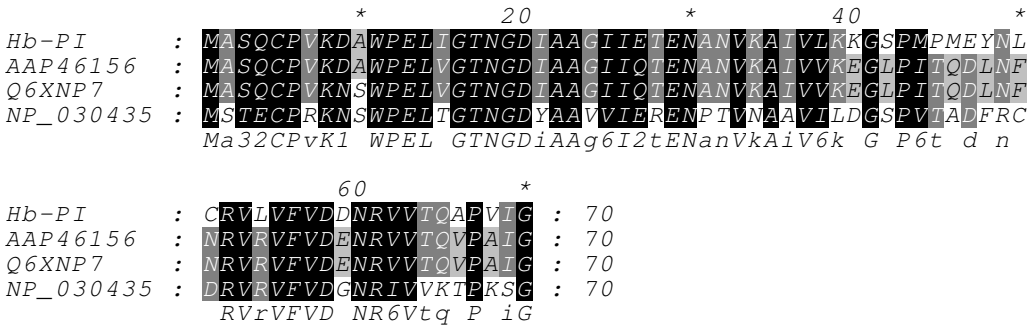
เมื่อนำลำดับเบสของยีน *Hb*-PI มาทำการ Blastn เทียบกับยีนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่า ยีน *Hb*-PI มีความเหมือนกับยีน *H. brasiliensis* protease inhibitor protein1 (PI1) mRNA (accession no. AY221985), *H. brasiliensis* isolate SSH34 mRNA sequence (accession no. DQ306763) และ *H. brasiliensis* isolate SSH7 mRNA sequence (accession no. DQ306736) โดยมีค่า % identity เป็น 91, 90 และ 83 ตามลำดับ มีค่า E value เป็น 4e-78, 2e-75 และ 1e-22 ตามลำดับ (ภาพที่ 6)

จากการนำลำดับเบสของยีน *Hb*-PI มาทำการแปลรหัส (Translate) เป็นกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม Protein Sequence Analysis พบว่า สามารถแปลรหัสเป็นเปปไทด์ที่มีจำนวนกรดอะมิโนได้ 70 หน่วย (ภาพที่ 5) มีน้ำหนักโมเลกุล 7.5 kDa มีค่า Isoelectric point (PI) เท่ากับ 4.72

เมื่อนำเปปไทด์จากการแปลรหัสมาทำการ BlastX เปรียบเทียบกับกรดอะโนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่า เปปไทด์ของยีน *Hb*-PI มีความเหมือนกับ protease inhibitor protein 1 ของ *H. brasiliensis* (accession no. AAP46156), Protease inhibitor HPI (Protease inhibitor 1; HbPI1) ของ *H. brasiliensis* (accession no. Q6XNP7) และ serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein ของ *Arabidopsis thaliana* (accession no. NP_030438) โดยมีค่า % identity เป็น 77, 74 และ 53 ตามลำดับ มีค่า E value เป็น 3e-24, 2e-23 และ 5e-12 ตามลำดับ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบลำดับของยีน *Hb*-PI กับ *H. brasiliensis* protease inhibitor protein1 (PI1) m□NA (accession no. AY221985), *H. brasiliensis* isolate SSH34 m□NA sequence (accession no. DQ306763) และ *H. brasiliensis* isolate SSH7 m□NA sequence (accession no. DQ306736)

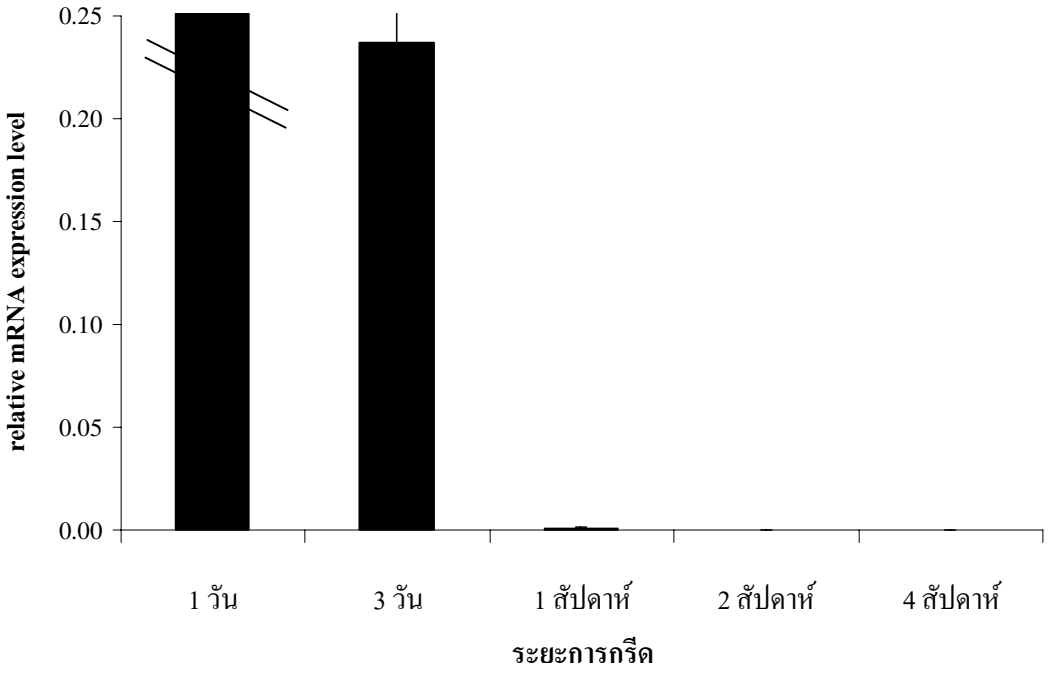


ภาพที่ 7 เปรียบเทียบเปปไทด์จากการแปลรหัสของยีน *Hb*-PI กับ protease inhibitor protein 1 ของ *H. brasiliensis* (accession no. AAP46156), Protease inhibitor HPI (Protease inhibitor 1; HbPI1) ของ *H. brasiliensis* (accession no. Q6XNP7) และ serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein ของ *Arabidopsis thaliana* (accession no. NP_030438)

2. **การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *H*b-PI ในน้ำยางพาราด้วยเทคนิค** Real time RCR

ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *H*b-PI ในน้ำยางพาราที่ระยะการกรีดต่างกัน 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ ระยะการกรีด 1 วัน, 3 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ โดยในแต่ละชุดการทดลองจะทำการทดลองชุดละ 3 ต้น และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *H*b-PI ด้วยเทคนิค eal time C ใช้ 18S ribosome เป็น internal control และรายงานผลในรูปของค่า elative m NA expression level ของยีน *H*b-PI กับ 18S ribosome

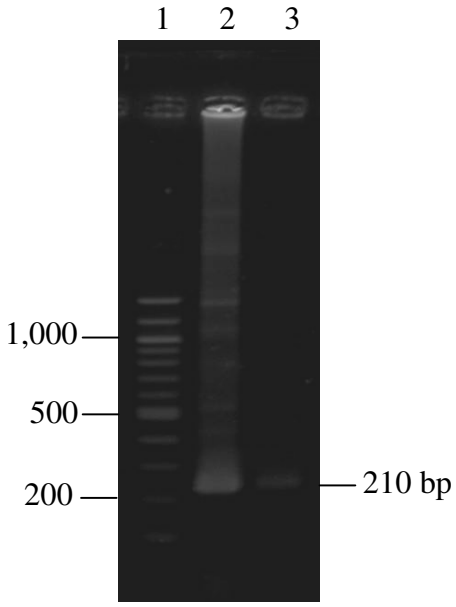
จากการทดลอง พบว่า ยีน *H*b-PI มีระดับการแสดงออกสูงในน้ำยางพาราที่ระยะการกรีด 1 วัน และ 3 วัน เมื่อระยะการกรีดเพิ่มขึ้นเป็น 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ นั้น ระดับการแสดงออกของยีน *H*b-PI ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ค่า elative m NA expression level ของยีน *H*b-PI ในน้ำยางพาราที่ระยะการกรีดต่างกัน 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ ระยะการกรีด 1 วัน, 3 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์

