บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเตรียม EST library จากน้ำยางพารา

การค้นหายีนที่สนใจจาก cDNA library ด้วยวิธี Expressed Sequence Taq (EST) เป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับยีนที่แสดงออกในขณะนั้น ที่หลากหลายและรวดเร็ว ทำให้ได้ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลที่เกิดขึ้น งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสร้าง cDNA library จากน้ำยางพาราที่มีขนาด 10^7 pfu/ml ซึ่งถือว่าได้ว่ามีประสิทธิภาพ ครอบคลุมในการค้นหายีนต่างๆ ที่แสดงออกได้ เนื่องจากข้อจำกัดทางด้านงบประมาณในหาลำดับเบส จึงทำการสุ่มคัดเลือกโคลนทั้งหมด 413 โคลน เพื่อไปหาลำดับเบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลธนาคารยีน (GenBank) แล้ว พบทั้งยีนที่มีความเหมือนกับยีนที่เคยมีการรายงานไว้แล้วและที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน จากการสร้าง EST library ครั้งนี้ พบว่ามียีนที่มีความเหมือนกับยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างยาง (rubber biosynthesis-related protein) มากที่สุดถึง 48 โคลน (11.6%) และรองลงมาคือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเอง (defense or stress-related protein) จำนวน 36 โคลน (8.7%) ยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีนและ RNA ต่างๆ (gene expression and RNA metabolism) จำนวน 28 โคลน (6.8%)

โดยในจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างยาง 48 โคลน (11.6%) พบยีนกลุ่ม rubber elongation factor มากกว่า 90% ของจำนวนยีนในกลุ่มนี้ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ko และคณะ (2003) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค EST library และ cDNA AFLP พบน้ำยางพาราซึ่งประกอบด้วยยีน rubber elongation factor และ SRRP (small rubber particle protein) ถึง 29% ของคลังยีนทั้งหมด เป็นไปได้ว่ายีนกลุ่ม rubber elongation factor น่าจะมีความสำคัญในกระบวนการสร้างยางของต้นยางพารา (Dennis and Light 1989; Yeang *et al.*, 1996) เช่นเดียวกับการรายงานของ Han และคณะ (2000) พบยีนที่เกี่ยวที่เกี่ยวข้องกับการสร้างยางมากที่สุดถึง 16% ของ cDNA library ของน้ำยางพารา และรองลงมาเป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบป้องกันตัวเอง 12.6%

กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบป้องกันตัวเอง เช่น ASR-like protein disease resistance related protein รวมทั้งยีนกลุ่ม protease inhibitor เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kush และคณะ (1990) การแสดงออกของยีนกลุ่มป้องกันตัวเอง โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค northern blot พบว่ามีการแสดงออกของยีนในน้ำยางสูงกว่า 10-50 เท่าเมื่อเทียบกับส่วนใบของต้นยางพารา และมีการกล่าวถึงบทบาทหน้าที่ของน้ำยางเกี่ยวกับระบบป้องกันตัวเอง เป็นไปได้ว่าสารกลุ่ม isoprenoids รวมทั้งเทอร์ปีน (terpenes) และ สเตียรอยด์ (steroids) ที่ประกอบในน้ำยาง สามารถต้านทานการย่อยสลายจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ (Farrell *et al.*, 1991) นอกจากนี้น้ำยางยังเป็นส่วนที่ป้องกันการบุกรุกของเชื้อราและแมลงต่างๆ ได้โดยโปรตีนที่ประกอบในน้ำยางยังมีคุณสมบัติที่เป็น chitin binding protein (hevein) และ chitinase activity ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้ในส่วนของ lutiod organelle ของน้ำยางพารา (Kekwish, 2001)

