รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน Pathogenesis-Related-1 (PR-1)
จากยางพารา (*Hevea brasilliensis*)
Expression and purification of Pathogenesis-Related-1 (PR-1) protein
from rubber tree *(Hevea brasilliensis*)

นันทา เซิงเชาว์
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่

อุไรวรรณ ขุนจันทร์
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปัตตานี

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตและทำบริสุทธิ์โปรตีน Pathogenesis-Related-1 (PR-1) จากยางพารา (*Hevea brasilliensis*)” ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2560 จำนวนเงินทั้งสิ้น 495,000 บาท

บทคัดย่อ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย การชักนำให้ต้นยางพาราเกิดความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคโดยกลไกการป้องกันตนเองเป็นวิธีการที่ปลอดภัย ไม่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม พืชสร้างและสะสมโปรตีนกลุ่ม pathogenesis-related proteins (PRs) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรคและสภาวะเครียดต่าง ๆ ปัจจุบันแบ่ง PRs ได้เป็น 17 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ PR-1 เป็นกลุ่มที่มีลักษณะเด่นในด้านการยับยั้งเชื้อ และถูกใช้เป็นโปรตีนเครื่องหมายเพื่อบ่งบอกสภาวะการเกิดระบบ systemic acquired resistance (SAR) ในพืช แม้ว่าจะมีรายงานการสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีน PR-1 จากพืชหลายชนิด แต่ยังไม่มีการศึกษาจากยางพารา อย่างไรก็ตามจากรายงานการทำบริสุทธิ์โปรตีนชนิดนี้โดยตรง พบว่าเตรียมได้ในปริมาณต่ำ และยิ่งไปกว่านั้นโปรตีน PR-1 ยังไม่มี antibody ที่จำเพาะเจาะจงในการเกิดปฏิกิริยา และไม่มีแอคติวิตี้เช่นเอนไซม์ต่างๆ จึงยากต่อการติดตามระหว่างกระบวนการเตรียมให้บริสุทธิ์ ดังนั้นการนำเทคโนโลยีดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA technology) มาใช้ในการผลิตโปรตีนชนิดนี้จึงมีความเหมาะสมมากกว่า อีกทั้งสามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ในปริมาณมากและรวดเร็วกว่าการแยกจากใบยางพาราโดยตรง

การผลิต recombinant PR-1 protein จากยางพาราหรือ HbPR-1 โดยใช้ยีนเส้นเต็ม *HbPR-1* (accession number KM514666) เป็น DNA template ใน 2 ระบบ คือ 1) prokaryotic expression system โดยเลือกใช้ vector 4 ชนิด : pET28a(+), pETMlrL-HT, Chaperone plasmids และ pHis-ATS, และ 2) eukaryotic expression system แบบ *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system ในต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) พบว่าเมื่อใช้ pET28a(+), pETMlrL-HT และ Chaperone plasmids เป็น vector ได้ recombinant HbPR-1 protein ที่อยู่ในรูป inclusion body มากกว่าส่วนของ soluble protein ซึ่งยากในการนำไปทำบริสุทธิ์ ส่วน pHis-ATS เป็น vector ที่สามารถผลิตโปรตีนแล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ แต่ปริมาณของโปรตีนที่ผลิตได้ไม่เพียงพอในการนำไปทำบริสุทธิ์และนำไปใช้ประโยชน์ สุดท้ายผู้วิจัยประสบความสำเร็จโดยการใช้ *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system ในต้นยาสูบ และทำบริสุทธิ์โปรตีนในขั้นตอนเดียวด้วยวิธี affinity chromatography จากการศึกษาบทบาทของโปรตีน HbPR-1 ในระบบป้องกันตนเองของพืช โดยการฉีด *A. tumefaciens* ที่มี pGD_HbPR-1 เข้าไปในใบของต้นยาสูบ แล้วตามด้วยเชื้อ *Phytophthora palmivora* พบว่า recombinant HbPR-1 protein ที่แสดงออกในต้นยาสูบ สามารถป้องกันการเข้าทำลายด้วยเชื้อดังกล่าวได้ และจากการทดสอบด้วย purified recombinant HbPR-1 protein พบว่าโปรตีน HbPR-1 สามารถยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์ได้ 64% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโปรตีน HbPR-1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* ได้

ABSTRACT

Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is an economically important crop of Thailand. Induced resistance in plants to their pathogens is worth to explore becase it is safe for the farmers and the environment. Pathogenesis-related proteins (PRs) which are implicated in inhibiting growth and spread of pathogens are induced and accumulated in host plants. PRs have so far been classified into 17 different families. The biological activity of PR-1 protein is antimicrobial which has been frequently used in many plant species as a marker for systemic acquired resistance (SAR). Although there were many studies on PR-1 protein in several plant species, a study of PR-1 in *H. brasiliensis* has not been reported. Due to no antibody available to directly monitor PR-1 protein, isolation and purification of this protein using classical biochemical approaches are difficult. Furthermore, direct purification of endogenous PR-1 protein from the rubber tree plants is time-consuming since they have long growth cycle and low protein expression levels. Therefore, a recombinant DNA technology is likely to be a suitable choice for producing a large amount of PR-1 protein for further application in agriculture, industry and pharmacy.

