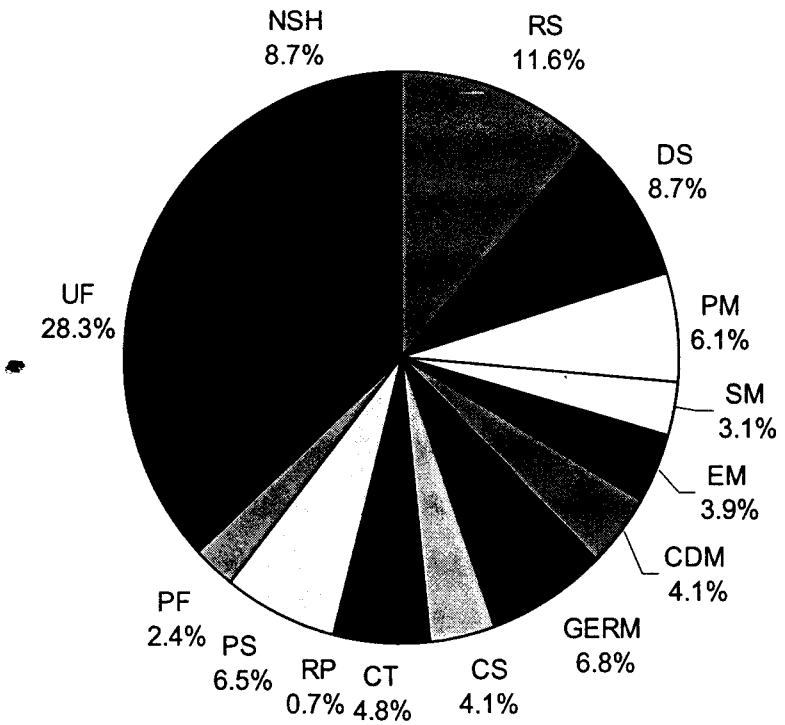
บทที่ 3
ผลการทดลอง

1. การเตรียม EST library และการศึกษาการเรียงลำดับเบส

ผลจากการทำ cDNA library จากน้ำยางของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ได้ library ที่มีขนาด 10^7 pfu/ml สุ่มเลือกโคลนทั้งหมด 413 โคลน นำไปหาการเรียงลำดับเบสและเปรียบเทียบกับยีนที่มีการรายงานแล้วในธนาคารยีน (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BlastX (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) จากผลการวิเคราะห์และคัดเลือกยีนที่มี Expectation value (E-value) จากการ BlastX $<10^{-7}$ และสามารถจัดกลุ่มยีนโดยแยกตามหน้าที่ได้ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนโคลนและเปอร์เซ็นต์ในแต่ละกลุ่มยีนตามหน้าที่

Function category	Number in category	Number in category (%)
rubber synthesis (RS)	48	11.6
defense or stress (DS)	36	8.7
gene expression and RNA metabolism (GERM)	28	6.8
chromatin and DNA metabolism (CDM)	17	4.1
primary metabolism (PM)	25	6.1
secondary metabolism (SM)	13	3.1
energy metabolism (EM)	16	3.9
cellular transport (CT)	20	4.8
cell structure (CS)	17	4.1
protein synthesis (PS)	26	6.5
protein fate (PF)	10	2.4
reproductive proteins (RM)	3	0.7
unknown function (UF)	117	28.3
no significant homology (NSH)	36	8.7
total	413	100



รูปที่ 5 แผนภูมิรูปวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์ของจำนวนโคลนในแต่ละกลุ่มยีนตามหน้าที่

CDM (chromatin and DNA metabolism), CS (cell structure), DS (defense or stress), EM (energy metabolism), GERM (gene expression and RNA metabolism), CT (cellular transport), PM (primary metabolism), PF (protein fate), PS (protein synthesis), RS (putative rubber synthesis), RP (Reproductive proteins), SM (secondary metabolism), UF (unknown function) และ NSH (no significant homology)

2. **การวิเคราะห์ข้อมูลของการเรียงลำดับเบส ยีนเส้นเต็ม** (full length cDNA) **ที่ได้จาก** cDNA library

จากการเปรียบเทียบกับข้อมูลของ GenBank พบกลุ่มยีนต่างๆ ทั้งที่ยังไม่มีการรายงานและที่มีการรายงานแล้วแยกเป็นกลุ่มต่างๆ ตามหน้าที่ และแสดงยีนที่มีเส้นเต็ม (full length cDNA) ที่ได้จาก cDNA library ไว้ในตารางที่ 3

2.1 ยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างยาง พบทั้งหมด 48 โคลน จากการศึกษาลำดับเบสพบว่ามียีนที่สร้างโปรตีน Rubber elongation factor ถึง 37 โคลนแต่มีเพียงโคลน R-676 เท่านั้นที่เป็น full length cDNA มีขนาด 794 คู่เบส ซึ่งมีความเหมือนกับยีนที่มีการรายรายงานแล้วในยางพารา (*Hevea brasiliensis* : P15252) 100% และมีค่า E-value เท่ากับ $7e^{-71}$ และยังมียีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ในกระบวนการสร้างยาง คือ hydroxymethylglutaryl coenzyme A synthase และ cis-prenyltransferase 7 ที่มีการรายงานในยางพาราแล้ว

2.2 ยีนกลุ่มที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบป้องกันตัวเอง พบทั้งหมด 36 โคลน มียีน disease-resistent-related protein จำนวน 3 โคลน ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการตรวจจับเชื้อโรคเข้าสู่เซลล์ทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ เหมือนกับยีนในข้าว (*Oryza sativa*) และเป็นยีน protease inhibitor protein 1 พบทั้งหมด 4 โคลน จาก cDNA library ในจำนวนนี้มีโคลน R-541 ที่เป็น full length cDNA มีขนาด 416 คู่เบส มีความเหมือนกับ protease inhibitor protein 1 ที่มีการรายงานแล้วในยางพารา (*Hevea brasiliensis* :AAP46156) 78% และมีค่า E-value เท่ากับ $3e^{-25}$ และเป็นยีน ASR-like protein 1 จำนวน 3 โคลน ซึ่งมีรายงานแล้วในยางพารา (*Hevea brasiliensis*) เช่นกัน