3. **การสร้างแบคทีเรียลูกผสมที่มียีน *Hb*-PI**

การสร้างแบคทีเรียลูกผสมที่มียีน *Hb*-PI จะเริ่มต้นโดยการเพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ PC□ โดยใช้พลาสมิด pBK-CMV-Hb-PI จาก cDNA library ของน้ำยางพารามาใช้เป็น DNA ต้นแบบในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน และใช้ไพร์เมอร์ของยีน *Hb*-PI (ตารางที่ 5) ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะเป็น *Kpn*I และ *Sal*I จากนั้นเมื่อนำผลผลิตจากการทำ PC□(PC□product) มาตรวจสอบด้วย 1.2% agarose gel พบว่า มีแถบ DNA ขนาด 210 bp และ 1,200 bp (ภาพที่ 9) ดังนั้นจึงต้องแยกแถบ DNA ขนาด 210 bp ออกจากแถบ DNA ที่ไม่ต้องการออกโดยใช้ Wizard® SV Gel and PC□Clean-Up system (Promega, USA) จะได้แถบ DNA ของยีน *Hb*-PI (ภาพที่ 9)



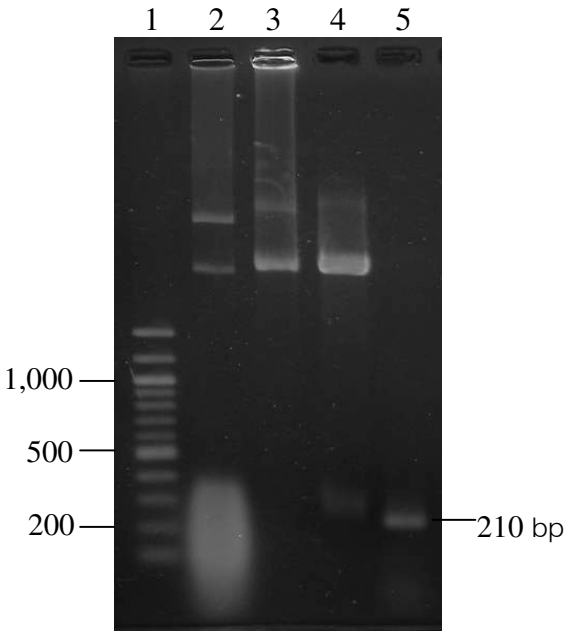
ภาพที่ 9 แถบ DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *Hb*-PI ด้วยเทคนิค PC□และการทำบริสุทธิ์ ยีน *Hb*-PI วิเคราะห์บน 1.2% agarose gel

แถวที่ 1 : 100 bp marker

แถวที่ 2 : ผลผลิตจากการทำ PC□(PC□product)

แถวที่ 3 : ยีน *Hb*-PI ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

จากนั้นทำการเชื่อมยีน *Hb*-PI เข้ากับเวคเตอร์ pGEM®-T Easy และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* Top 10 F' และทำการคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่าจะมีชิ้นยีน *Hb*-PI อยู่ ด้วยการตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Sal*I นำชิ้นยีน *Hb*-PI ที่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Kpn*I และ *Sal*I ดังกล่าวเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pQE-40 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ต่อจากนั้นนำเข้าสู่เซลล์ *E. coli* Top 10 F' และทำการคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่าจะมีชิ้นยีน *Hb*-PI อยู่ ทำการตรวจสอบพลาสมิดนั้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Sal*I ร่วมกับการทำ PC□เพื่อยืนยันผลของพลาสมิดที่ได้ (ภาพที่ 10) จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* M15 เพื่อใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน *Hb*-PI ต่อไป



ภาพที่ 10 พลาสมิดที่มีชิ้นยีน *Hb*-PI

แถวที่ 1 : 100 bp marker

แถวที่ 2 : pQE-40

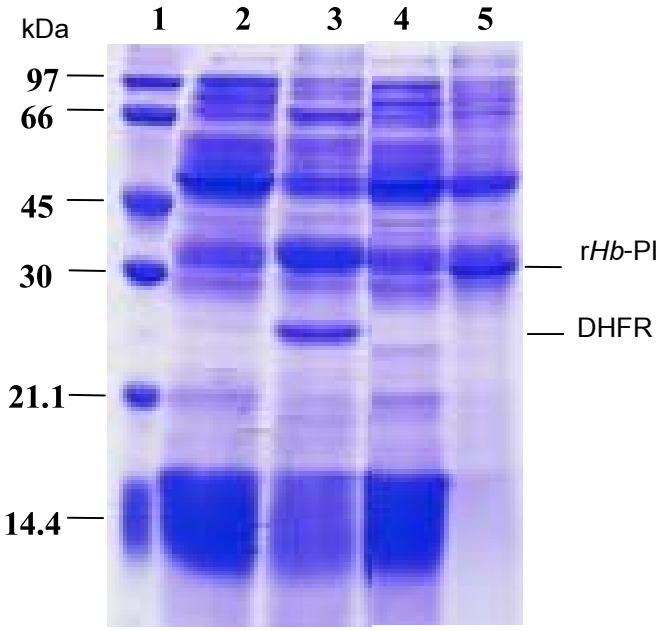
แถวที่ 3 : pQE-40 ที่มีชิ้นยีน *Hb*-PI

แถวที่ 4 : pQE-40 ที่มีชิ้นยีน *Hb*-PI ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Sal*I

แถวที่ 5 : ผลผลิตจากการทำ PC□โดยใช้พลาสมิด pQE-40 ที่มีชิ้นยีน *Hb*-PI เป็น DNA ต้นแบบในการเพิ่มจำนวน

4. **การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI**

โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI จากแบคทีเรียลูกผสมจะถูกชักนำให้มีการสังเคราะห์ออกมาโดยใช้การกระตุ้นด้วย IPTG และเขย่าเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง หลังจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยโพลิอะคริลาไมด์เจล อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมีเอสดีเอส พบว่า โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ที่สังเคราะห์ได้จะเชื่อมติดอยู่กับโปรตีน Dihydrofolate reductase (DHF□) มีขนาดโมเลกุลประมาณ 26 kDa ทำให้แถบโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI มีขนาดโมเลกุลเป็น 33.5 kDa (ภาพที่ 11 และ 12)



ภาพที่ 11 แถบโปรตีนส่วนที่ละลายที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE และ pQE-*Hb*-PI

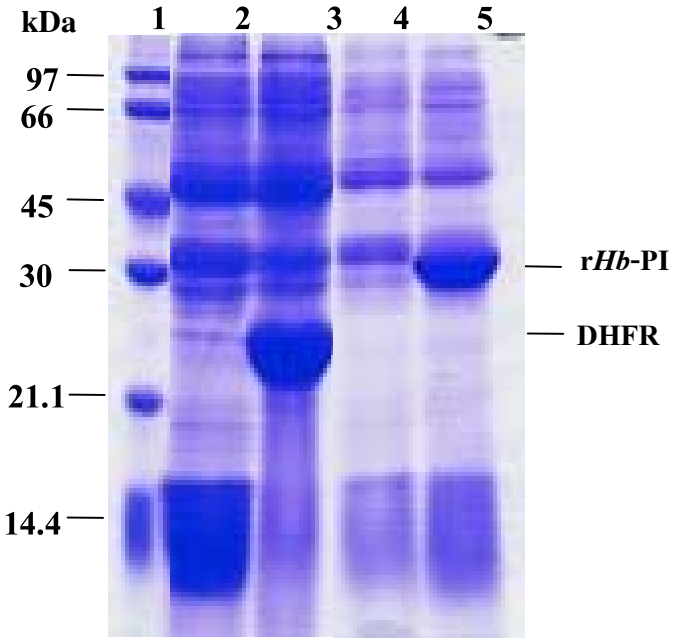
แถวที่ 1 : Low molecular weight marker

แถวที่ 2 : แถบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE ก่อนการชักนำด้วย IPTG.

แถวที่ 3 : แถบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE หลังการชักนำด้วย IPTG

แถวที่ 4 : แถบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE-*Hb*-PI ก่อนการชักนำด้วย IPTG

แถวที่ 5 : แถบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE-*Hb*-PI หลังการชักนำด้วย IPTG



ภาพที่ 12 แถบโปรตีนส่วนที่ไม่ละลายที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE และ pQE-*Hb*-PI

แถวที่ 1 : Low molecular weight marker

แถวที่ 2 : แถบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE ก่อนการชักนำด้วย IPTG.

แถวที่ 3 : แถบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE หลังการชักนำด้วย IPTG

แถวที่ 4 : แถบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE-*Hb*-PI ก่อนการชักนำด้วย IPTG

แถวที่ 5 : แถบโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากแบคทีเรียลูกผสม pQE-*Hb*-PI หลังการชักนำด้วย IPTG

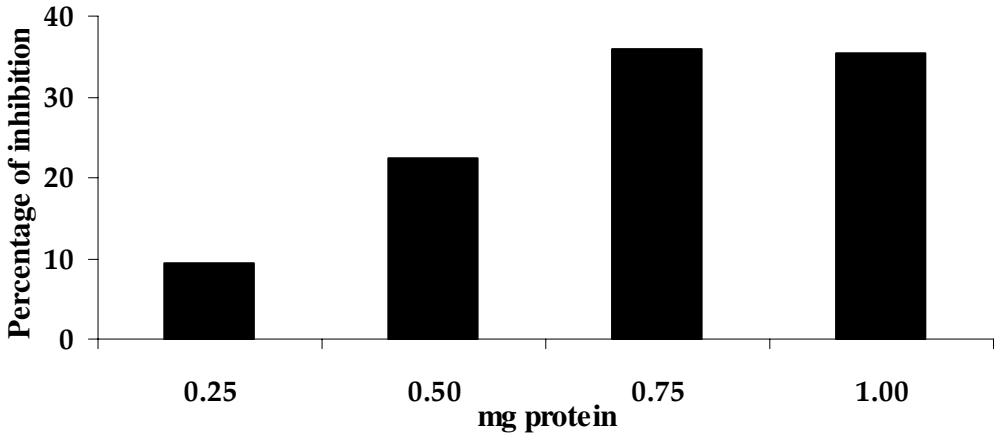
5. การศึกษาสมบัติของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI

5.1 การศึกษาสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Protease)

5.1.1 การศึกษากิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส

การศึกษากิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส จะใช้วิธี azocasein digestion method โดยใช้เอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ Trypsin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Chymotrypsin 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, Subtilicin A 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ Papain 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลอง พบว่า โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI สามารถยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมได้ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI เพิ่มขึ้น และที่ปริมาณโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI เป็น 0.75 มิลลิกรัม มีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุดเป็น 36% (ภาพที่ 13)

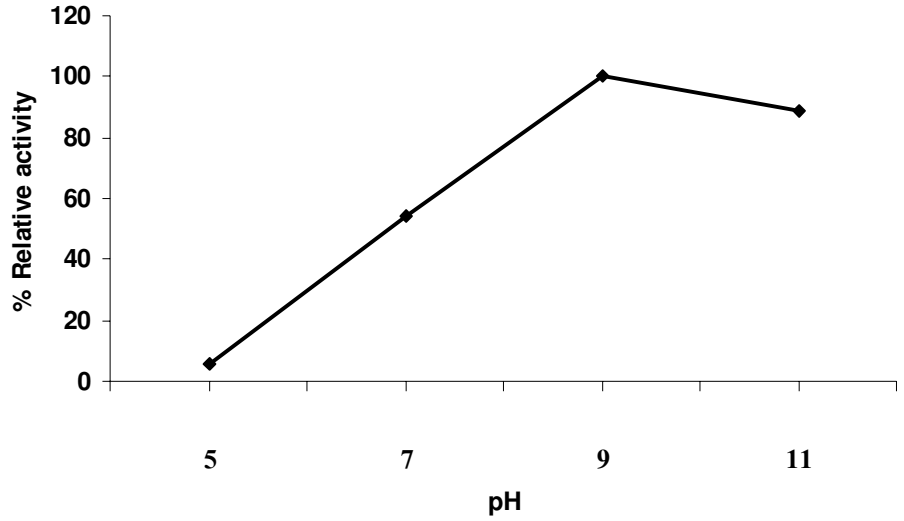
ในส่วนของการศึกษากิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ในการยับยั้งเอนไซม์อื่นๆ ได้แก่ Chymotrypsin, Subtilicin A และ Papain พบว่า โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้ที่ระดับความเข้มข้นที่กำหนด



ภาพที่ 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Trypsin 0.02 มิลลิกรัม โดยโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI (หักลบกับค่าการยับยั้งของโปรตีน DHF)

5.1.2 การศึกษาผลกระทบของ pH ต่อกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI

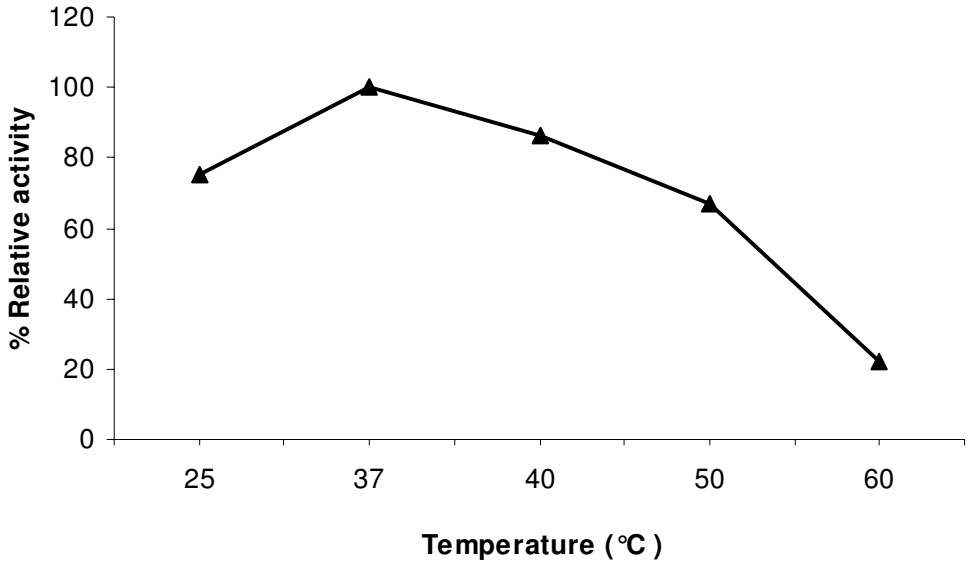
การศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสม (optimal pH) ต่อการทำให้เกิดกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI สูงที่สุด ในการทดลองนี้จะใช้เอนไซม์ Trypsin 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวทดสอบ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI สามารถยับยั้งได้ และจากการทดลอง พบว่าโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI จะเกิดกิจกรรมสูงที่สุดที่ระดับ pH เท่ากับ 9.0 ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl โดยกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI จะเริ่มเกิดขึ้นที่ระดับ pH เท่ากับ 7 และเพิ่มขึ้นจนมีกิจกรรมสูงที่สุดที่ระดับ pH เท่ากับ 9.0 เมื่อระดับ pH เพิ่มขึ้นกิจกรรมจะลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 14) รายงานผลเปรียบเทียบกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ในรูปของ % elative activity



ภาพที่ 14 กิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ที่ทำการทดสอบที่ระดับ pH ต่างๆ เมื่อให้ระดับ pH ที่มีกิจกรรมสูงที่สุดเป็น 100%

5.1.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI

จากการทดลองใช้อุณหภูมิที่ 25, 37, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ในการบ่มตัวอย่างเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้เกิดกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI สูงที่สุด พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI มีกิจกรรมสูงที่สุด และกิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI จะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 กิจกรรมของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ที่ทำการทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อให้ระดับอุณหภูมิที่มีกิจกรรมสูงที่สุดเป็น 100%

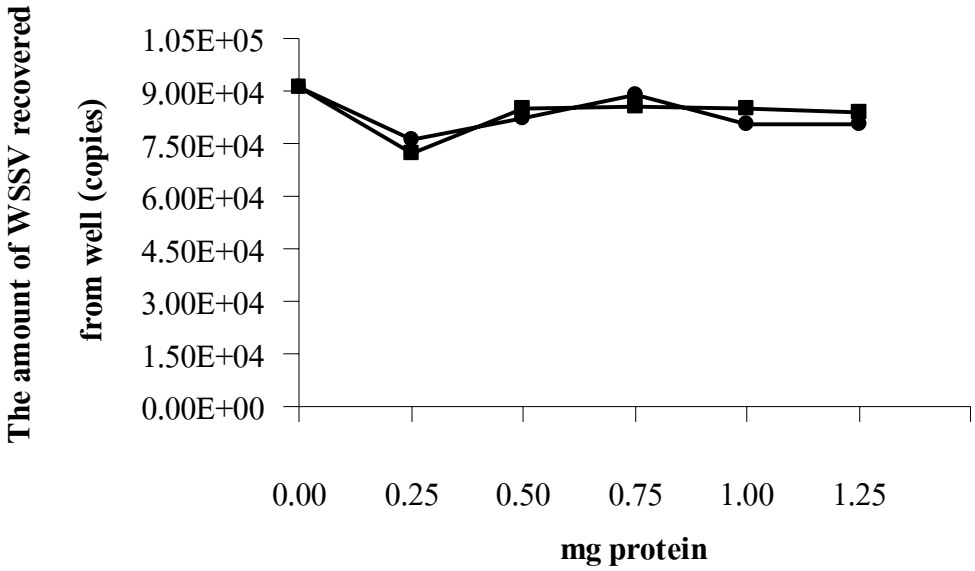
5.2 การศึกษาสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *M. luteus*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ซึ่งจะขับเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสออกนอกเซลล์ได้ มาใช้ในการศึกษา จากการทดลอง พบว่า โปรตีนลูกผสม *H*b-PI ที่ระดับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *M. luteus* จากการเลี้ยงใน 96- well plateนาน 16 ชั่วโมงได้

ในการทดสอบชนิดของคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด โดยการ Plate เชื้อที่ผ่านการทดสอบลงบนอาหารแข็ง พบว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด ยังสามารถเจริญเติบโตได้ จึงกล่าวได้ว่าโปรตีนลูกผสม *H*b-PI มีคุณสมบัติเป็น bacteriostatic

5.3 การศึกษาสมบัติในการยับยั้งไวรัสดวงแดงดวงขาว

เมื่อนำเซลล์ lympoild ของกุ้งขาว มาบ่มกับไวรัส WSSV และโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ใน 96- well plate จากนั้นสกัด DNA ในแต่ละหลุมมาทำ Q-PC□โดยใช้ไพร์เมอร์ FQ-P3 และ FQ-P4) ซึ่งจะไปเพิ่มจำนวนส่วนของยีน VP 664 ของไวรัส WSSV และวัดค่า copy ของยีนใน DNA ตัวอย่าง จากการทดลอง พบว่า ค่าจำนวน copy ที่วัดได้จาก DNA ตัวอย่างของชุดการทดลองที่ใช้โปรตีนลูกผสม *H*b-PI ในช่วงปริมาณ 1.25-0.25 มิลลิกรัม ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันกับชุดการทดลองที่ใช้โปรตีนจากแบคทีเรียลูกผสม pQE ในช่วงปริมาณเดียวกัน (ภาพที่ 16) จึงกล่าวได้ว่าโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งไวรัส WSSV ในช่วงปริมาณ 1.25-0.25 มิลลิกรัม



ภาพที่ 16 จำนวน Copy ของไวรัส WSSV ที่วัดได้จากแต่ละชุดการทดลอง

แทนจำนวน Copy ของไวรัส WSSV ที่วัดได้จากหลุมที่บ่มด้วยโปรตีนลูกผสม pQE

แทนจำนวน Copy ของไวรัส WSSV ที่วัดได้จากหลุมที่บ่มด้วยโปรตีนลูกผสม *H*b-PI

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาลำดับเบสและกรดอะมิโน ของยีน Protease inhibitor

ยีน *Hb*-PI ที่ได้จากการทำ cDNA library ของน้ำยางพารา เป็นยีนขนาดเล็ก โดยมี open reading frame เพียง 10 bp แปลรหัสได้เป็นกรดอะมิโนจำนวน 70 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 7.5 kDa ซึ่ง Protease inhibitor ที่พบโดยทั่วไปในพืชก็จะมีขนาดเล็ก น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4-0 kDa (Rao and Suresh, 007) และในลำดับเบสของยีน *Hb*-PI (accession no. EU 95479) มีส่วนของ polyadenylation signal ก่อนที่จะถึง Poly A tail จึงสันนิษฐานว่าเป็นยีนเส้นเต็มแล้ว

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Hb*-PI โดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลโดยวิธี BLASTn ในฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnological Information Bethesda, MD, USA; http://www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่ามีความเหมือนกับยีน *H. brasiliensis* protease inhibitor protein1 (PI1) mRNA (accession no. AY 1985) มากโดยมีค่าความเหมือน (%identity) สูงถึง 91% และเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ BLASTX ให้ผลว่า มีความเหมือนกับโปรตีน protease inhibitor protein 1 ของ *H. brasiliensis* (accession no. AAP46156) และ Protease inhibitor HPI (Protease inhibitor 1; HbPI1) ของ *H. brasiliensis* (accession no. Q6XNP7) ซึ่งเป็น serine protease inhibitor (Ko *et al.,* 003; Sritanyarat *et al.,* 006) ดังนั้น *Hb*-PI จากการศึกษาครั้งนี้จึงน่าจะเป็น serine protease inhibitor เช่นเดียวกัน

2. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Hb*-PI ในน้ำยางพาราด้วยเทคนิค Real time RCR

การแสดงออกของยีน Protease inhibitor จะถูกกระตุ้นด้วยการเกิดบาดแผลผ่านวิถี wound-signal transduction pathway (Koiwa et al., 1997) จากการทดลองของ Sritanyarat และคณะ (006) ได้ทำการตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin inhibitor ใน C-serum ของน้ำยางพารา พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับบาดแผลซ้ำๆ (multiple wound) แต่ในการศึกษานี้ระดับการแสดงออกของยีน *Hb*-PI ในน้ำยางพาราที่ระยะเวลาการกรีด 1 วัน, 3 วัน, 1 สัปดาห์, สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ พบว่า การแสดงออกของยีนสูงที่สุด ที่ระยะเวลาการกรีด 1 วัน แต่เมื่อระยะเวลาการกรีดเพิ่มขึ้น พบว่า ระดับการแสดงออกลดลงตามลำดับ ซึ่งอาจพอจะอธิบายได้คือ (1) ยีน *Hb*-PI จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเองของพืช เมื่อได้รับบาดแผลจะเกิดการ

แสดงออกของยีนมากที่สุด แต่เมื่อระยะเวลาการกรีดเพิ่มขึ้นการแสดงออกมีระดับลดลงนั้น อาจเนื่องจากโปรตีน *H*b-PI ไม่มีความจำเพาะกับบาดแผลที่เกิดขึ้น หรือ ( ) การลดลงของยีน *H*b-PI อาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการสนับสนุนการซ่อมแซมตัวเองของเซลล์ เพื่อให้เอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส ซึ่งมีความจำเป็นในกระบวนการซ่อมแซมตัวเองของเซลล์สามารถทำงานได้ง่ายขึ้น (Sjodahl et al., 00) ในทำนองเดียวกับปริมาณ Protease inhibitors ในเมล็ดพืชที่มีระดับความเข้มข้นสูงในระยะพักตัวของเมล็ด (seed dormancy) และปริมาณ Protease inhibitors จะลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะของการงอก (Germination) (Ridchardson, 1977; Enari and Mikala, 1967 อ้างโดย Mosolov and Valueva, 005) ส่วนความแตกต่างของการแสดงออกของ protease inhibitor ของ Sritanyarat และคณะ (006) กับผลการทดลองนี้เป็นไปในทิศทางตรงกันข้ามนั้น คาดว่าเกิดเนื่องมาจากการวัดของ Sritanyarat และคณะ (006) วัด Trypsin inhibitor ทุกชนิดใน C-serum ในขณะที่การทดลองนี้วัดเฉพาะการแสดงออกของยีนที่จำเพาะ

3. การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม *H*b-PI

การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม *H*b-PI ด้วยการชักนำด้วย 1mM IPTG ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จะได้โปรตีนลูกผสม *H*b-PI ที่เชื่อมติดอยู่กับโปรตีน Dihydrofolate reductase (DHFR) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 6 kDa ทำให้แถบโปรตีนลูกผสม *H*b-PI มีขนาดโมเลกุลเป็น 33.5 kDa โดยจะพบอยู่ทั้งในรูป soluble protein และ insoluble protein แต่อยู่ในส่วน insoluble protein มากกว่า ขณะที่การทดลองของ Zhang และคณะ (007) ที่ทำการโคลนและสังเคราะห์โปรตีน Trypsin inhibitor จาก Buckwheat ด้วยวิธีเดียวกันนั้น พบโปรตีนลูกผสมอยู่ในรูป soluble protein เท่านั้น การศึกษาของ Jhamb และคณะ (008) กล่าวว่า การใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนมีข้อจำกัด คือ การเกิดการม้วนพับ (folding) ที่ไม่สมบูรณ์ของโปรตีนที่ต้องการกระบวนการ post- translation modification หรือต้องมีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) จึงทำให้มีโปรตีนในรูปของ inclusion body เกิดขึ้น นอกจากนั้นการผลิต โปรตีนลูกผสมปริมาณมากใน *E. coli* เซลล์อาจทำให้กระบวนการม้วนพับเกิดขึ้นไม่ทันกับปริมาณการผลิตจึงทำให้โปรตีนที่ผลิตได้เกิดเป็นก้อนไม่สามารถละลายในไซโตพลาสซึมได้ (de Margo *et al.,* 005)

4. การศึกษาสมบัติของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI

4.1. การศึกษาสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Protease)

จากที่พบว่า *Hb*-PI เป็น serine protease inhibitor จึงได้ทำการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease ซึ่งได้แก่ Trypsin , Chymotrypsin และ Subtilicin A กลุ่ม cysteine protease ได้แก่ papain ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่า *Hb*-PI นี้เป็น protease inhibitor ที่สามารถยับยั้งทั้ง serine protease และ cysteine protease หรือไม่ โดยใช้ azocesein digestion method ซึ่งเป็นวิธีที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและมีความว่องไว (Ramakrishna and Ramakrishna, 2005) จากผลการทดลอง พบว่า โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI สามารถยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ได้ แต่ไม่ยับยั้งเอนไซม์ Chymotrypsin, Subtilicin A และ papain ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Sritanyarat และคณะ (2006) ที่ทำการทดสอบกิจกรรมของ Protease inhibitor HPI จากน้ำยางพารา โดยพบว่ามีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ Trypsin และ Subtilicin A ขณะที่กรดอะมิโนของ โปรตีนทั้งสองมีความเหมือนกันถึง 74% แต่ทั้งนี้ก็ไม่มีรายงานใดสรุปได้ว่าความเหมือนของลำดับเบสของกรดอะมิโนจะบ่งบอกถึงคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ของ protease inhibitor ได้ (Fan and Wu, 2005) เช่น กรณีของ potato proteinase inhibitor II (PPI II) ที่เป็น Protease inhibitor ในกลุ่ม potato inhibitor II family มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ Chymotrypsin ในขณะที่ Protease inhibitor อื่นๆในกลุ่มเดียวกันสามารถยับยั้งเอนไซม์ Trypsin และ Chymotrypsin ได้ (McManus *et al.,* 1994) หรือ pumpkin proteinase inhibitor (CMTI-V) ซึ่งเป็น Protease inhibitor ในกลุ่ม potato inhibitor I family มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ในขณะที่ Protease inhibitor อื่นๆ ในกลุ่มเดียวกันสามารถยับยั้งเอนไซม์ Chymotrypsin ได้ (Krishnamoorthi *et al.,* 1990)

โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI มีกิจกรรมสูงสุดใน Tris-HCl buffer pH 9 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของ Weber แล Nielsen (1991) พบว่า Serine protease inhibitor จากน้ำนมวัว จะมี optimal pH อยู่ที่ระดับ pH 6

4.2. การศึกษาสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *M. luteus*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสออกมาในระยะของการก่อโรค (pathogenesis) พบว่า โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *M. luteus* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแก

รมลบ *P. aeruginosa* ได้ การศึกษาของ Kim และคณะ (2006) พบว่า serine protease inhibitor จากมันฝรั่ง สายพันธุ์ Golden Valley สามารถต้านเชื้อ *Clavibacter michigenense* subsp. *michiganinse* และ S. aureus ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้เช่นกัน