The HbPR-1 protein was produced using 2 expression systems, 1) prokaryotic expression system (pET28a(+), pETMlrL-HT, Chaperone plasmids and pHis-ATS); and 2) eukaryotic expression system (*Agrobacterium*-mediated transient gene expression system in *Nicotiana benthamiana*), respectively. The recombinant HbPR-1 protein produced by the pET28a(+), pETMlrL-HT and Chaperone plasmid vectors were found as inclusion bodies more than soluble proteins which were difficult for further purification. While the pHis-ATS vector was able to produce and release the HbPR-1 protein to the media, however the obtained yield was not enough for further investigation. Finally, expression and purification of recombinant HbPR-1 protein were successful using Agrobacterium-mediated transient expression and one-step of affinity chromatography. Heterologous expression of HbPR-1 in *N. benthamiana* reduced necrosis areas which were inoculated with *Phytophthora palmivora* zoospores, indicating that the expressed HbPR-1 protein played an important role in plant resistance to pathogen. The purified recombinant HbPR-1 protein was found to inhibit 64% of *P. palmivora* zoospore germination on a water agar plate compared with control, suggesting that it was an antimicrobial protein against *P. palmivora*.

สารบัญ

เนื้อหา	**หน้า**
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
บทที่ 1 บทนำ	**9-10**
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	9
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
ขอบเขตของโครงการวิจัย	10
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	**11-25**
ยางพารา	11
Phytophthora palmivora	12
กลไกการป้องกันโรคของพืช	12
Salicylic acid (SA)	13
Pathogenesis-related proteins (PRs)	15
Pathogenesis-related-1 protein (PR-1 protein)	15
การผลิต recombinant PR-1 protein	19
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	**26-39**
การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการผลิต recombinant PR-1 protein	26
การผลิต recombinant HbPR-1 protein ด้วย prokaryotic expression system	26
HbPR-1 gene expression in *Nicotiana benthamiana* ใช้ *Agrobacterium*-mediated transient expression system	36
การศึกษาบทบาทของโปรตีน PR-1 ในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในระบบป้องกันตนเองของพืช	38
ผลของ recombinant HbPR-1 protein ต่อการงอกของซูโอสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora palmivola*	39
การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ	39

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 40-59

การผลิต recombinant HbPR-1 protein ด้วย prokaryotic expression system 40

การผลิต recombinant HbPR-1 protein ด้วย eukaryotic expression vector โดยใช้ transient expression system ในต้นยาสูบ *N. benthamiana* 50

การศึกษาบทบาทในระบบป้องกันตนเองของพืชของโปรตีน HbPR-1 ในต้นยาสูบ 55

ผลของโปรตีน HbPR-1 ในการยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* 56

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 60

เอกสารอ้างอิง 61

รายการตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ชนิดและหน้าที่ของ PR-proteins กลุ่มต่าง ๆ 16

ตารางที่ 2.2 รายละเอียดของ Chaperone plasmid ทั้ง 5 ชนิด 23

ตารางที่ 3.1 ปริมาณของสารที่ใช้ในการทำ PCR 28

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR ด้วยเครื่อง Techne TC-412 Thermal Cycler (Techne Ltd., United Kingdom) 28

ตารางที่ 3.3 ปริมาณของสารที่ใช้ในการตัด *HbPR-1* PCR product และ pET28a(+) vector ด้วย restriction enzyme *BamHI* และ *SalI* 30

ตารางที่ 3.4 ปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการเชื่อมกัน (ligation) ระหว่าง digested *HbPR-1* PCR product กับ digested pET28a(+) vector 30

ตารางที่ 3.5 ปริมาณของสารที่ใช้ในการทำ colony PCR ด้วย Acc Prime Taq HF polymerase (Biolab) 31

ตารางที่ 3.6 สภาวะสำหรับการสังเคราะห์ *HbPR-1* PCR product ด้วยเครื่อง Techne TC-412 Thermal Cycler (Techne Ltd., United Kingdom) 31