กลุ่มยีนที่มีจำนวนรองลงมา คือ กลุ่มที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนและการสร้างโปรตีน ในยีนกลุ่มนี้พบ Myb transcription factor (MYB) จำนวน 2 โคลน เป็นยีนกลุ่ม transcription factor ทำหน้าที่ช่วยหรือควบคุมในกระบวนการพัฒนาของเซลล์รวมถึงการตอบสนองต่างๆ ของพืช สำหรับในยางพารา พบว่า Myb transcription factor สามารถถูกชักนำหลังจากการกรีดเนื้อเยื่อที่มี laticiferous cell ในต้นยางพาราที่สมบูรณ์ (healthy) การทดลองของ Venkatachatam และคณะ (2007) ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในต้นยางพาราที่สมบูรณ์เทียบกับยางที่เป็นโรคเปลือกแห้งหรือหน้ากรีดแห้ง (tapping panel dryness : TPD) ด้วยเทคนิค suppression subtractive hybridization (SSH) ยีน MYB เป็นหนึ่งในกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกสูงกว่าในต้นที่สมบูรณ์เทียบกับต้นที่เป็นโรคเปลือกแห้ง ด้วยเทคนิค RT-PCR และ northern blot การแสดงออกที่ลดลงของยีน MYB ในต้นยางที่เป็นโรคอาจเนื่องจากเซลล์มีการแบ่งเซลล์ลดลง จึงคาดว่าน่าจะนำยีน Myb transcription factor มาใช้เป็นยีนเครื่องหมาย (molecular marker) ในการตรวจสอบโรคเปลือกแห้งในต้นยางพาราได้

กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ในระบบเมตาบอลิซึมนั้น พบยีน S-adenosylmethionine decarboxylase จำนวน 3 โคลน เป็น key enzyme ในกระบวนการสร้างสารกลุ่ม Polyamine เช่น spermidine และ spermime จากการศึกษาของ Wi และคณะ (2006) พบว่าเมื่อนำยีน S-adenosylmethionine decarboxylase จากดอกคาร์เนชั่นเข้าสู่ต้นยาสูบเป็น transgenic plant พบว่าสามารถทำให้พืชทนต่อสภาวะเครียดจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีชีวิต (abiotic stress) เช่น สภาวะเครียดเกลือ กรด และความเย็น ได้มากกว่าต้นยาสูบที่เป็นสายพันธุ์ปกติ (wild type) และกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารของเซลล์ พบ Thioredoxin h เป็นโปรตีนขนาดเล็ก

ขนาดประมาณ 12-14 กิโลดาลตัน ที่มี active site เป็น Typ-Cys-Gly-Pro-Cys- ซึ่งมีพันธะไดซัลไฟด์ ระหว่างกรดอะมิโน cysteine สองตัว ที่ทำหน้าที่รีดิวซ์โปรตีนที่มีพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุล ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการต่างๆ เช่น การกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ หรือทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอน ผ่าน flavoprotein เช่น NADPH จากการศึกษาของ Hasdia และคณะ (2004) พบว่า มีการแสดงออกของยีน Thioredoxin h ในเนื้อเยื่อเปลือกของผล grapefruit เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับเชื้อรา *Penicilium digitatum* ด้วยเทคนิค RNA gel blot hybridization จากผลการทดลองดังกล่าว Thioredoxin h อาจทำหน้าที่เป็นโปรตีนสื่อในการกระตุ้นโปรตีนในระบบป้องกันตนเองของพืชได้ และกลุ่มสุดท้ายคือ กลุ่มที่ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่และยังไม่มีการรายงาน พบจำนวนมากที่สุดในคลังยีน ถึง 37% โดยพบยีน latex abundant protein 1 ถึง 6 โคลน ซึ่งสอดคล้องกับการทำ cDNA library จากน้ำยางพาราของ Han และคณะ (2000) ที่พบว่า latex abundant protein มีความเหมือนกับ yeast hypothetical protein ที่ยังไม่ทราบหน้าที่

4.2 การเตรียมยีนเส้นเต็ม (Full length cDNA) ของยีน pectate lyase จากน้ำยางพารา

ในการศึกษาครั้งนี้หลังจากหาการเรียงลำดับเบสเพื่อเตรียมยีนเส้นเต็มของยีน pectate lyase จากน้ำยางพาราด้วยเทคนิค 5′ RACE ได้แล้ว เมื่อออกแบบ primer ที่จำเพาะกับยีนเพื่อเพิ่มจำนวนยีนเส้นเต็มด้วยเทคนิค RT-PCR ได้ยีนสองชิ้นที่มีขนาดต่างกัน ซึ่งได้มีรายงานการพบ isoform ของ pectate lyase โดยการศึกษาของ Pua และคณะ (2001) ได้สร้าง EST library ของผลกล้วยสุก (*Musa acuminata*) ได้เตรียมยีนเส้นเต็มของยีน pectate lyase พบ 2 isoforms คือ MWPL1 และ MWPL2 โดยมีขนาดแตกต่างกันคือ มีลำดับกรดอะมิโน 407 และ 454 กรดอะมิโน ตามลำดับ