Najafi และคณะ (2004) พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสที่หลั่งออกมาจาก *P. aeruginosa* เป็นชนิด alkaline protease ขณะที่เอนไซม์โปรตีเอสที่หลั่งจาก *S. aureus* จะมี serine protease รวมอยู่ด้วย (Shaw *et al.*, 2005) จึงอาจเป็นเหตุที่ทำให้ โปรตีนลูกผสม *H*b-PI สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้

และจากการ Spread plate เชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการบ่มกับโปรตีนลูกผสม *H*b-PI พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *M. luteus* และ *S. aureus* สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารแข็ง แสดงให้เห็นว่าโปรตีนลูกผสม *H*b-PI เป็น bacteriostatic คือ ยับยั้งการเจริญหรือเพิ่มจำนวนได้ แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้

4.3. การศึกษาสมบัติในการยับยั้งไวรัสดวงแดงดวงขาว

มีงานวิจัยหลายชิ้นที่ให้ความสนใจนำ Protease inhibitor ไปใช้เป็นยาต้านไวรัส โดยใช้สารสกัด protease inhibitor หรือใช้อนุพันธ์โปรตีนเลียนแบบ (peptidomimitic derivatives) กับเชื้อไวรัสที่ก่อโรคร้าย เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า เอนไซม์โปรตีเอสมีบทบาทในกระบวนการ protein processing ใน life cycle ของไวรัสได้ (Kondo et al., 2000) และมีการนำไปใช้ในทางการค้าแล้ว เช่น ยาต้านไวรัสโรคเอสด์ indinavir, saquinavir เป็นต้น (Fear *et al.*, 2007)

และงานวิจัยนี้ก็ได้นำโปรตีนลูกผสม *H*b-PI มาทดสอบคุณสมบัติในการต้านไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus: WSSV) ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์น้ำกลุ่ม Crustacean โดยใช้เซลล์ lymphoid จากกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamai*) มาใช้ทดสอบ จากการทดลอง พบว่าโปรตีนลูกผสม *H*b-PI ไม่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

การศึกษาการควบคุมหรือยับยั้งไวรัสตัวแดงดวงขาวในปัจจุบัน ส่วนใหญ่มุ่งเน้นที่จะนำโปรตีนจากตัวไวรัสมาใช้เป็นวัคซีน (Namikoshi *et al.*, 2004; Witteveldt *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบสารสกัดจากพืชหลากหลายชนิด และพบว่า สารสกัดจาก *Aegle marmelos*, *Cynodon dactylon*, *Lantana camara*, *Momordica charantia* และ *Phyllanthus amarus* มีคุณสมบัติในการยับยั้งไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ (Balasubramanian *et al.*, 2007)

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการตรวจพบยีน *Hb*-PI จาก cDNA library ของน้ำยางพารา จึงนำมาโคลนและศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ซึ่งสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. ยีน *Hb*-PI ที่ได้จากการทำ cDNA library ของน้ำยางพารา มี open reading frame 210 bp แปลรหัสได้เป็นกรดอะมิโนจำนวน 70 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 7.5 kDa
2. การแสดงออกของยีน *Hb*-PI ในน้ำยางพารามีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะการกรีดเพิ่มขึ้น
3. โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI สามารถยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ได้ แต่ไม่ยับยั้งเอนไซม์ Chymotrypsin, Subtilicin A และ papain
4. สภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI มีกิจกรรมสูงสุดใน Tris-HCl buffer pH เท่ากับ 9 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
5. โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *M. luteus* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa*
6. โปรตีนลูกผสม *Hb*-PI ไม่สามารถต่อต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านไวรัสของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI แม้ว่าผลการศึกษาพบว่า ไม่สามารถต่อต้านเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ แต่ก็ควรทำการศึกษาต่อในเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรค.
2. การศึกษาสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ของโปรตีนลูกผสม *Hb*-PI น่าจะได้ลองทดสอบกับเชื้อรา

เอกสารอ้างอิง

เจริญ นาคะสรรค์, สุรเชษฐ์ พรหมเดช และ อาซีซัน แกสมาน. 2549. กาวจากน้ำยางกราฟต์โคพอลิเมอร์ของยางธรรมชาติกับพอลิเมทิลเมทาคริเลท. ใน วิจัยยางพาราเพื่ออนาคตที่ยั่งยืน โครงการวิจัยแห่งชาติ: ยางพารา. วราภรณ์ ขจรไชยกูล (บรรณาธิการ). ฝ่ายอุตสาหกรรม สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย. หน้า 52-57.

นพรัตน์ บำรุงรักษ์. 2536. พืชหลักปักษ์ใต้. ปิรามิด จัดพิมพ์. กรุงเทพฯ.184 หน้า.

เปลื้อง สุวรรณมณี. 2549. โครงการความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริล โคเอนไซม์ เอ ซินเทส และผลผลิตยางในยางพารา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. 100 หน้า.

ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ และ ทรงธรรม บูรณะ. 2549.การเตรียมสารเคลือบผิวจากยางธรรมชาติอะคริเลท. ใน วิจัยยางพาราเพื่ออนาคตที่ยั่งยืน โครงการวิจัยแห่งชาติ: ยางพารา. วราภรณ์ ขจรไชยกูล (บรรณาธิการ). ฝ่ายอุตสาหกรรม สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย. หน้า 95-100.

สมพงศ์ สุขมาก. 2536. การปรับปรุงพันธุ์ยางพารา.เอกสารวิชาการเรื่องยาง สถาบันวิจัยกรมวิชาการเกษตร.หน้า 15-16.

สารภี ด้วงชู. 2550. การโคลนยีน Pactate lyase จากน้ำยางพารา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. 110 หน้า.

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ. มปป. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์: ยางพารา. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพ ฯ. 110 หน้า.

อาซีซัน แกสมาน, ศรัณยุ อมรชาติ และ เจริญ นาคะสรรค์. 2549. ศึกษาความเข้ากันได้ของยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ชนิดโรซานคาร์ปิลารี่. ใน วิจัยยางพาราเพื่ออนาคตที่ยั่งยืน โครงการวิจัยแห่งชาติ: ยางพารา. วราภรณ์ ขจรไชยกูล (บรรณาธิการ). ฝ่ายอุตสาหกรรม สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย. หน้า 223-231.

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology, ed 5th. Academic Press, San Diego. 922 pp.

Ashcroft, G.S., Lei, K., Jin, W., Longenecker, G., Kulkarni, A.B., Greenwell-Wild, T., Hale-Donze, H., McGrady, G., Song, X.Y. and Wahl, S.M. 2000. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. Nat. Med. 6: 1147-1153.

Balasubramanian, G., Sarathi, M., Kumar, S., Sahul, H.A.S. 2007. Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. Aquaculture. 263 : 15-19.

Birk, Y. 2003. Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering. Springer-Verlag, Berlin. 170 pp.

Blond, A., Cheminant, M., Deatoumieux-Garzon, D., Segalas-milazzo, I., Peduzzi, J., Goulard, C. and Rebuffat, S. 2002. Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. Eur. J. Biochem. 269: 6212-6222.

Boisen, S. 1983. Protease inhibitors in cereals. Occurrence, properties, and physiological role, and nutritional influence. Acta. Agric. Scand. 33: 369–381.

Bode, W. and Huber, R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur. J. Biochem. 204: 433-451.