รายการรูปภาพ

หน้า

รูปภาพ

รูปที่ 2.1 โรคในยางพาราซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *P. palmivora*. 12
รูปที่ 2.2 การส่งสัญญาณของโมเลกุลส่งสัญญาณ salicylic acid (SA)
เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR* โดยทำงานผ่านโปรตีน NPR1 ในระบบ SAR 14
รูปที่ 2.3 วิถีการสังเคราะห์ SA ในพืช 14
รูปที่ 2.4 แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของ PR-1 protein 17
รูปที่ 2.5 แผนภาพ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET28a(+) vector 22
รูปที่ 2.6 แผนภาพ Chaperone plasmids 23
รูปที่ 2.7 แผนภาพ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGD vector 25
รูปที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR-1* เส้นเต็มขนาด 647 คู่เบส 26
รูปที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR-1* บริเวณ CDS จำนวน 492 คู่เบส 27
รูปที่ 3.3 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน HbPR-1 จำนวน 163 residue 27
รูปที่ 3.4 ลำดับกรดอะมิโนและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbPR-1* บริเวณ signal peptide 29
sequences ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SignalP 4.1 server
รูปที่ 3.5 การฉีดเชื้อ *A. tumefaciens* เข้าสู่ใบของต้นยาสูบ *N. benthamiana* 37
รูปที่ 4.1 HbPR-1 PCR product 40
รูปที่ 4.2 Purified double digested plasmid pET28a(+) และ PCR product ของ *HbPR-1* 40
รูปที่ 4.3 PCR product ของ *HbPR-1* colony 41
รูปที่ 4.4 PCR product ของ *HbPR-1* plasmid ของ colony ที่ 1 41
รูปที่ 4.5 SDS-PAGE ของ pET28a(+)-HbPR-1 protein expression 42
รูปที่ 4.6 Purified double digested plasmid PETMlrLHT และ PCR product of *HbPR-1* 42
รูปที่ 4.7 PCR product of PETMlrLHT_HbPR-1 colony และ PETMlrLHT_HbPR-1 plasmid 43
รูปที่ 4.8 SDS-PAGE ของ PETMlrLHT_MBP และ PETMlrLHT_MBP+HbPR-1 protein 44
expression

หน้า

รูปที่ 4.9 SDS-PAGE ของ BL21_CHAP1_pET28a(+)_*HbPR1*, BL21_CHAP2_ pET28a(+)_*HbPR1*, BL21_CHAP3_pET28a(+)_*HbPR1*, BL21_CHAP4_pET28a(+)_ *HbPR1* and BL21_CHAP5_pET28a(+)_*HbPR1* protein expression 46
รูปที่ 4.10 *HbPR-1* PCR product 47
รูปที่ 4.11 Purified double digested pHIS-ATS vector และ PCR product ของ *HbPR-1* 47
รูปที่ 4.12 PCR product ของ *HbPR-1* colony และ pHIS_*HbPR-1* plasmid 47
รูปที่ 4.13 Western blot ของ pHIS_HbPR-1 protein expression 48
รูปที่ 4.14 Western blot ของ recombinant pHIS_HbPR-1 protein ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 49
รูปที่ 4.15 Western blot ของ desalted และ concentrated ของ recombinant HbPR-1 protein 49
รูปที่ 4.16 The purified PCR product ของ *HbPR-1* 51
รูปที่ 4.17 Purified double digested plasmid pGD และ PCR product ของ *HbPR-1* 51
รูปที่ 4.18 PCR product ของ *HbPR-1* 51
รูปที่ 4.19 PCR product ของ *HbPR-1* plasmid 52
รูปที่ 4.20 PCR product ของ Agrobacterium_pGD_PR-1 52
รูปที่ 4.21 การผลิต recombinant HbPR-1 protein ในต้นยาสูบ 54
รูปที่ 4.22 การทำบริสุทธิ์ recombinant HbPR-1 protein จากใบของต้นยาสูบ 55
รูปที่ 4.23 ผลของโปรตีน HbPR-1 ในการป้องกันต้นยาสูบ ต่อเชื้อก่อโรค *P. palmivora* 56
รูปที่ 4.24 ผลของโปรตีน HbPR-1 ต่อรอยไหม้บนใบยาสูบ หลังติดเชื้อ *P. palmivora* 57
รูปที่ 4.25 ผลของ recombinant HbPR-1 ต่อการงอกของซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* 57
รูปที่ 4.26 ลักษณะของซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ที่เจริญบนอาหาร 1.5% water agar หลังจากได้รับสารทดสอบต่าง ๆ 58