รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณลักษณะของโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ซึ่งแยกได้จากเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต

Characterization of protease inhibitor partially purified from *Hevea brasiliensis* cell suspension after copper sulfate treatment

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รศ.ดร. นันทา เชิงเชาว์

09.P78
5

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553 – 2554

บทคัดย่อ

โปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ (protease inhibitor, PI) ในพืช เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดเล็ก พบมากในเนื้อเยื่อสะสม เช่น ส่วนของหัวใต้ดินและเมล็ด แต่อาจพบในส่วนอื่นๆของพืชได้ด้วย การเกิดบาดแผล การโจมตีด้วยแมลง หรือเชื้อก่อโรคต่างๆ (pathogens) กระตุ้นให้มีการสร้าง PI เพิ่มขึ้น ที่มีการศึกษากันอย่างมากจะเป็น PI กลุ่มซึ่งยับยั้ง serine protease PI ที่สกัดจากเซลล์แขวนลอยยางพารามีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ subtilisin แต่ไม่ยับยั้งเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin เมื่อใช้ azocasein เป็น substrate จากการปรับสภาพเซลล์แขวนลอยยางพาราใน Morpholine-ethanesulfonic acid (MES) buffer พบว่าระดับของโปรตีนรวม, เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ PI มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จึงสามารถใช้ MES เป็น buffer ในชุดควบคุมเมื่อต้องการทดสอบเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วยอิลิซิเตอร์ต่างๆ พบว่าการกระตุ้นด้วย copper sulfate ($CuSO_4$) ความเข้มข้น 20 µM นาน 48 ชม.เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์ PI ในเซลล์แขวนลอยยางพารา หลังการกระตุ้นดังกล่าว ระดับแอคติวิตีของ PI จากส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์มีปริมาณสูงกว่าสารสกัดจากส่วนตะกอนเซลล์ ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับระดับของโปรตีนรวม แสดงว่า PI เป็นโปรตีนที่ผลิตเพื่อส่งออกไปทำงานนอกเซลล์ ดังนั้นในเบื้องต้น PI จากส่วนที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์จึงมีความเหมาะสมในการศึกษาการทำบริสุทธิ์เพราะมีโปรตีนปนเปื้อนน้อยกว่า เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวไปผ่านคอลัมน์แบบ anion exchange (DEAE-sepharose CL-6B) และชะด้วย 0.06 M NaCl ใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 แล้วทำบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Native-preparative gel electrophoresis และ SDS-preparative gel electrophoresis ตามลำดับ จะปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อนำมาแยกด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท PI บริสุทธิ์มีขนาดโมเลกุล 25 kDa และคิดเป็นปริมาณโปรตีน 3.14 x 10^{-3} mg/g เซลล์แขวนลอย จากการศึกษาคุณลักษณะของ PI บริสุทธิ์ พบว่าเสถียรทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นเบส (คงทนต่อ pH ในช่วง 2-10) และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C ความเข้มข้นของ PI บริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้ง subtilisin ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) คือ 11.13 nM และที่ 0.2 µM สามารถยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์และการยืดยาวของ mycelium ของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในยางพาราได้

Abstract

Plant protease inhibitors (PIs) are generally small proteins that have mainly been occurred in storage tissues such as tubers and seeds, and also in the aerial parts of plants. They are induced by plants in response to injury or attack by insects or pathogens. The most studied group of PIs in plants is the inhibitor of serine protease. The PI in *Hevea brasiliensis* cell suspension extract exhibited a strong inhibitory activity against subtilisin whereas trypsin and chymotrypsin were not inhibited by this PI when azocasein was used as substrate. Total protein, enzyme β-1,3-glucanase and PI levels were not significantly enhanced during shaking in Morpholine-ethanesulfonic acid (MES) buffer. Therefore, this buffer was appropriate for studying the effect of elicitors on *Hevea* cell suspension. The suitable concentration of $CuSO_4$ and incubation time for inducing PI in *Hevea* cell suspension was 20 μM and 48 h, respectively. After $CuSO_4$ treatment, higher PI activity was detected in the MES buffer than that found inside the cells, whereas most proteins were located oppositely. This result suggested that PI was produced to function extracellular. Thus the MES buffer containing high activity of PI but low level of other proteins, was selected for further purification. PI was purified by anion exchange chromatography on a DEAE-Sepharose CL-6B and eluted with 0.06 M NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.0. The active fractions were submitted to Native- and SDS- preparative gel electrophoresis, respectively. After electrophoresis and staining with silver nitrate, a single band of PI with molecular weight 25 kDa was revealed under Tricine-SDS–PAGE and the yield of purified protein was 3.14×10^{-3} mg/g cell suspension. This purified PI was still active in a broad pH range (2-10) and stable up to 70°C. The half maximal (50%) inhibitory concentration (IC_{50}) of the purified PI on subtilisin activity was determined to be 11.13 nM. In addition, the concentration of PI at 0.2 μM could inhibit the germination and mycelial growth of *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen.