รายงานการวิจัย

โคลนนิ่งและการแสดงออกของยีน *PR-1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของยางพารา

Cloning and Expression of Pathogenesis-Related Protein-1 (*PR-1*) Gene from *Hevea brasiliensis*

รศ.ดร.นันทา เชิงเชาว์
ดร.นิอร จิรพงศธรกุล
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2555 – 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “โคลนนิ่ง และการแสดงออกของยีน *PR-1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของยางพารา” ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2555 – 2556 จำนวนเงินทั้งสิ้น 904,000 บาท

บทคัดย่อ

PR-1 พบในปริมาณมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ pathogenesis related–proteins (PR-proteins) กลุ่มอื่นๆ โดยคิดเป็น 1-2 % ของโปรตีนรวมทั้งหมดในใบพืช โปรตีน PR-1 ตอบสนองต่อการติดเชื้อโรคต่างๆ ผ่านวิถีการป้องกันตนเอง แบบ systemic acquired resistance (SAR) ซึ่งใช้ salicylic acid (SA) เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ นอกจากมีปริมาณสูงขึ้นหลังติดเชื้อโรคแล้ว พบว่าโปรตีน PR-1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ ในการโคลนยีนเส้นเต็มของโปรตีน PR-1 จากใบยางพารา พบจำนวน 2 เส้น (*HbPR-1.1* และ *HbPR-1.2*) มี start และ stop codon ตำแหน่งเดียวกัน ที่ตำแหน่ง 35 และ 526 ตามลำดับ coding sequences (cds) มีความยาวเท่ากัน คือ 492 base pairs (bp) แต่บริเวณ 3′untranslated region (UTR) แตกต่างกันมาก กล่าวคือ *HbPR-1.1* มีความยาวของ 3′ UTR เท่ากับ 322 bp และ poly A signal คือ AATGAAA ส่วนยีน *HbPR-1.2* มี 3′ UTR ยาว 121 bp และ poly A signal คือ AATAAA พบว่ายีนทั้งสองมีความคล้ายคลึงกับยีน *PR-1* ของพืชอื่นๆ อยู่ในช่วง 71-78%

โปรตีนทั้งสองแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 163 residues เท่ากัน มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง คือ ที่ตำแหน่ง 161 จาก Arginine (R) เป็น Lysine (K) พบว่า HbPR-1.1 มีค่า pI 8.57 และน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 17,708.96 ดาลตัน สำหรับ HbPR-1.2 มีค่า pI 8.56 และน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 17680.95 ดาลตัน จึงจัดอยู่ในกลุ่ม basic PR-1 โปรตีนทั้งสองมี signal peptide ยาว 26 residues เท่ากัน และพบว่ามีความคล้ายคลึงกับโปรตีน PR-1 ของพืชอื่นๆ อยู่ในช่วง 70-76% พบ 2 บริเวณสำคัญบนลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPR-1.1 และ HbPR-1.2 ได้แก่ SCP_PR-1_like domain (SCP like extracellular protein domain) และ SCP superfamily domain ซึ่งเป็น domain หลักของโปรตีนกลุ่มที่ถูกขนส่งออกนอกเซลล์ โปรตีนที่มี domain นี้พบทั้งในสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอตและยูคาริโอต รวมถึงโปรตีน PR-1 ในพืช โดย CRISPs (cysteine-rich secretory proteins) เป็นโปรตีนกลุ่มหลักของ family นี้ นอกจากนี้ยังตรวจพบ GHYTQVVWRNS (CRISP_1) และ FIGCNYDPPGNF (CRISP_2) ซึ่งมีความอนุรักษ์สูงในลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPR-1.1 และ HbPR-1.2 รวมทั้งพบ cysteine 6 residues ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จำเพาะของโปรตีน PR-1 ด้วย

ยีน *PR-1* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่ต่างกันของยางพารา ได้แก่ ใบและเซลล์แขวนลอย พบว่าใบที่มีอายุน้อยซึ่งมีการป้องกันทางโครงสร้างต่ำ มีการแสดงออกของยีน *PR-1* สูงกว่าใบที่มีอายุมากกว่า การแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราพันธุ์ต่างๆ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Phytophthora palmivora* มีการแสดงออกสูงขึ้นตามลำดับความต้านทานของยางพาราพันธุ์นั้นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน *PR-1* และยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ defense เช่น *POD* (peroxidase), *CAT* (catalase), *CHI* (chitinase) และ *GLU* (glucanase) หลังติดเชื้อ *P. palmivora* มีแบบแผน (pattern) ที่คล้ายคลึงกันคือ เพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมง (ชม.) ลดลงที่ 12 ชม. และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ที่ 18-24 ชม.

Abstract

PR-1 is the most abundant of pathogenesis-related proteins (PR-proteins) found in plants, 1-2 % can be detected in plant leaves. It is induced by pathogens through pathways which leads to systemic acquired resistance (SAR) using salicylic acid (SA) as signal molecule. In addition to the up-regulation after infection, the purified PR-1 can inhibit growth of plant pathogens. This research in *Hevea brasiliensis* leaves, two *PR-1* genes (*HbPR-1.1* and *HbPR-1.2*) were cloned as full length. They had the start and stop codons at the same place, at positions 35 and 526, respectively. Therefore, the coding sequences (cds) were equal with the length of 492 base pairs (bp), however the 3′untranslated regions (UTR) were quite different. The 3′ UTR of *HbPR-1.1* was 322 bp and used AATGAAA as poly A signal while the 3′ UTR of *HbPR-1.2* was 121 bp and selected AATAAA as poly A signal. Both genes gave high sequence identities (71-78 %) to other *PR-1* genes found in plants.

The deduced amino acids from *HbPR-1.1* and *HbPR-1* were 163 residues. Only one residue was changed, at position 161, from Arginine (R) to Lysine (K). The HbPR-1.1 had pI 8.57 and molecular weigth (MW) of 17,708.96 daltons while the HbPR-1.2 had pI 8.56 and MW of 17680.95 daltons. They were therefore classified as basic PR-1. Both contained the same length of signal peptide, 26 residues. They showed high sequence identities (70-76%) to other PR-1 proteins found in plants. Two significant areas were detected, SCP_PR-1_like domain and SCP superfamily domain in the amino acid sequences of HbPR-1.1 and HbPR-1. These domains were commonly found in the extracellular proteins of both prokaryotes and eukaryotes including plant PR-1 protein. The CRISPs (cysteine-rich secretory proteins) is the main one in this family. The CRISP_1 (GHYTQVVWRNS) and CRISP_2 (FIGCNYDPPGNF), the highly conserved regions, were also found in the amino acid sequences of HbPR-1.1 and HbPR-1. In addition, both possessed cysteine 6 residues which was the specific character of the PR-1 protein.

PR-1 gene from *Hevea brasiliensis* was expressed in both leaves and cell suspension. In younger leaves with lower structural defense exhibited higher expression of *PR-1* gene than the older ones. The expression of the *PR-1* gene in different cultivars after infection with *Phytophthora palmivora* indicated that its expression level was related to the degree of resistance of each cultivar. Furthermore, the expressions of the other defense genes such as *POD* (peroxidase), *CAT* (catalase), *CHI* (chitinase) and *GLU* (glucanase) were also investigated comparing to the expression of *PR-1* gene. They gave the same patterns of induction after *P. palmivora* infection, mRNA were raised at 6 hours after infection (hai) then reduced at 12 hai and continuously increased at 18-24 hai.

สารบาญ

เรื่อง	หน้า
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	10
บทนำ	13
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	13
2. วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	15
3. วิธีดำเนินการวิจัย	16
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	20
ผลการทดลองและวิจารณ์	21
สรุป	52
เอกสารอ้างอิง	54

สาบาญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ degenerate primers ที่ออกแบบได้ 24

สารบาญรูป

หน้า

รูปที่ 1 Stage ต่าง ๆ ของใบยางพารา A, B_1, B_2, B_2-C, C และ D 18

รูปที่ 2 การชักนำให้เกิดแคลลัส 21

รูปที่ 3 การชักนำให้เกิดเซลล์แขวนลอย 22

รูปที่ 4 ผลการทำ sequence alignment ของยีน *PR-1* จาก *Arabidopsis thaliana* และ *Eutrema wasabi* 24

รูปที่ 5 PCR product ของยีน *PR-1* จาก cDNA ของใบยางพารา โดยใช้ degenerate primers 25

รูปที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *PR-1* ในยางพาราที่อ่านได้จาก degenerate primers 26

รูปที่ 7 PCR product ของยีน *PR-1* จาก cDNA ของใบยางพาราโดยใช้ specific primers 26

รูปที่ 8 PCR product ที่ได้จากการทำ 3′- RACE โดยใช้ cDNA จากใบยางพารา ซึ่งฉีดพ่นด้วยซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* 27

รูปที่ 9 การตรวจสอบแถบ A และ B ที่ได้จากการทำ 3′ RACE 28

รูปที่ 10 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PR-1* ที่อ่านได้จากการโคลนแถบ A และ B 29

รูปที่ 11 ตำแหน่งของ primer ต่าง ๆ สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5′ ของยีน *PR-1* (AHbPR1R3 BHbPR1R3 และ HbPR1R2) 30

รูปที่ 12 แผนผังในการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5′ และ full length ของยีน *PR-1* (*APR1* และ *BPR1*) 31

รูปที่ 13 แผนผังการสอบทวนเพื่อให้ได้ยีนเส้นเต็ม แบบที่ 1 ใช้ primer FHbPR1full_1 กับ AHbPR1R3 หรือ BHbPR1R3 แบบที่ 2 ใช้ FHbPR1full_2 กับ PCR anchor primer 32

รูปที่ 14 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR-1.1* และ *HbPR-1.2* บริเวณ 3′ UTR 35

รูปที่ 15 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR-1.1* และ *HbPR-1.2* 35

สารบาญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 16 ผลการทำ sequence alignment ของลำดับกรดอะมิโนของ *HbPR-1.1* และ *HbPR-1.2* กับโปรตีน PR-1 จากพืชชนิดต่าง ๆ 37

รูปที่ 17 ผลการ blast ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPR-1.1 และ HbPR-1.2 พบตำแหน่ง SCP_PR-1_like domain และ SCP superfamily domain 38

รูปที่ 18 ผลการทำ sequence alignment ของโปรตีน HbPR-1.1 และ HbPR-1.2 กับโปรตีน PR-1 จากพืชชนิดต่าง ๆ เพื่อแสดง CRISP_1 และ CRISP_2 39

รูปที่ 19 เปรียบเทียบการเกิดรอยไหม้ในใบยางอายุต่างกัน หลังบ่มด้วยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น $1X10^6$ zoospores/ml เป็นเวลา 24 ชม. 41

รูปที่ 20 การแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราที่มีอายุต่างกัน 43

รูปที่ 21 การแสดงออกของยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* ในใบยางพาราที่มีอายุต่างกัน 44

รูปที่ 22 การแสดงออกของยีน *PR-1* ในเซลล์แขวนลอยยางพาราก่อนและหลัง treat ด้วย SA ความเข้มข้น 1 mM และ 10 mM เป็นเวลา 6 ชม. 45

รูปที่ 23 เปรียบเทียบการเกิดรอยไหม้ ในใบยางพาราพันธุ์ต่าง ๆ หลังบ่มด้วยเชื้อ *P. palmivora* ความเข้มข้น $1X10^6$ zoospores/ml เป็นเวลา 24 ชม. 46

รูปที่ 24 ผลการแสดงออกของยีน *PR-1* ในใบยางพาราสายพันธุ์ต่าง ๆ 48

รูปที่ 25 การแสดงออกของยีน *ITS* ของเชื้อ *P. palmivora* ในใบยางแต่ละสายพันธุ์ 49

รูปที่ 26 การแสดงออกของยีน *PR-1* เปรียบเทียบกับยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ defense ในยางพารา หลัง treat ยางต้นกล้าด้วย SA 50

รูปที่ 27 การแสดงออกของยีน *PR-1* เปรียบเทียบกับยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ defense ในยางพารา หลัง treat ยางต้นกล้าด้วยเชื้อ *P. palmivora* 51

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

α	=	alpha
bp	=	base pairs
β	=	beta
β-ME	=	β-mercaptoethanol
h	=	hour
kDa	=	kilodalton
pH	=	-log hydrogen ion concentration
λ	=	lamda
Tm	=	melting temperature
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
O.D.	=	optical density
%	=	percent
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
Tris-HCl	=	Tris (hydroxymethylaminomethane) hydrochloride
v/v	=	volume per volume
w/v	=	weight per volume
UV	=	ultraviolet

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุอุปกรณ์

1) **สารเคมีเกรดวิเคราะห์** (analytical grade)

ชื่อสารเคมี	**บริษัทผู้ผลิต**
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid	Merck
Agar	วิทยาศรม
Ampicillin	Sigma
Bromophenol blue	Sigma
Calcium carbonate	Fluka
Ethylenediaminetetracetic (EDTA)	Baker
Glycerol	Carlo Erbr
Hydrochloric acid	Merck
Isopropanol	Sigma
β-mercaptoethaol	Merck
Potato dextrose agar	Difco
Sodium chloride (NaCl)	BDH
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck
Sodium salicylate	Sigma
Triton-X 100	Merck
V_8	Campbell Soup
Yeast extract	Sigma

2) **สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา** (molecular biology grade)

ชื่อสารเคมี	**บริษัทผู้ผลิต**
Agarose	Vivantis
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal)	Vivantis
Deoxynucleotide-5′-triphosphate (dNTP)	Roche
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Bio Basic inc.

DNA Ladder 100 bp plus	Vivantis
DNaseI recombinant, grade I	Roche
Ethidium bromide	Vivantis
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Isopropylthio-β-galactoside (IPTG)	Sigma
Luria Bertaini (LB)	Sigma
QIAprep® Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit protocol	Qiagen
Oligo dT primer	Invitrogen
5′, 3′ - RACE Kit, 2nd Generation Kits	Roche
Rnase-free Dnase set	Qiagen
Spectrum™ Plant total RNA Kit	Sigma
SuperScript™ III First-Strand Synthesis System	Invitrogen
T4 DNA ligase	Promega
Taq DNA polymerase	Invitrogen

จุลินทรีย์

1) แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10 (Invitrogen)
2) เชื้อ *Phytophthora palmivora*

อณูชีวโมเลกุล (molecular biology molecule)

1) พลาสมิดเวกเตอร์ pGEM® T-Easy vector (Promega)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ

1) กล้องจุลทรรศน์ Olympus CH40 (Japan)
2) กล้องถ่ายรูป Sony cybershot W5 5.1 ล้านพิกเซล digital (Japan)
3) โกร่งบด
4) เครื่องแก้วพื้นฐาน (กระบอกตวง ขวดปรับปริมาตร ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ และหลอดทดลอง)
5) เครื่องชั่งสองตำแหน่ง Diethelm model 12909657 (Japan)
6) เครื่องแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis system) (Mupid)
7) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

8) ช้อนโลหะและช้อนพลาสติกสำหรับตักสาร

9) ตู้ปลอดเชื้อ Ehret (Germany)

10) ไมโครออโตปิเปต พร้อมทิป ขนาด 0.1-2, 2-20, 10-100, 100-1000และ 1000-5000ไมโครลิตร

11) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave SS-320 Tomy Japan)

12) Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

13) Gel Doc รุ่น BioDoc-It™ system

14) Heat box

15) Microcentrifuge 5804 R Eppendorf (Germany)

16) Petroff hausser counting chamber

17) pH meter Cyperscan 1000 (Singapore)

18) Spectrofluorometer RF-1501 Shimadzu (Japan)

19) Thermal cycler: Eppendorf Mastercycler

20) UV box, Vilber Lourmat (France)

21) UV light transilluminator (UVP)