Clark, A.M., Jacobson, K.R., Bostwick, D.E., Dannernhoffer, J.M., Skaggs, M.I. and Thomson, G.A. 1997. Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, phloem protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. Plant J. 12: 49-61.

Connors, B.J., Laun, N.P., Maynard, C.A. and Powell, W.A. 2002. Molecular characterization of a gene encodind a cystatin expressed in the stems of American chestnut (*Castanea dentate*). Planta. 215: 510-514.

De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R. and Ceci, L.R,. 2002. PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. Nucl. Acids Res. 30: 347-348.

de Marco, A., Vigh, L., Diamant, S. and Goloubinoff, P. 2005. Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in Escherichia coli by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. Cell Stress Chaperones. 10: 329-339.

Dunaevsky, Y.E., Pavlyukova, E.B., Gruban, T.N., Belyakova, G.A. and Belozerskii M.A. 1996. An extracellular protease of the nicromycete Alternaria alternata. Biochemistry. 61: 1350-1354.

Dunaevsky, Y.F., Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S. and Belozersky, M.A. 2005. Protease inhibitors in improvement of plant resistant to pathogen and insects. Mol.Biol. 39: 702-708.

Fan, S. and Wu, G.J. 2005. Characteristic of plant proteinase inhibitors and their application in combating phytophagous insects. Bot. Bull. Aced. Sin. 46: 273-292.

Fear, G., Komarnytsky, S. and Ruskin, I. 2007. Protease inhibitor and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. Pharmacol & Therap. 113: 354-368.

Habib, H. and Khalid M. F. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 2: 68-85.

Haq, S.K., Atif, S.M. and Khan, R.H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Arch. Biochem. Biophys. 431: 145-159.

Hermosa, M.R., Turra, D., Fogliano, V., Monte, E. and Lorito, M. 2006. Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea.* Physiol. Mol. Plant Pathol. 68: 138-148.

Hiemstra, P. S., van Wetering, S. and Stolk, J. 1998. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects of pulmonary epithelium. Eur. Respir. J.12: 1200–1208.

Hiemstra, P. S. 2002. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. Biochem. Soc. Trans. 30: 116-120.

Jakel, P.A., Hofsteenge, J. and Beintema, J.J. 2003. The patatin-like protein from the latex of *Hevea brasiliensis* (Hev b 7) is not a vacuolar protein. Phytochemistry. 63:517-522.

Jhamb, K. Jawed, A. and Sahoo, D.K. 2008. Immobilized chaperones : A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body broteins. Process Biochem. 43: 587-597.

Kim, M., Park, S., Kim, J., Lee, S. Y., Lim, H., Cheong H., Hahm, K. and Park, Y. 2006. Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety ‘‘Golden Valley’’. Biochem. Biophys. Res. Commun. 346: 681–686.

Ko, J. H., Chow, K. S. and Han, K. H. 2003. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of Hevea brasiliensis (para rubber tree). Plant Mol. Biol. 53: 479-492.

Koiwa, H. Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends Plant Sci. 2: 379-384.

Kondo, H., Abe, K., Nishimura, I., Watanabe, H., Emori, Y. and Arai, S. 1990. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. Molecular cloning, expression, and biochemical studies on oryzacystatin-II. J. Biol. Chem. 265: 15832–15837.

Kondo, H., Ijiri, S., Abe, K., Maeda, H. and Arai, S. 1992. Inhibitory effect of oryzacystatins and a truncation mutant on the replication of poliovirus in infected Vero cells. FEBS Lett. 299: 48–50.

Kreger, A. and Lockwood, D.1981. Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. 33: 583-590.

Krishnamoorthi, R., Gong, Y.X. and Richardson, M. 1990. A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed. FEBS. Lett. 273: 163-167.

Kuroda, M., Kiyosaki, T., Matsumoto, I., Misaka, T., Arai, S. and Abe, K. 2001. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. Biosci Biotechnol Biochem. 65: 22-28.

Kush, A., Goyvaerts, E., Chye, M.L. and Chua, N.H. 1990. Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). Proc. Natl. Aced. Sci. USA. 87: 1787-1790.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteria phageT. Nature. 227: 680-695.

Leang, D., Abbenante, G. and Fairlie, D.P. 2000. Protease inhibitors: current status and future prospect. J. Med. Chem. 43: 305-341.

Legrand, M., Kuaffmann, S., Geoffroy, P. And Fritic, B. 1987. Biological functionof pathogenesis-related protein : four tobacco pathogenesis related protein and chitinases. Pro. Nat. Acad. Sci. USA. 84 : 6750-6754.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J, Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

McManus, M.T., White, D.W.R. and McGregor, P. G. 1994. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests.Transgenic Res. 3: 50-58.

Martin, M.N. 1991. The latex of *Hevea brasiliensis* contains high levels of both chitinases and chitinases/lysozymes. Plant Physiol. 95: 469-476.

Mello, G. C., Oliva, M. L. V., Sumikava, J. T., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C. and Mecedo, M. L. R. 2002. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. J. protein. Chem. 20: 625-632.

Mosolov, V.V., Loginova, M.D., Fedurkina, N.V., and Benken, I.I. 1976. A specific inhibitor of Colletotrichum lindemuthianum protease from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Plant Sci. Lett. 7: 77-80.

Mosolov, V.V., Grigor'eva, L. I., and Valueva, T. A. 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (Review). App. Biochem. and Microbiol . 37: 131-140.

Mosolov, V. V. and Valueva, T. A. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. App. Biochem. and Microbiol . 41: 227–246.

Najafi M. F., Deobagkar, D. and Deobagkar, D. 2004. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. Electron. J. Biotechnol. 8: 197-203.

Namikoshi, A., Wu, J. L., Yamashiya, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M. and Muroga, K. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture. 229 : 25-35.

Odani, S., Koide, T., Ono, T. 1983. The complete amino acid sequence of barley trypsin inhibitor. J. Biol. Chem., 258: 7998-8003.

Patick, A.K and Potts, K.E. 1998. Protease inhibitors as antivirul agents. Clin. Microbiol. Rev. 11: 614-627.

Peña-Cortés, H., Fisahn, J. and Willmitzer, L. 1995. Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92: 4106-4113.

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

Pompe-Novak, M., Poljšak-Prijatelj, M., Popovič, T., Štrukelj, B. and Ravnikar, M. 2002. The impact of potato cysteine proteinases in plant growth and development. Physiol. Mol. Plant. Pathol. 60: 71-78.

Ramakrishna, V. and Ramakrishna, R. 2005. Purification of acidic protease from the cotyledons of germinating Indian bean (*Dolichos labla* L. var lignosus) seeds. Afr J Biotechnol. 4: 703 -707.

Reeck, G. R. Kramer, K. J., Baker, J. E., Kanost, M. R., Fabrick, J. A. and Behnke, C. A. 1997. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. *In* Advances in insect control : the role of transgenic plants to insects. Carozzi, N. and Koziel, M. (eds.). Taylor & Fraancis. London. pp. 157-183.

Richardson, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. Phytochemistry. 16: 159–169.

Rao, K.N. and Suresh, C.G. 2007. Bowman–Birk protease inhibitor from the seeds of Vigna unguiculata forms a highly stable dimeric structure. Biochem. et Biophys. Acta. 1774: 1264–1273.

Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopath. 28: 425-449.

Shaw, L.N., Golonka, E., Szmyd, G., Foster, S.J., Travis, J. and Potempa, J. 2005. Cytoplasmic Control of Premature Activation of a Secreted Protease Zymogen:

Deletion of Staphostatin B (SspC) in *Staphylococcus aureus* 8325-4 Yields a Profound Pleiotropic Phenotype. J Bacteriol. 187: 1751–1762.