2.3 กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ในระบบเมตาบอลิซึม ได้แก่ ระบบ primary metabolism, secondary metabolism และ energy metabolism พบยีนกลุ่มนี้ได้หลากหลาย เช่น กลุ่มยีน chorismate synthase จำนวน 2 โคลน ซึ่งเป็นเอนไซม์ขั้นสุดท้ายใน shikimate pathway เพื่อสร้างสาร chorismate นำไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิด aromatic ring ต่อไป และพบยีน S-adenosylmethionine decarboxylase จำนวน 3 โคลน เป็น key enzyme ในกระบวนการสร้างสารกลุ่ม Polyamine นอกจากนี้ยังพบกลุ่มที่สร้างพลังงาน เช่น ATP synthase subunit H protein หาลำดับเบสของโคลน R-105 โดยหาทางด้านปลาย 3′ โดยใช้ T7 primer ได้ลำดับเบสมีขนาด 736 คู่เบส เมื่อนำมาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีทั้งส่วน start codon และ stop codon และมีความเหมือนกับ ATP synthase subunit H ของ *Lycopersicon esculentum* (BAD95792) 85% โดยมีค่า E-value เท่ากับ $6e^{-30}$

2.4 กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบ cellular transport, cell structure โดยยีนกลุ่มที่ทำหน้าที่ขนส่งของเซลล์ พบ Thioredoxin h จำนวน 2 โคลน และ Glutaredoxin จำนวน 1 โคลน เมื่อหาลำดับเบสของโคลน R-194 โดยหาทางด้านปลาย 3′ โดยใช้ T7 primer ได้ลำดับเบสมีขนาด 525 คู่เบส เมื่อนำมาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีทั้งส่วน start codon และ stop codon และมีความเหมือนกับยีน Glutaredoxin ของ *Ricinus communis* (P55143) 81% และมีค่า E-value เท่ากับ $1e^{-44}$ โดยยีนทั้งสองทำหน้าที่ขนส่งอิเล็กตรอนโดยริดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนต่างๆ ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ (oxidized) เช่น NADPH

2.5 กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบ DNA and RNA metabolism รวมถึงกระบวนการ protein synthesis พบยีน zing finger จำนวน 4 โคลน รวมถึง Myb transcription factor จำนวน 2 โคลน ทำหน้าที่ในการจับกับสาย RNA ช่วยในกระบวนการ transcription สำหรับยีนกลุ่ม protein synthesis ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม ribosomal protein ต่างๆ และยีน cyclophilin จำนวน 1 โคลน จากการหาลำดับเบสของโคลน R-653 หาทางด้านปลาย 3′ โดยใช้ T7 primer ได้ลำดับเบสมีขนาด 855 คู่เบส เมื่อนำมาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีทั้งส่วน start codon และ stop codon และมีความเหมือนกับ cyclophilin ของ *Ricinus communis* (CAC80550) 95% โดยมีค่า E-value เท่ากับ $6e^{-85}$ เป็น protein ทำหน้าที่ ช่วยในการม้วนพับของโปรตีน

2.6 กลุ่มยีนที่ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่และไม่มีการรายงานมาก่อน เป็นกลุ่มยีนที่มีมากที่สุดใน cDNA library ถึง 37% และพบยีนที่เป็นเส้นเต็มคือ latex abundant protein 1 พบทั้งหมด 6 โคลนจาก cDNA library ในจำนวนนี้มีโคลน ที่เป็น full length cDNA มีขนาด 679 คู่เบส มีความเหมือนกับยีนที่มีการรายงานแล้วในยางพารา (*Hevea brasiliensis* : AAP46157) 91% โดยมีค่า E-value เท่ากับ $1e^{-50}$ โดยยังไม่มีการศึกษาหน้าที่

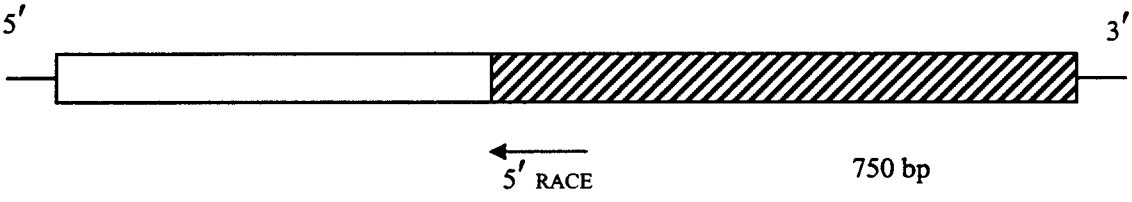
ตารางที่ 3 แสดงโคลนต่างๆที่เป็น Full length cDNA จากการทำ cDNA library

Clones	Size (bp)	Putative gene	Species	Acc No.	Score	% Homology	E-value
R-194	525	Glutaredoxin	*Ricinus communis*	P55143	177	(83/102) 81%	1.00E-44
R-541	416	protease inhibitor protein 1	*Hevea brasiliensis*	AAP46156	166	(55/70) 78%	3.00E-25
R-360	679	latex abundant protein 1	*Hevea brasiliensis*	AAP46157	202	(91/100) 91%	1.00E-50
R-105	736	ATP synthase subunit H protein	*Lycopersicon esculentum*	BAD95792	133	(60/70) 85%	6.00E-30
R-653	855	cyclophilin	*Ricinus communis*	CAC80550	317	(164/171) 95%	6.00E-85
R-676	794	Rubber elongation factor protein (REF)	*Hevea brasiliensis*	P15252	270	(138/138) 100%	7.00E-71

3. **การเตรียมยีนเส้นเต็ม** (full length cDNA) **ของยีน** Pectate lyase

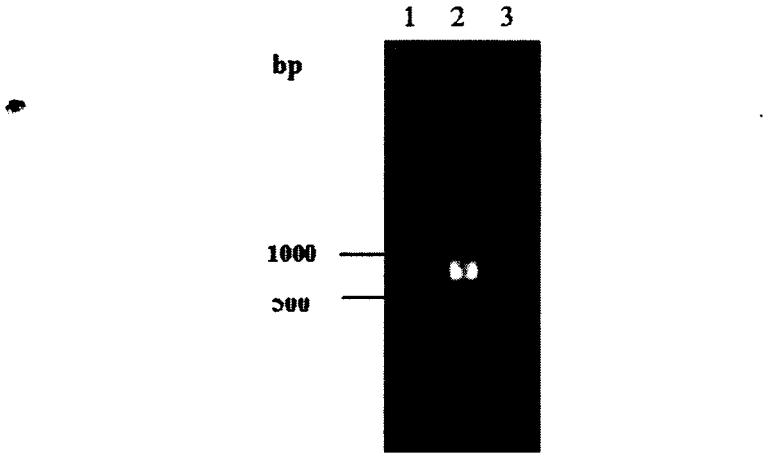
3.1 การหาลำดับเบสของยีน pectate lyase ทางด้านปลาย 5′ด้วยเทคนิค RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

