ชื่อวิทยานิพนธ์	การโคลนยีน Pectate lyase จากน้ำยางพารา
ผู้เขียน	นางสาวสารภี ด้วงชู
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

น้ำยางจากต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ประกอบด้วยเนื้อยาง (cis-1,4-polyisoprene) ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับอุตสาหกรรมยาง การศึกษาครั้งนี้ได้เตรียมคลังยีนจากน้ำยางพารา เพื่อค้นหายีนต่างๆ ที่แสดงออกในน้ำยางพารา คลังยีนที่ได้มีขนาดประมาณ 10^7 pfu/ml สุ่มคัดเลือกโคลนจำนวนทั้งหมด 413 โคลน ไปหาการเรียงลำดับเบสและเปรียบเทียบกับข้อมูลของธนาคารยีน พบว่า เป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างยาง 48 โคลน (11.6%) และรองลงมาเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบป้องกันตนเอง 36 โคลน (8.7%) ทำการคัดเลือกยีน pectate lyase จากคลังยีนเพื่อทำการศึกษาสมบัติของยีน หลังจากทำการโคลนยีนเส้นเต็มด้วยเทคนิค RACE พบว่า ได้ยีน pectate lyase 2 ยีนที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ Hb-Pel-1 (GenBank Accession No. EU009500) และ Hb-Pel-2 (GenBank Accession No. EU009501) สามารถแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนเป็น 393 และ 323 กรดอะมิโน ตามลำดับ ยีนทั้งสองมีความเหมือนกับยีน pectate lyase จาก *Arabidopsis thaliana* 74% โดยยีน Hb-Pel-1 มีจำนวนกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นภายในสายโปรตีนระหว่างลำดับที่ 38-108 เมื่อเทียบกับยีน Hb-Pel-2 และได้ทำการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 และ GST-Hb-Pel-2 ในพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX 4T-1 เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเฉพาะ GST-Hb-Pel-1 ที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ GST-Hb-Pel-1 นั้นต้องใช้แคลเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ และความเข้มข้นของ $CaCl_2$ และ pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์คือ 0.3 mM $CaCl_2$ และ pH 7 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาการแสดงออกของยีน pectate lyase ด้วยเทคนิค Real time-PCR พบว่า มีการแสดงออกสูงสุดหลังจากกรีดวันแรกและค่อยลดลงเมื่อเพิ่มระยะการกรีด เป็นไปได้ว่ายีน pectate lyase อาจมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและเจริญเติบโตของเซลล์ laticifer

Thesis Title Cloning of Pectate lyase from Latex of Rubber Tree

Author Miss Sarapee Duangchu

Major Program Biochemistry

Academic Year 2007

ABSTRACT

Latex from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) contains 30–50% (w/w) of natural rubber (cis-1,4-polyisoprene), the important raw material for many rubber industries. We have constructed a cDNA library from the latex of *H. brasiliensis* to investigate the expressed genes and molecular events in the latex. The primary library contained 10^7 pfu/ml, 413 randomly selected cDNA clones were sequenced and analyzed by homology searches against data in GenBank. Of the total ESTs, 48 clones (11.6%) were identified as gene encoding rubber biosynthesis-related gene, the second abundant transcript were defense related gene (36 clones; 8.7%). Two cDNAs, namely, Hb-Pel-1 (GenBank Accession No. EU009500) and Hb-Pel-2 (GenBank Accession No. EU009501) encoding pectate lyase were also isolated. Hb-Pel-1 and Hb-Pel-2 encoded the predicted proteins of 393 and 323 amino acids, respectively. Comparison of deduced amino acid sequence revealed that the Hb-Pel-1 and Hb-Pel-2 showed 74% identity to the pectate lyase from *Arabidopsis thaliana*. The Hb-Pel-1 contained the internal extra peptide between amino acid residue 38-108 as compared to Hb-Pel-2. Interestingly, the activity of GST-Hb-Pel-1 expressed in *E. coli* was detected whereas the GST-Hb-Pel-2 was found no activity. The GST-Hb-Pel-1 showed Ca^{2+} dependent pectate lyase activity and the optimum concentrations and pH were 0.3 mM $CaCl_2$ and pH 7, respectively. To determine the expression of Hb-Pel in the latex by qPCR, the result showed that the Hb-Pel expression was the most abundant on the 1st day of tapping and subsequently declined after 3 days-4 weeks of tapping. This result indicates that pectate lyase may play an important role in laticifer development.