Sin, S.F. and Chye, M.L. 2004. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. Planta. 219: 1010-1022.

Sjodahl, J., Emmwr, A., Vincent, J. and Roeraade, J. 2002. Characterization of proteinases from *Antarctic krill (Euphausia superba)*. Protein Expr. Purif. 26: 153-161.

Sritanyarat, W., Pearce, G., Siems, W. F., Ryan, C. A., Wititsuwannakul, R. and Wititsuwannakul, D. 2006. Isolation and characterization of isoinhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis.* Phytochemistry 67: 1644–1650.

Stockley, R. A. 1994. The role of proteinases in the pathogenesis of chronic bronchitis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150: 109-113.

Subroto, T., Van Koningsveld, G.A., Schreuder, H.A., Soedjanaatmadja, U.M.S. and Beintema, J.J. 1996. Chitinase and β1-1,3-glucanase in the lutoid-body fraction of Hevea latex. Phytochemistry. 43: 29–37.

Tiffin, P. and Gaut, B.S. 2001. Molecular evolution of the would-induced serine protease inhibitor *wip*1 in *Zea* and related genera. Mol. Biol. Evol. 18: 2092-2101.

Tremacoldi1, C.R. and Pascholati, S.F. 2002. Detection of trypsin inhibitor in seeds of *Eucalyptus urophylla* and its influence on the *in vitro* growth of the fungi *Pisolithus tinctorius* and *Rhizoctonia solani.* Braz. J. Microbiol. 33: 281-286.

Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N. and Ishida, I. 1997. The structure and function of a soybean β-glucan-elicitor-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94: 1029-1034.

Ussuf, K.K. Laxmi, N.H. and Mitrs, R. 2001. Proteinase inhibitors: plant-derived gene of insectisidal proteins for developing insect-resistant transgenic plants. Currents Science. 80: 847-853.

Vankatachalam, P., Thulaseedharan, A. and Raghothama, K. 2007. Identification of expression profiles of tapping panel dryness (TPD) associated genes from the latex of rubber tree (Hevea brasiliensis Muell. Arg.). Planta. 226: 499-515.

van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44: 135-162.

Valueva, T.A. and Mosolov, V.V. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganism. Biochemistry. 69: 1305-1309.

Yusof, F., Ward, M.A. and Walker, J.M., 1998. Purification and characterization of an inhibitor of rubber biosynthesis from C-serum of *Hevea brasiliensis* latex. J. Rubb. Res. 1: 95–110.

Yoza, K., Nakamura, S., Yaguchi, M., Haraguchi, K., and Ohtsubo,K. 2002. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor, cystatin, from Job's tears (Coix lacryma-jobi L. var. Ma-yuen Stapf). Biosci. Biotechnol. Biochem. 66: 2287-2291.

Yuan, L., Zhang, X., Chang, M., Jia, C., Hemmingsen, S.M. and Dai, H. 2007. A new fluorescent quantitative PCR-based in vitro neutralization assay for white spot syndrome virus. J. Virol. Methods. 146: 96-103.

Wasternack, C. and Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. Trends Plant Sci. 2: 302-307.

Weber, B. A. and Nielsen S. S. 1991. Isolation protease and partial characterization of a native serine-type inhibitor from bovine milk. J. Dairy Sci. 74: 764-771.

Wingate, V.P.M., Franceschi, V.R. and Ryan, C.A. 1991. Tissue and cellular localization of proteinase inhibitors I and II on the fruit of the wild tomato *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. Plant Physiol. 97: 490-495.

Wingens, M., van Bergen, B. H., Hiemstra, P. S., Meis, J. F. G. M., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Zeeuwen, P. L. J. M., Mulder, J., Kramps, J. A., van Ruissen, F. and Schalkwijk, J. 1998. Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 111: 996-1002.

Witteveldt, J., Vlak, J. M. and van Hulten, M. C. 2004. Protection of *Penaeus monodon* againt white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. Fish and Shellfish Immunol. 16 : 571-579.

Zhang, Z., LI, Y., Li, C., Yuan, J. and Wang, Z. 2007. Expression of a buckheat trypsin inhibitor gene in *Escherichia coli* and its effect on multiple myeloma IM-9 cell proliferation. Acta. Biochim. Biophys.Sin. 39: 701-707.

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สาระลายและบัฟเฟอร์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB (Luria Bertaini) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Yeast extracts	5	กรัม
Tryptone	5	กรัม
Sodium chloride	2.5	กรัม

เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

- Ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง Ampicillin sodium salt 100 มิลลิกรัม ละลายน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง Kanamycin 50 มิลลิกรัม ละลายน้ำปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลาย 1 M IPTG

ชั่ง IPTG 2.38 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลายสำหรับ SDS-PAGE

- การเตรียม 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 18.17 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย Hydrochloric acid ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- การเตรียม 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 12.10 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย Hydrochloric acid ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- การเตรียม 30% acrylamide-bisacrylamide ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง acrylamide 29 กรัม และ N,N'-methylene-bis acrylamide 1 กรัม ละลาย bisacrylamide ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่อยๆเติม acrylamide จนละลายหมด ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซเซียส

- การเตรียม 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- การเตรียม 10% Ammonium persulphate (APS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ชั่ง 0.1 กรัม APS ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เตรียมใหม่ก่อนใช้)

- การเตรียม 2X sample buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

10 % SDS	4	มิลลิลิตร
Glycerol	2	มิลลิลิตร
1 M Tris –HCl (pH 6.8)	1.2	มิลลิลิตร
1 M DTT	2	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	0.002	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- การเตรียม Tris-glycine buffer ปริมาตร 1 ลิตร

SDS	1	กรัม
Glycine	14.42	กรัม
Tris-base	4	กรัม

ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- การเตรียมสารละลาย Staining ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Coomassie blue R-250 2 กรัม ละลายใน 95 % methanol 525 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- การเตรียมสารละลาย Destaining I ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 95 % Methanol 526 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

- การเตรียมสารละลาย Destaining II ปริมาตร 1 ลิตร

ตวง 95 % Methanol 5.26 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

DMEM	1	กรัม
Sodium hydrogen carbonates	0.37	กรัม
Milli-Q water	100	มิลลิลิตร
Fetal Calf Serum	10	มิลลิลิตร
Penicillin-Streptomycin	2	มิลลิลิตร

ละลาย DMEM และ Sodium hydrogen carbonate ด้วยน้ำ Milli-Q ปรับ pH เป็น 7.2 เติม Fetal Calf Serum และ Penicillin-Streptomycin จากนั้นกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาด pore size 0.22 ไมครอน

6. การเตรียมสารละลาย PBS, pH 7.4 ปริมาตร 1 ลิตร

Sodium chloride	8.0	กรัม
Potassium Chloride	0.2	กรัม
Sodium hydrogen phosphate	1.44	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	0.24	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วยสารละลาย sodium hydroxide ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวไอนิง มูซอ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4822125

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ผลิตกรรมชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประเภททุนอุดหนุนโครงการสร้างความเข้มแข็งสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการ สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำการศึกษา 2548

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Aining, M., Wilaiwan, C. and Amornrat, P. 2008. Cloning and Characterization of Protease Inhibitor from Latex of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*). The 10th Graduate Research Conference. 18 January 2008. Khon Khen University, Thailand.