จากการศึกษาการเรียงลำดับเบสใน EST library ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษารายละเอียดของยีน Pectate lyase ที่ได้ จากการหาการเรียงลำดับเบสทางด้านปลาย 3′ โดยใช้ T7 primer ของโคลน R308 ที่ได้จากการทำ cDNA library ได้ลำดับเบสที่มีความยาว 750 คู่เบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ GenBank พบว่ามีความเหมือนกับยีน pectate lyase ของพืช *Arabidopsis thaliana* (67% homology) โดยลำดับเบสของโคลน R308 มีความเหมือนเป็นส่วนทางด้านปลาย 3′ ของยีน มี stop codon และ polyA tail จึงออกแบบ primer เตรียมเป็น Full length cDNA โดยใช้เทคนิค 5′ RACE เพื่อหาลำดับเบสทางด้านปลาย 5′ ของยีน แสดงทิศทางการ RACE ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงทิศทางการเพิ่มจำนวนของยีน pectate lyase ด้วยเทคนิค 5′ RACE ส่วนที่แรเงาคือส่วนของยีน pectate lyase ที่ได้จากการทำ EST library

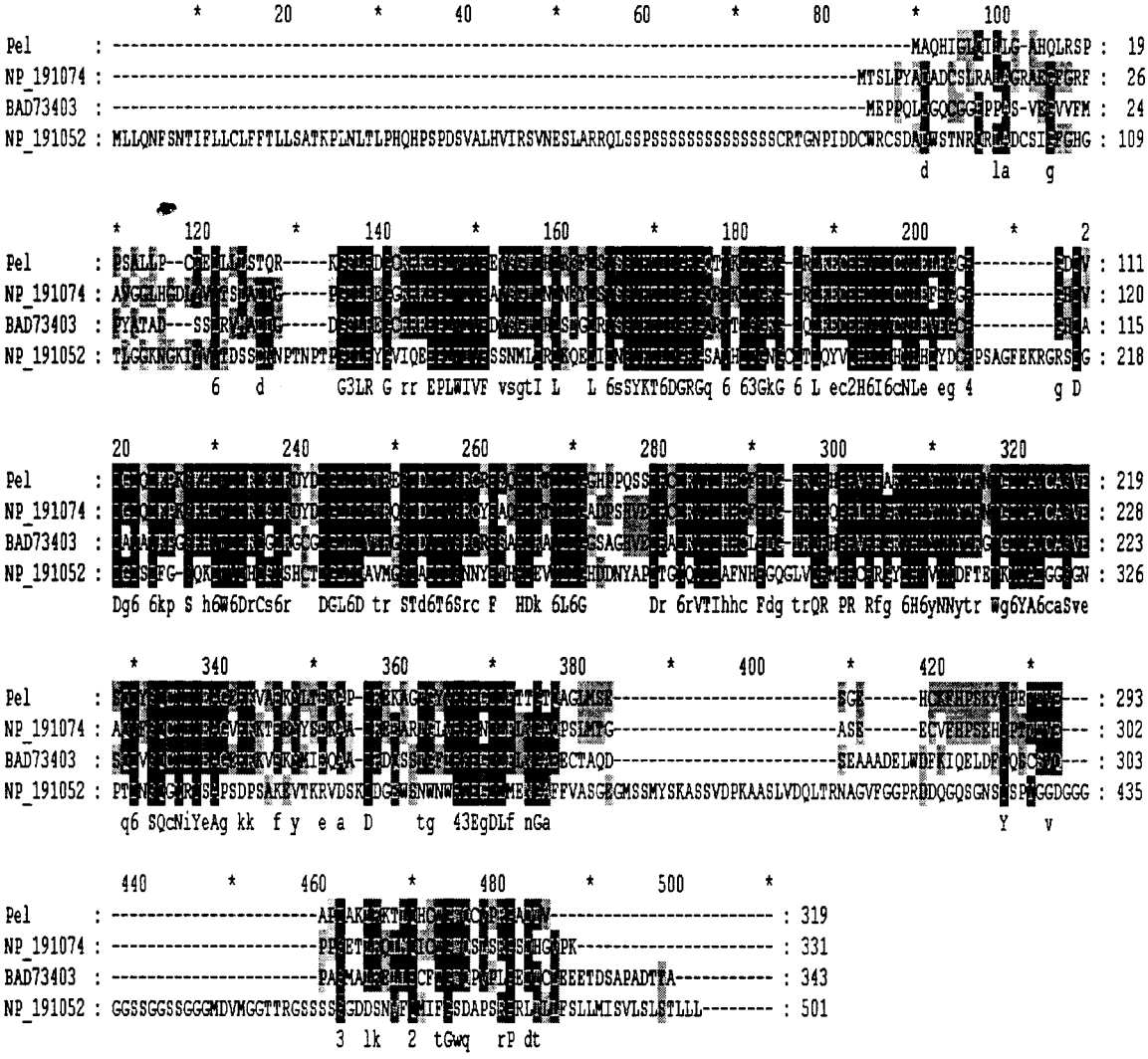
หลังจากทำการหาลำดับเบสของยีนที่ได้จากการทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่ออกแบบ หลังจากตรวจสอบการเพิ่มจำนวนด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ได้ชิ้นยีนขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน Pectate lyase จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR วิเคราะห์บน 1.2% agarose gel electrophoresis แถวที่ 1: 100 bp ladder แถวที่ 2 แถบดีเอ็นเอยีน Pectate lyase จากการทำ 1° PCR และแถวที่ 3 แถบดีเอ็นเอยีน pectate lyase จากการทำ 2^{0} PCR

