รายงานการวิจัย

การแสดงออกของยีนและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ *cis*- prenyltransferase จากต้นยางพารา

cDNA expression and enzyme characterization of *cis*-prenyltransferase from *Hevea brasiliensis*(rubber tree)

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล

ผศ. เกษม อัศวตรีรัตนกุล

520
เลขหมู่ QK495.E9 N42 2542
Bib Key 235343
/ /

บทคัดย่อ

ยางธรรมชาติ (*cis* 1,4- polyisoprene) เป็นผลิตภัณฑ์พอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่โดยมีการสังเคราะห์ในน้ำยางจากต้นยางพารา(*Hevea brasiliensis*) มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ rubber transferase ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ polymerization ของ isopentenyl diphosphate ให้เป็นโมเลกุลยาง แต่ยังไม่มีรายงานการค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดนี้ในยางพารา การวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะโคลนยีน *cis*-prenyltransferase จากต้นยางพาราและเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีน เพื่อจะนำเอนไซม์มาศึกษาคุณสมบัติที่เชื่อมโยงกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ของโมเลกุลยางในต้นยางพารา

จากการใช้ฐานข้อมูลเกี่ยวกับ conserved amino acid ของเอนไซม์ในกลุ่ม *cis*-prenyltransferase ที่มีรายงานใน Genbank สามารถแยก cDNA ที่จำเพาะได้ 2 ชนิดคือ HCPT1 และ HCPT2 เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนทั้ง 2 ชนิด สามารถตรวจพบ conserved regions ทั้ง 5 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ในกลุ่ม *cis*-prenyltransferase การเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน HCPT1 และ HCPT2 ในเซลล์ *E.coli* พบว่าสามารถสังเคราะห์โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 33 kDa และตรวจพบ *cis*-prenyltransferase activity เฉพาะใน HCPT2 เมื่อทำการวิเคราะห์ rubber transferase activity ของ HCPT2 ในสภาวะที่มี washed bottom fraction particles พบว่า HCPT2 สามารถสังเคราะห์ polyprenyl ที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 2×10^3 ถึง 1×10^6 ดาลตัน ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี Northern blot analysis แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ HCPT1 และ HCPT2 เป็นจำนวนมากในน้ำยางพารา จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ยีน HCPT2 จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการชีวสังเคราะห์ของโมเลกุลยาง ซึ่งมีการสังเคราะห์ส่วนใหญ่ในน้ำยางพารา

Abstract

Natural rubber 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 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, we have isolated the cDNAs for *Hevea cis* -prenyltransferase (HCPT) from *Hevea brasiliensis.* Sequence analysis revealed that all the five highly conserved regions among *cis*-prenyl chain elongating enzymes were found in the protein sequences. The overexpression of HCPT in *E.coli* cell, gave the specific protein which corresponded to the molecular mass of 33 kDa. The *cis*-prenyltransferase activity was observed in HCPT2, but showed low enzyme activity in HCPT1. In vitro rubber transferase assay revealed that HCPT2 co-incubated with washed bottom fraction particles catalyzed the formation of medium chain as well as long chain polyprenyl products with approximate size around 2×10^3 and 1×10^6 Da. Northern blot analysis indicated the transcript of the HCPT in latex was the most abundant among the tissue examined, suggesting the possible function of this gene in latex in which the most of natural rubber produced.