หลังจากไปหาลำดับเบส เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่าเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในธนาคารยีนพบว่ามีความเหมือนกับยีน pectate lyase ทั้งยีน Hb-Pel-1 และ Hb-Pel-2 ซึ่ง Hb-Pel-1 มีจำนวนกรดอะมิโนภายในสายโปรตีนจำนวน 70 กรดอะมิโนมากกว่า Hb-Pel-2 ซึ่งจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสองกับกรดอะมิโนของยีน pectate lyase ในสิ่งมีชีวิตอื่นแล้ว จำนวนกรดอะมิโนที่มากกว่าของ Hb-Pel-1 อาจมีส่วนช่วยในการม้วนพับของโปรตีนทำให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับยีน pectate lyase ของต้นบานชื่น *Zinnia elegans* (Domingo *et al.*, 1998) ส่วนยีน pectate lyase ในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่ไม่มีลำดับกรดอะมิโนส่วนนี้ เช่นเดียวกับยีน Hb-Pel-2 ยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์ จากการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์ pectate lyase แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างทั้ง

ขนาดและการจัดโครงรูปของเอนไซม์ แต่จะมีโครงสร้างที่เหมือนกัน คือ เป็นแบบ parallel-β-helix จะประกอบด้วยตำแหน่งการจับของ Ca^{2+} ไอออนและสับสเตรต โครงสร้างที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซไซม์จะมีผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน (Kita *et al.*, 1996) และจากการศึกษาโครงสร้างของ pectate lyase C ของแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* พบว่าตำแหน่งที่สับสเตรตสามารถจับกับเอนไซม์ได้เป็นหมู่อะมิโนที่มีประจุบวก ทั้ง ไลซีนและอาร์จินีน ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น proton abstraction ในปฏิกิริยา β-elimination ของการย่อยสับสเตรต จึงน่าสนใจที่จะศึกษา active site ของ Hb-Pel-1 และ Hb-Pel-2 ในระดับโปรตีนต่อไป

4.3 การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนลูกผสม pectate lyase

จากการผลิตโปรตีนลูกผสม pectate lyase ของพืช มีทั้งผลิตในแบคทีเรีย (Domino *et al.*, 1998) และยีสต์ (Marín-Rodríguez *et al.*, 2003) สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้ผลิตโปรตีนลูกผสม Hb-Pel-1 และ Hb-Pel-2 ในแบคทีเรีย ได้โปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 และ GST-Hb-Pel-2 เมื่อนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เบื้องต้นโดยใช้ส่วน crude extract มาทดสอบ โดยใช้โปรตีน GST ในปริมาณที่เท่ากันเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเฉพาะ GST-Hb-Pel-1 เท่านั้นที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อผลิตโปรตีนลูกผสมที่อุณหภูมิต่ำและเขย่าเลี้ยงแบบความเร็วต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้อยู่ในรูปสารละลาย และอาจเนื่องจากกรดอะมิโนจำนวน 70 กรดอะมิโน ตั้งแต่ลำดับกรดอะมิโนที่ 38 ถึง 108 มีความสำคัญต่อโครงสร้างของโปรตีน pectate lyase ซึ่งมีลักษณะการม้วนพับแบบ parallel-β-helix (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002)