หลังจากนั้นตรวจสอบลำดับเบสโดยทำการเชื่อมยีน pectate lyase ที่ได้จากการทำ 2^{0} PCR กับพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy ในแบคทีเรีย E. *coli* สายพันธุ์ Top10 F′ จากนั้นทำการคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมที่ชิ้นยีนอยู่ไปหาลำดับเบสที่ได้จากการทำ 5′ RACE พบว่าเมื่อนำลำดับเบสมาวิเคราะห์ ได้ลำดับเบสเพิ่มขึ้นทางด้านปลาย 5′ 537 คู่เบส ทำให้ได้ยีนเส้นเต็ม (Full length cDNA) ของยีน pectate lyase จากยางพารา (*Hevea brasiliensis*, Hb-Pel) ที่มีความยาว 1290 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 319 กรดอะมิโน นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของธนาคารยีนอีกครั้งพบว่ามีความเหมือนกับยีน pectate lyase ของ *Arabidopsis thaliana* (67% homology) *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (58% homology) และ PMR6

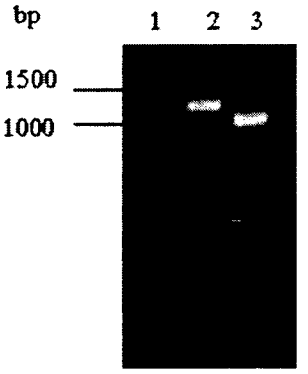
(POWDERY MILDEW RESISTANT 6); lyase/ pectate lyase จาก *Arabidopsis thaliana* (40% homology) แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน pectate lyase จากยางพารา (*Hevea brasiliensis*) กับ pectate lyase ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ full length cDNA ที่ได้จากการ RACE ของยีน pectate lyase จากยางพารา (*Hevea brasiliensis*) กับ pectate lyase ของ *Arabidopsis thaliana* (NP_191074), *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (BAD73403) และ PMR6 (Powdery Mildew Resistant 6; lyase/ pectate lyase) จาก *Arabidopsis thaliana* (NP_191052)

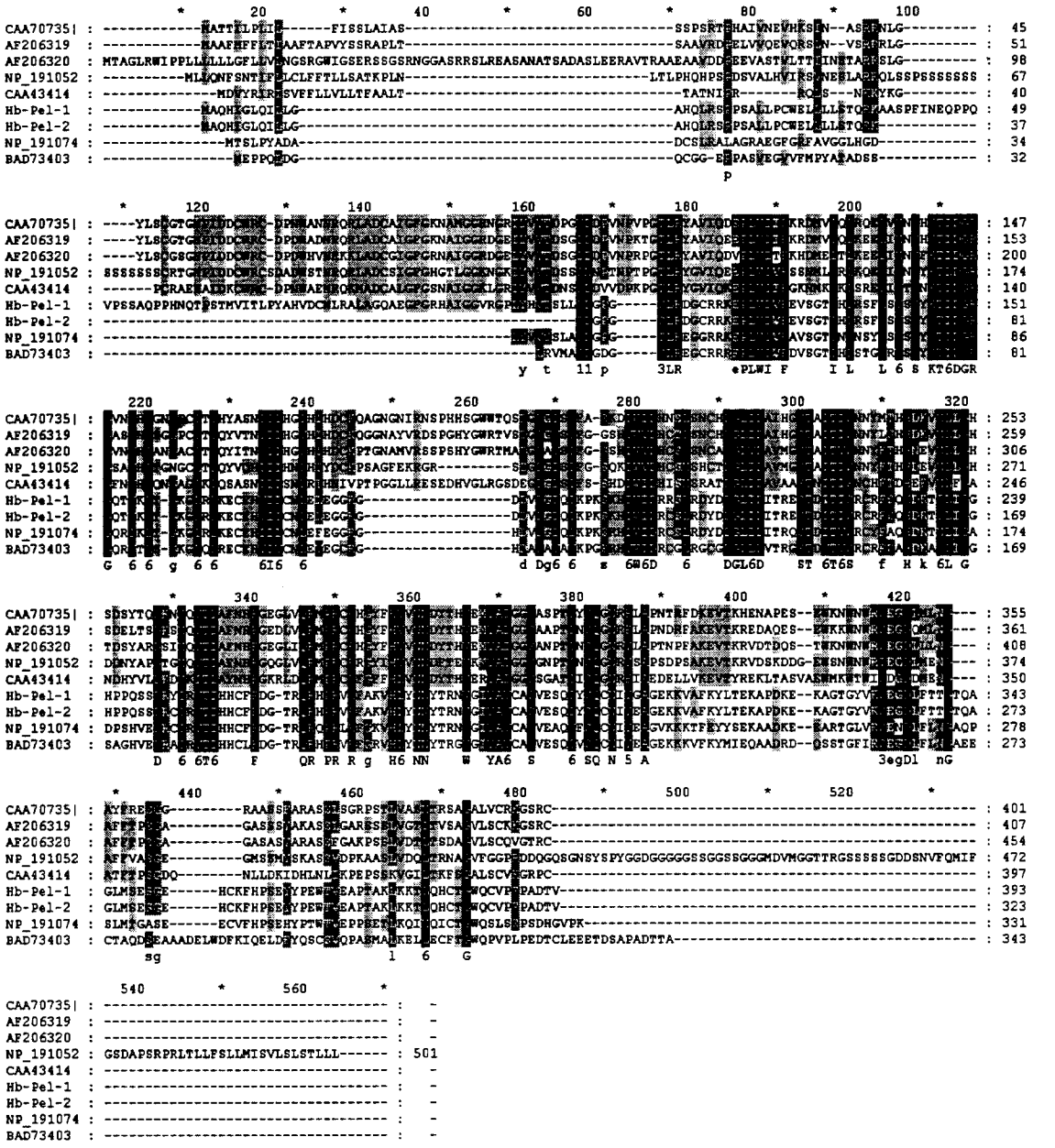
3.2 การเพิ่มจำนวนยีน Pectate lyase ที่เป็น full length cDNA ด้วยวิธี RT-PCR

จากการทำ RT-PCR เพื่อสังเคราะห์ ยีน Pectate lyase ที่เป็น full length cDNA จากน้ำยางพารา โดยใช้ primer PL-F และ PL-R2 หลังจากตรวจสอบการเพิ่มจำนวนด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ได้ชิ้นยีนที่มีขนาดแตกต่างกัน 2 ชิ้น คือ ประมาณ 1200-1300 คู่เบส (Hb-Pel-1) และขนาด 900-1000 คู่เบส (Hb-Pel-2) ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน Pectate lyase จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค RT-PCR วิเคราะห์บน 1.2% agarose gel electrophoresis แถวที่ 1: 100 bp ladder แถวที่ 2 แถบดีเอ็นเอยีน Pectate lyase (Hb-Pel-1) แถวที่ 3 แถบดีเอ็นเอยีน Pectate lyase (Hb-Pel-2)

