รายงานการวิจัย

การโคลนยีนรับเบอร์ซินเทสจากต้นยางพารา

Molecular cloning of rubber synthase gene from *Hevea brasiliensis*(rubber tree)

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผศ. เกษม อัศวตรีรัตนกุล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

งบประมาณโครงการวิจัย ปีงบประมาณ 2544

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

ยางธรรมชาติ (*cis* 1,4- polyisoprene) เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สร้างมาจากต้นยางพารา(*Hevea brasiliensis*) กลไกการสังเคราะห์โมเลกุลยางในต้นยางพาราคาดว่าเกิดจากปฏิกิริยาการรวมตัวกันของ isopentenyl diphosphate(IPP) กับ allylic diphosphate โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ rubber synthase(หรือ rubber transferase) จนกระทั่งได้เป็น polyisoprene การวิจัยนี้มุ่งที่จะโคลนยีน rubber synthase เพื่อนำมาศึกษาโครงสร้างระดับโมเลกุลของยีนและการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ของยางในต้นยางพาราต่อไป

จากการใช้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับ conserved amino acid regions ของเอนไซม์ในกลุ่ม *cis*-prenyl chain elongation จาก *Micrococcus luteus* B-P 26, *Escherichia coli* , ยีสต์ และ *Arabidopsis thaliana* สามารถแยก cDNA fragment ที่จำเพาะต่อยีนในกลุ่ม *cis*-prenyl transferase จากน้ำยางพาราได้ 1 ชนิด(LT- cDNA) และจากใบยางพาราได้ 2 ชนิด (LE1 - cDNA และ LE2 - cDNA) โดย LT – cDNA มีขนาด 603 เบส ในขณะที่ LE1 – cDNA มีขนาด 596 เบสและ LE2 cDNA มีขนาด 622 เบส จากการใช้วิธีการของ 3' RACE และ 5' RACE สามารถแยก cDNA ที่สมบูรณ์ของ rubber synthase ซึ่งมีขนาด 1282 เบส ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 290 amino acids(ขนาดโมเลกุลประมาณ 33.2 kDa.) เมื่อวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนใน rubber synthase จะพบ conserved region ทั้ง 5 ตำแหน่งปรากฏเช่นเดียวกับเอนไซม์ในกลุ่ม *cis* - prenyltransferase จากสิ่งมีชีวิตอื่น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ rubber synthase อาจจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โมเลกุลยางในต้นยางพารา

Abstract

Natural rubber (*cis* 1,4-polyisoprene) from *Hevea brasiliensis* is the high molecular weight polymer of isoprene units with *cis* – configuration. The enzyme responsible for the *cis*- 1,4-polymerization of isoprene units has been identified as a particle-bound rubber synthase or rubber transferase, but no gene encoding this enzyme has been cloned in rubber- producing plants. Using sequence information of the conserved regions of *cis*-prenyl chain elongation enzymes cloned recently from *Micrococcus luteus* B-P 26 , *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*, we have isolated a specific cDNA fragment from *Hevea* latex (LT-cDNA) and 2 specific cDNA fragments from *Hevea* leaf(LE1 and LE2- cDNA). The LT-, LE1-, and LE2- cDNA compose of 603 bp, 596 bp and 622 bp, respectively. Using 3'-RACE and 5'-RACE strategies, we have isolated a full-length of rubber synthase cDNA which composes of 1282 bp including a ORF of 870 bp. The ORF of rubber synthase cDNA encodes for 290 amino acids with a predicted molecular mass of 33.2 kDa. All the five highly conserved regions among *cis* prenyl chain elongation enzymes are found in the protein sequences of rubber synthase. This result suggested that *Hevea* rubber synthase might be involved in the rubber biosynthesis.