เมื่อศึกษาผลของ Ca^{2+} ไอออนและ pH ต่อกิจกรรมของโปรตีน GST-Hb-Pel-1 โดยทั่วไปแล้วสามารถแยกเอนไซม์ pectate lyase ออกจาก pectin lyase ได้ด้วย Ca^{2+} ไอออน เนื่องจากเอนไซม์ pectate lyase ต้องการ Ca^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา ในขณะที่เอนไซม์ pectin lyase ไม่ต้องการ Ca^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา เช่นเดียวกับการศึกษาเอนไซม์ pectate lyase ใน *Bacillus subtilis* ต้องการ Ca^{2+} ช่วยในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน (Nasser *et al.*, 1990) สอดคล้องกับการศึกษาเอนไซม์ pectate lyase ในพืชชั้นสูง อย่างเช่น ในยางของดอกฝิ่น (opium puppy) ต้องการ Ca^{2+} ไอออนในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เช่นกัน (Pilatzke-Wunderlich and Nessler, 2001) จากการศึกษาครั้งนี้ โปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 ต้องการ Ca^{2+} ในการเกิดปฏิกิริยาเช่นกัน จากผลทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า Hb-Pel-1 เป็นเอนไซม์ pectate lyase

จากกิจกรรมของเอนไซม์ pectate lyase ที่เกิดขึ้นจากการโปรตีนที่ผลิตจากดีเอ็นเอลูกผสมนั้น พบว่าปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์เพคติเนส (pectinase) ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ การหมักชาและกาแฟ รวมถึงใช้ในกระบวนการกำจัดน้ำเสียที่มีสารเพคตินอยู่ด้วย (Hoondal *et al.*, 2002) สำหรับเอนไซม์ pectate lyase นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ เนื่องจากวิธีการในกระบวนการล้างเส้นใย เช่น ฝ้าย ป่าน ที่ใช้ทั่วไป คือ ใช้สารเคมีที่เป็นด่างแก่และความเข้มข้นสูง ซึ่งนอกจากจะทำลายเส้นใยแล้ว ของเสียที่เกิดขึ้นยังเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ยากต่อการกำจัดอีกด้วย จึงนำเอนไซม์ pectate lyase มาประยุกต์ใช้แทนด่างแก่ในขั้นตอนการล้าง เพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายเพคติน และกำจัดสารอื่นๆ ออกจากเส้นใยได้ ซึ่งการใช้เอนไซม์แทนสารเคมี สามารถลดต้นทุนในการผลิตและการจำกัดของเสียจากกระบวนการผลิตได้เป็นอย่างดี

4.4 การศึกษาการแสดงออกของยีน pectate lyase ของต้นยางพาราที่มีระยะเวลาการกรีดแตกต่างกัน

เมื่อมีการกรีดส่วนลำต้นของยางพารา laticiferous cell ในท่อน้ำยางถูกทำลาย ส่วนที่เป็นน้ำยางก็จะไหลออกมา เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายผนังเซลล์ของ laticifer ยังมีการศึกษาน้อย ส่วน primary wall ของพืชประกอบด้วย 3 ส่วนหลักๆ คือ ส่วน cellulose-Xyloglucan pectic polysaccharides และส่วน structural protein (Pilatzke-Wunderlich and Nessler, 2001) เพคติน (pectin) ถือเป็นโครงสร้างที่เป็นเป้าหมายของเชื้อก่อโรคในพืช ในการทำลายผนังเซลล์ของพืชเพื่อบุกรุกเข้าสู่เจ้าบ้าน ในการทำลายร่างแหเพคตินต้องใช้การทำงานของเอนไซม์หลายชนิดรวมกัน pectate lyase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการทำลายเพคตินในพืช (Tamaro, 2001) แต่บทบาทหน้าที่ของยีน pectate lyase ในน้ำยางยังมีการศึกษาน้อย จากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า ยีน pectate lyase มีการแสดงออกสูงสุดในวันแรกของการกรีดยางนั้น อาจเป็นไปได้ว่า ยีน pectate lyase อาจช่วยในการทำลายส่วนเพคตินของผนังเซลล์ของ laiticifer ได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Pilatzke-Wunderlich และ Nessler (2001) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยผนังเซลล์ในน้ำยางของดอกฝิ่น โดยพบว่า ยีน pectate lyase มีการแสดงออกสูงเฉพาะในส่วนน้ำยางเท่านั้นต่างจากชิ้นส่วนอื่นๆ ของพืช จากผลการทดลองดังกล่าว เอนไซม์ pectate lyase อาจมีส่วนสำคัญในการกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์ laticifer ส่วนยีน pectate lyase ในต้นบานชื่น ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนออกซิน ซึ่งอาจสำคัญในกระบวนการ elongation และ differentiation ของเซลล์พืชได้ (Domingo *et al.*, 1998)