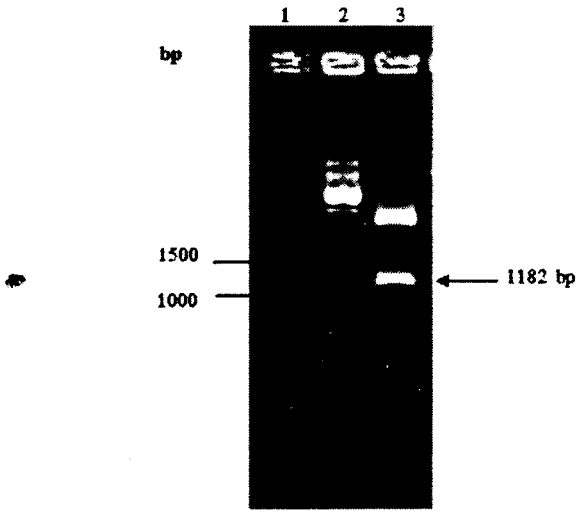
หลังจากนั้นตรวจสอบลำดับเบสโดยทำการเชื่อมยีน pectate lyase ที่ได้จากการทำ RT-PCR กับพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy ในแบคทีเรีย E. *coli* สายพันธุ์ Top10 F′ จากนั้นทำการคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมที่ชิ้นยีนอยู่ไปหาลำดับเบส เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในธนาคารยีนพบว่ามีความเหมือนกับยีน pectate lyase สิ่งมีชีวิตอื่นๆ ทั้งสองชิ้นยีน โดยชิ้นยีน Hb-Pel-1 โดยมีความเหมือนกับ pectate lyase จาก *Arabidopsis thaliana* pectate lyase จาก *Oryza sativa* และ PMR6 (Powdery Mildew Resistant 6); lyase/ pectate lyase จาก *Arabidopsis thaliana* 74%, 57% และ 38% ตามลำดับ ส่วน Hb-Pel-2 มีความเหมือนกับ pectate lyase จาก *Arabidopsis thaliana* pectate lyase จาก *Oryza sativa* และ PMR6 จาก *Arabidopsis thaliana* 74%, 63% และ 39% ตามลำดับ แสดงการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน pectate lyase จากยางพารา (*Hevea brasiliensis*) กับกรดอะมิโนของยีน pectate lyase ในสิ่งมีชีวิตอื่น ในรูปที่ 10 เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส ของยีน Hb-Pel-1 (GenBank accession No. EU009500) และ Hb-Pel-2 (GenBank accession No. EU009501) พบว่า Hb-Pel-1 มีขนาด 1353 คู่เบส ประกอบด้วย non-coding region ตั้งแต่ลำดับเบสที่1183-1353 โดยมี ส่วน coding region ตั้งแต่ลำดับเบสที่ 1-1182 ขนาด 1182 คู่เบส สามารถแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน 393 กรดอะมิโน ส่วน Hb-Pel-2 มีขนาด 1143 คู่เบส มี ส่วน coding region ตั้งแต่ลำดับเบสที่ 1-972 ขนาด 972 คู่เบส สามารถแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน 323 กรดอะมิโน ส่วนลำดับเบสที่ 109-318 ของ Hb-Pel-1 ไม่พบใน Hb-Pel-2



รูปที่ 10 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Hb-Pel-1 และHb-Pel-2 กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ *Zinnia elegans* (CAA70735), *Musa acuminate* (AF206319, AF206320), *Nicotiana tabacum* (CAA43414), PMR6 จาก *Arabidopsis thaliana* (NP_191052), *Arabidopsis thaliana* (NP_191074) และ *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (BAD73403)

4. การเตรียมดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel-1 และ pGEX-Hb-Pel-2 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

จากการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ยีน Hb-Pel-1 และ Hb-Pel-2 โดยใช้ primer PelF และ PelR ซึ่งมีตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น *Bam*HI และ *Eco*RI ทำการเชื่อมยีนทั้งสองเข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy ในแบคทีเรีย E. *coli* สายพันธุ์ Top10 F′ ย่อยยีนออกจากสู่พลาสมิดเวคเตอร์ pGEM®-T Easy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI และทำการเชื่อมยีนดังกล่าว เข้าสู่และพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย E. *coli* สายพันธุ์ Top10 F′ แสดงการตัดพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI ของโคลนที่มียีน Hb-Pel-1 ดังรูปที่ 11 พบโคลนที่มียีน Hb-Pel-1 จำนวน 2 โคลน เช่นเดียวกับยีน Hb-Pel-2 ดังรูปที่ 12 และตรวจสอบลำดับเบสของยีน Hb-Pel-1 และ Hb-Pel-2 บนพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top10 F′ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลกับธนาคารยีนพบว่ามีความเหมือนกับยีน pectate lyase ใน *Arabidopsis thaliana* ทำการย้ายดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel-1 และ pGEX-Hb-Pel-2 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อใช้เตรียมโปรตีน Pectate lyase ในขั้นต่อไป

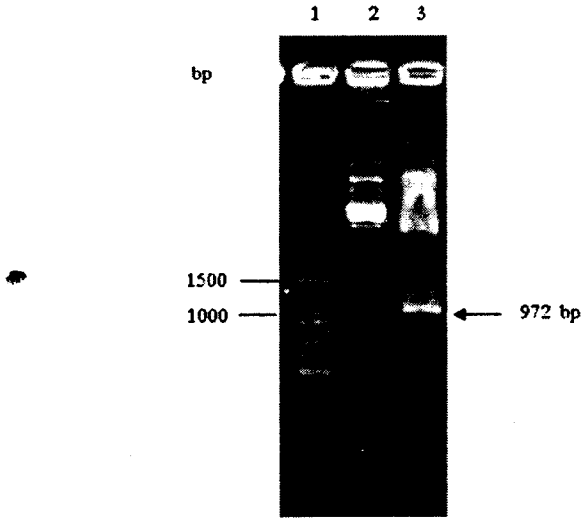


รูปที่ 11 แสดงแถบดีเอ็นเอของการตัดพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะของโคลนที่มียีน Hb-Pel-1 วิเคราะห์บน 1.2% agarose gel electrophoresis

แถวที่ 1 : 100 bp ladder

แถวที่ 2: แถบดีเอ็นเอของโคลน pGEX-Hb-Pel-1 ก่อนตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI

แถวที่ 3: แถบดีเอ็นเอของโคลน pGEX-Hb-Pel-1 หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI



รูปที่ 12 แสดงแถบดีเอ็นเอของการตัดพลาสมิดเวคเตอร์ pGEX-4T-1 ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะของโคลนที่มียีน Hb-Pel-2 วิเคราะห์บน 1.2% agarose gel electrophoresis

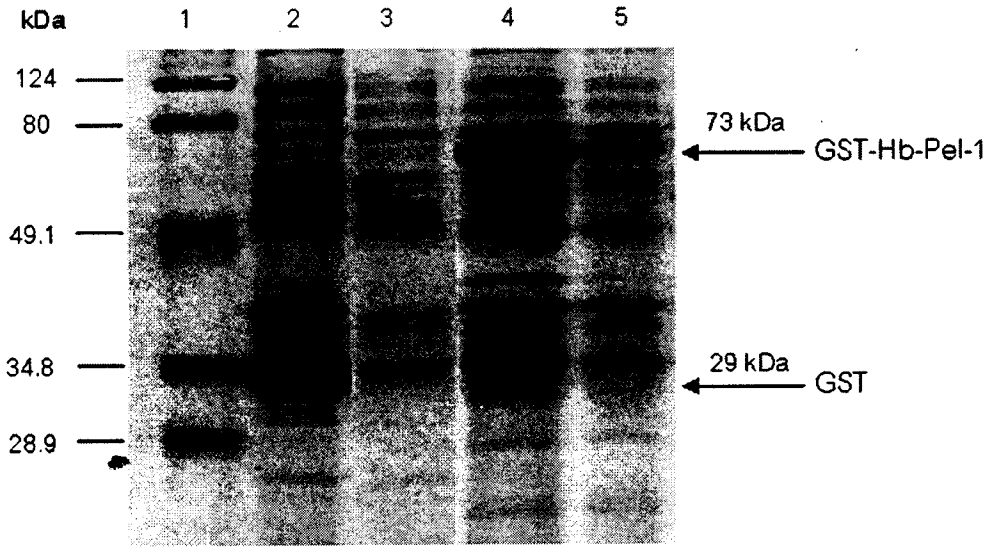
แถวที่ 1 : 100 bp ladder

แถวที่ 2: แถบดีเอ็นเอของโคลน pGEX-Hb-Pel-2 ก่อนตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI

แถวที่ 3: แถบดีเอ็นเอของโคลน pGEX-Hb-Pel-2 หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*RI

5. **การกระตุ้นการสร้างโปรตีน** GST, GST-Hb-Pel-1 **และ** GST-Hb-Pel-2

การกระตุ้นการสร้างโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 และ GST-Hb-Pel-2 จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel-1 และ pGEX-Hb-Pel-2 ตามลำดับ ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยใช้โปรตีน GST ที่สร้างจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pGEX ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าโปรตีน GST-Hb-Pel-1 ที่เตรียมได้จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel-1 เมื่อแยกบน 12% SDS-PAGE มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73 กิโลดาลตัน โดยเป็นน้ำหนักของโปรตีน GST ประมาณ 29 กิโลดาลตัน และเป็นน้ำหนักของโปรตีน Hb-Pel-1 44 กิโลดาลตัน แสดงดังรูปที่ 13 และ GST-Hb-Pel-2 ที่ได้จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel-2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65 กิโลดาลตัน โดยเป็นน้ำหนักของโปรตีน GST ประมาณ 29 กิโลดาลตัน และเป็นน้ำหนักของโปรตีน Hb-Pel-2 36 กิโลดาลตัน แสดงดังรูปที่ 14 นำโปรตีนที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ศึกษาคุณสมบัติต่อไป



รูปที่ 13 การวิเคราะห์การสร้างโปรตีน GST และ GST-Hb-Pel-1 ในส่วนที่ไม่ละลาย ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant Blue

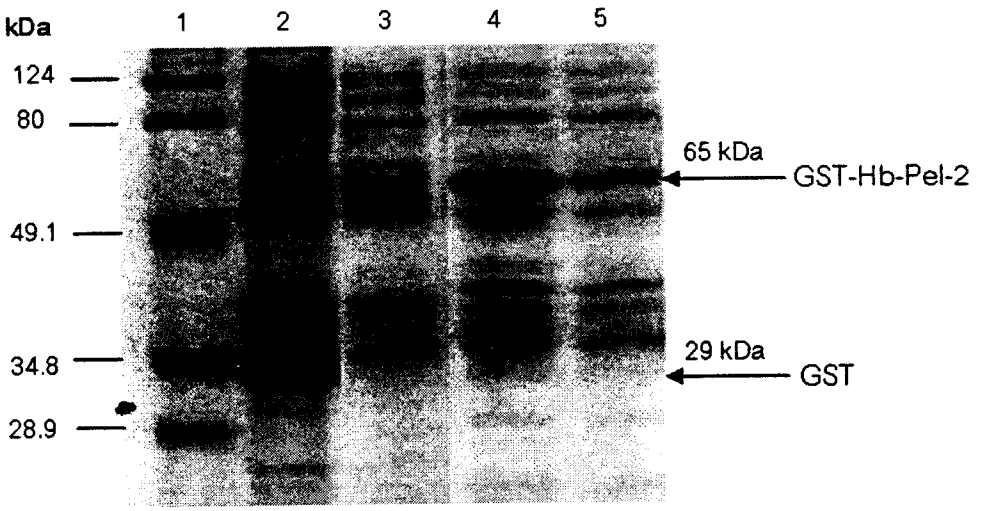
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายหลังการชักนำการสร้างโปรตีนโคลน pGEX

แถวที่ 3 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายก่อนการชักนำการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG โคลน pGEX

แถวที่ 4 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายหลังการชักนำการสร้างโปรตีนโคลน pGEX-Hb-Pel-1

แถวที่ 5 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายก่อนการชักนำการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG โคลน pGEX-Hb-Pel-1



รูปที่ 14 การวิเคราะห์การสร้างโปรตีน GST และ GST-Hb-Pel-2 ในส่วนที่ไม่ละลาย ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant Blue

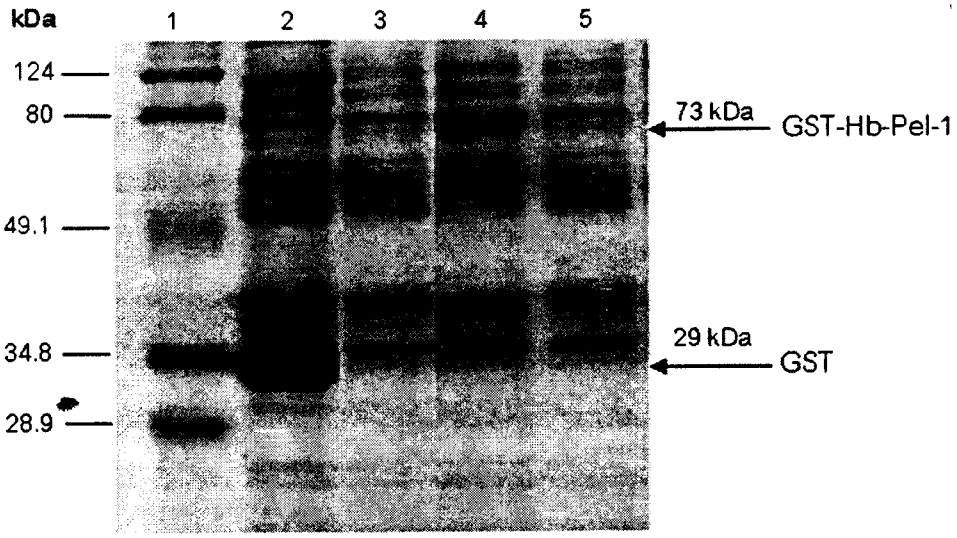
แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายหลังการชักนำการสร้างโปรตีนโคลน pGEX

แถวที่ 3 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายก่อนการชักนำการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG โคลน pGEX

แถวที่ 4 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายหลังการชักนำการสร้างโปรตีนโคลน pGEX-Hb-Pel-2

แถวที่ 5 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายก่อนการชักนำการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG โคลน pGEX-Hb-Pel-2



รูปที่ 15 การวิเคราะห์การสร้างโปรตีน GST และ GST-Hb-Pel-1 ในส่วนที่ละลาย ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลแบบมีเอสดีเอส (12% SDS-PAGE) ย้อมด้วยสี coomassie brilliant Blue

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายหลังการชักนำการสร้างโปรตีนโคลน pGEX

แถวที่ 3 โปรตีนในส่วนที่ไม่ละลายก่อนการชักนำการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG โคลน pGEX

แถวที่ 4 โปรตีนในส่วนที่ละลายหลังการชักนำการสร้างโปรตีนโคลน pGEX-Hb-Pel-1

แถวที่ 5 โปรตีนในส่วนที่ละลายก่อนการชักนำการสร้างโปรตีนด้วย 1 mM IPTG โคลน pGEX-Hb-Pel-1

6. การศึกษาสมบัติของโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 และ GST-Hb-Pel-2

6.1 การเตรียมและการสร้าง crude enzyme pectate lyase จากดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Hb-Pel-1 และ pGEX-Hb-Pel-2 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

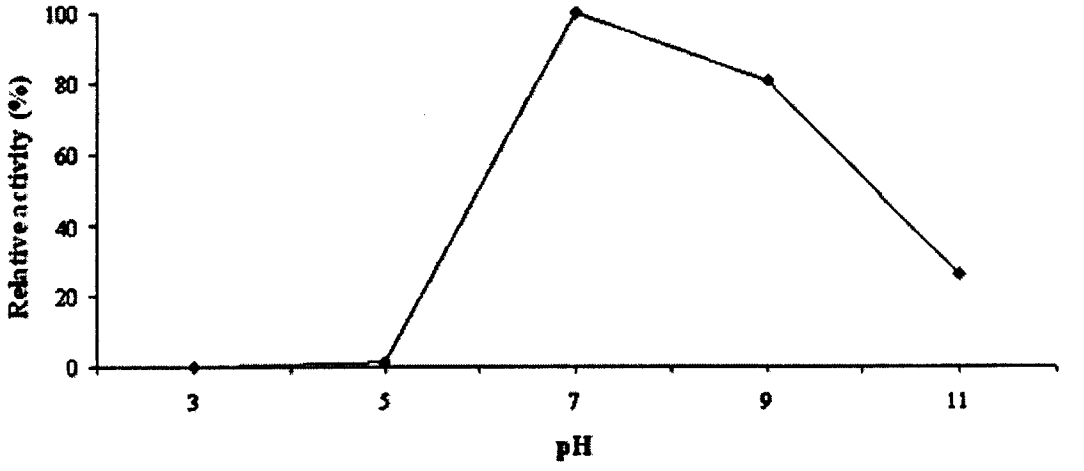
การเตรียมโปรตีนลูกผสมเพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ของโปรตีน GST-Hb-Pel-1 และ GST-Hb-Pel-2 โดยใช้โปรตีน GST เป็นชุดควบคุม ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การสร้างโปรตีน GST-Hb-Pel-1 และ GST-Hb-Pel-2 โดยการบ่มเลี้ยงเชื้อ ดีเอ็นเอลูกผสม pGEX-Pel-1 และ pGEX-Pel-2 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG นั้น เมื่อนำโปรตีนมาทดสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ พบว่า ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นทั้งโปรตีน GST-Hb-Pel-1 และ GST-Hb-Pel-2 ทั้งส่วนโปรตีนที่ละลาย (soluble protein) และส่วนตะกอนที่ไม่ละลาย (insoluble protein) แต่เมื่อบ่มเลี้ยงเชื้อ BL21 ในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นด้วย 1 mM IPTG เมื่อนำโปรตีนมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า เฉพาะโปรตีนที่ละลาย (soluble protein) แสดงดังรูปที่ 15 ของโปรตีน GST-Hb-Pel-1 เท่านั้นที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ มีค่า specific activity เท่ากับ 0.14 μmole/min/mg protein ในการทดลองครั้งนี้จึงคัดเลือกโปรตีน GST-Hb-Pel-1 มาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

6.2 การศึกษาพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

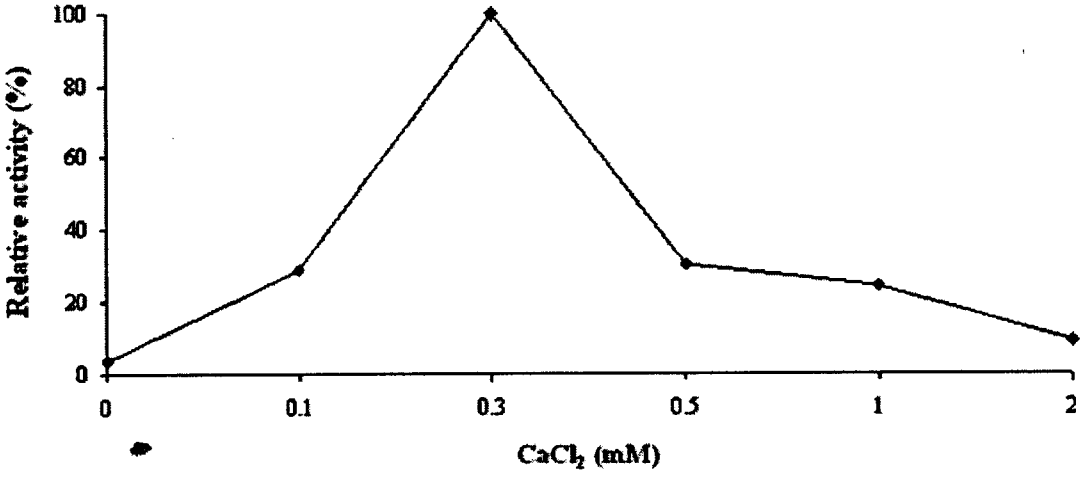
จากการเตรียมโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 และ GST แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งเมื่อนำมาศึกษาพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) ทำให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7 ใน phosphate buffer โดยกิจกรรมของเอนไซม์จะเริ่มเกิดขึ้นที่ค่าพีเอชมากกว่า 5 และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7 และจะค่อยๆ ลดลงเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่า %Relative activity ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16

6.3 การศึกษาความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อนำโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 มาศึกษาผลของความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.3 mM ช่วงของความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่ทำให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์สูงคือ ค่าระหว่าง 0.1-0.5 mM และจะลดลงเมื่อเพิ่มค่าความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ในปฏิกิริยา แต่เมื่อไม่มีการเติม $CaCl_2$ ลงในปฏิกิริยา พบว่า แทบไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นเลย แสดงดังรูปที่ 17



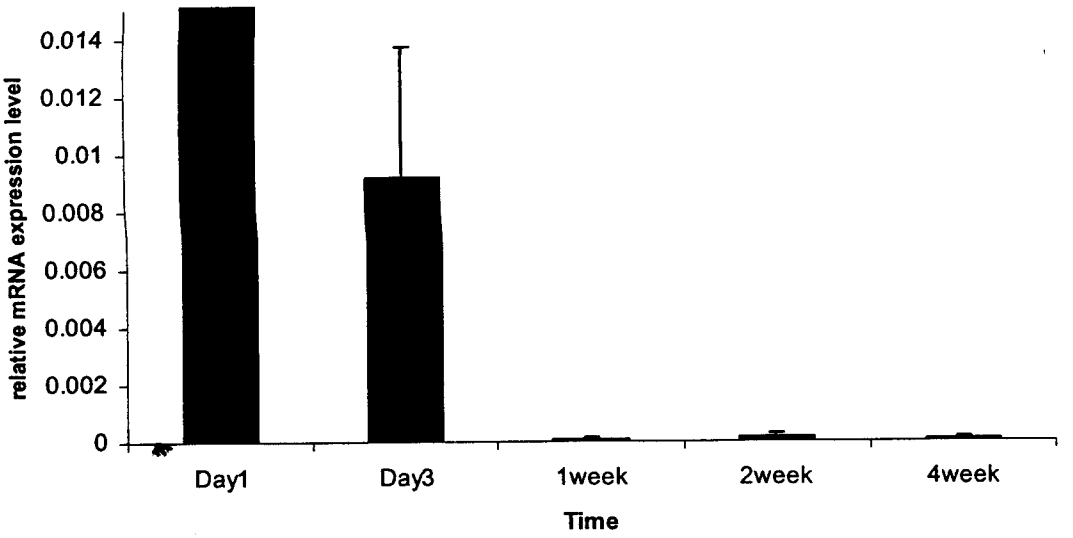
รูปที่ 16 แสดงค่า % Relative activity ของโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 เมื่อนำมาศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำการศึกษาค่าพีเอชช่วง 3-11



รูปที่ 17 แสดงค่า % Relative activity ของโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 เมื่อนำมาศึกษาผลของความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ใช้ความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ช่วง 0-2 mM

7. การศึกษาผลของระยะเวลาการกรีดยางพาราต่อการแสดงออกของยีน Pectate lyase **ด้วยเทคนิค** Real time PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน pectate lyase ในน้ำยางพาราของต้นยางพาราที่มีระยะของการกรีดที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลอง 5 กลุ่มตัวอย่าง คือ น้ำยางพาราที่กรีดวันที่ 1, 3 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ โดยทำการทำลอง 3 ซ้ำ เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน pectate lyase ด้วยเทคนิค real time PCR โดยรายงานผลเป็นค่า Relative mRNA expression level โดยเทียบกับยีน 18S ribosome เป็น internal control จากผลการทดลองพบว่า ยีน pectate lyase มีการแสดงออกสูงสุดในต้นยางพาราที่กรีดในวันที่ 1 มีการแสดงออกรองลงมา เมื่อกรีดในวันที่ 3 และการแสดงออกของยีนลดลงมาก ในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 4 แสดงดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 แสดงค่า relative mRNA expression level ของยีน pectate lyase ในน้ำยางพาราของต้นยางพาราที่มีระยะเวลาการกรีดแตกต่างกัน โดยทำการทดลองใน 5 กลุ่มทดลอง คือ น้ำยางพาราที่กรีดวันที่ 1, 3 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ โดยทำการทำลอง 3 ซ้ำ