ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249160

รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณลักษณะของโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ซึ่งแยกได้จากเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต

Characterization of protease inhibitor partially purified from *Hevea brasiliensis* cell suspension after copper sulfate treatment

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รศ.ดร. นันทา เชิงเชาว์

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553 – 2554

b00254308

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249160

รายงานการวิจัย

การศึกษาคุณลักษณะของโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ซึ่งแยกได้จากเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต

Characterization of protease inhibitor partially purified from *Hevea brasiliensis* cell suspension after copper sulfate treatment

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รศ.ดร. นันทา เชิงเชาว์

งบประมาณประจำปี พ.ศ. 2553 – 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาคุณลักษณะของโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ซึ่งแยกได้จากเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ถูกกระตุ้นด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต " ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผ่านคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2553 – 2554 จำนวนเงินทั้งสิ้น 840,000 บาท

ขอขอบคุณ รศ. ดร.สมปอง เตชะโต สำหรับคำแนะนำต่างๆที่ทำให้ได้เซลล์แขวนลอยยางพาราซึ่งมีลักษณะสมบูรณ์ และเหมาะสมกับงานวิจัยชิ้นนี้

บทคัดย่อ

249160

โปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ (protease inhibitor, PI) ในพืช เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดเล็ก พบมากในเนื้อเยื่อสะสม เช่น ส่วนของหัวใต้ดินและเมล็ด แต่อาจพบในส่วนอื่นๆของพืชได้ด้วย การเกิดบาดแผล การโจมตีด้วยแมลง หรือเชื้อก่อโรคต่างๆ (pathogens) กระตุ้นให้มีการสร้าง PI เพิ่มขึ้น ที่มีการศึกษากันอย่างมากจะเป็น PI กลุ่มซึ่งยับยั้ง serine protease PI ที่สกัดจากเซลล์แขวนลอยยางพารามีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ subtilisin แต่ไม่ยับยั้งเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin เมื่อใช้ azocasein เป็น substrate จากการปรับสภาพเซลล์แขวนลอยยางพาราใน Morpholine-ethanesulfonic acid (MES) buffer พบว่าระดับของโปรตีนรวม, เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และ PI มีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จึงสามารถใช้ MES เป็น buffer ในชุดควบคุมเมื่อต้องการทดสอบเซลล์แขวนลอยยางพาราด้วยอิลิซิเตอร์ต่างๆ พบว่าการกระตุ้นด้วย copper sulfate ($CuSO_4$) ความเข้มข้น 20 µM นาน 48 ชม.เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการสังเคราะห์ PI ในเซลล์แขวนลอยยางพารา หลังการกระตุ้นดังกล่าว ระดับแอคติวิตีของ PI จากส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์มีปริมาณสูงกว่าสารสกัดจากส่วนตะกอนเซลล์ ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับระดับของโปรตีนรวม แสดงว่า PI เป็นโปรตีนที่ผลิตเพื่อส่งออกไปทำงานนอกเซลล์ ดังนั้นในเบื้องต้น PI จากส่วนที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์จึงมีความเหมาะสมในการศึกษาการทำบริสุทธิ์เพราะมีโปรตีนปนเปื้อนน้อยกว่า เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวไปผ่านคอลัมน์แบบ anion exchange (DEAE-sepharose CL-6B) และชะด้วย 0.06 M NaCl ใน 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 แล้วทำบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี Native-preparative gel electrophoresis และ SDS-preparative gel electrophoresis ตามลำดับ จะปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อนำมาแยกด้วยวิธี Tricine-SDS-PAGE และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท PI บริสุทธิ์มีขนาดโมเลกุล 25 kDa และคิดเป็นปริมาณโปรตีน 3.14 x 10^{-3} mg/g เซลล์แขวนลอย จากการศึกษาคุณลักษณะของ PI บริสุทธิ์ พบว่าเสถียรทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นเบส (คงทนต่อ pH ในช่วง 2-10) และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 70°C ความเข้มข้นของ PI บริสุทธิ์ที่สามารถยับยั้ง subtilisin ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) คือ 11.13 nM และที่ 0.2 µM สามารถยับยั้งการงอกของซูโอสปอร์และการยืดยาวของ mycelium ของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในยางพาราได้

Abstract

249169

Plant protease inhibitors (PIs) are generally small proteins that have mainly been occurred in storage tissues such as tubers and seeds, and also in the aerial parts of plants. They are induced by plants in response to injury or attack by insects or pathogens. The most studied group of PIs in plants is the inhibitor of serine protease. The PI in *Hevea brasiliensis* cell suspension extract exhibited a strong inhibitory activity against subtilisin whereas trypsin and chymotrypsin were not inhibited by this PI when azocasein was used as substrate. Total protein, enzyme β-1,3-glucanase and PI levels were not significantly enhanced during shaking in Morpholine-ethanesulfonic acid (MES) buffer. Therefore, this buffer was appropriate for studying the effect of elicitors on *Hevea* cell suspension. The suitable concentration of $CuSO_4$ and incubation time for inducing PI in *Hevea* cell suspension was 20 μM and 48 h, respectively. After $CuSO_4$ treatment, higher PI activity was detected in the MES buffer than that found inside the cells, whereas most proteins were located oppositely. This result suggested that PI was produced to function extracellular. Thus the MES buffer containing high activity of PI but low level of other proteins, was selected for further purification. PI was purified by anion exchange chromatography on a DEAE-Sepharose CL-6B and eluted with 0.06 M NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.0. The active fractions were submitted to Native- and SDS- preparative gel electrophoresis, respectively. After electrophoresis and staining with silver nitrate, a single band of PI with molecular weight 25 kDa was revealed under Tricine-SDS–PAGE and the yield of purified protein was 3.14×10^{-3} mg/g cell suspension. This purified PI was still active in a broad pH range (2-10) and stable up to 70°C. The half maximal (50%) inhibitory concentration (IC_{50}) of the purified PI on subtilisin activity was determined to be 11.13 nM. In addition, the concentration of PI at 0.2 μM could inhibit the germination and mycelial growth of *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen.

สารบาญ

	หน้า
1. บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	10
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	12
วิธีดำเนินการวิจัย	13
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	17
2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	17
3. วิธีการทดลอง	21
4. ผลการทดลอง	34
5. สรุปและวิจารณ์	51
6. เอกสารอ้างอิง	55

สารบาญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. องค์ประกอบของอาหารสูตรชักนำคัลลัส MS ซึ่งดัดแปลงเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเมล็ดอ่อนยางพารา	22
2. องค์ประกอบของอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่ใช้ชักนำเซลล์แขวนลอย	24
3. องค์ประกอบของอาหารสูตร Henninger	26
4. ส่วนประกอบของเจลอิเลคโตรโฟริซีส แบบ Tricine-SDS-PAGE	30
5. ส่วนประกอบของเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ Native-preparative gel electrophoresis	31
6. ส่วนประกอบของเจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบ SDS-preparative gel electrophoresis	32
7. เปรียบเทียบลักษณะการงอกของซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากบ่มด้วย PI เป็นเวลา 2 ชม.	49

สารบาญรูป

รูปที่		หน้า
1.	ผลอ่อนยางพาราพันธุ์ BPM-24	21
2.	ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงคัลลัสจากเมล็ดอ่อนยางพารา	22
3.	คัลลัสที่ชักนำจากเมล็ดอ่อนยางพารา	22
4.	ขั้นตอนการเตรียมเซลล์แขวนลอย	25
5.	กราฟมาตรฐานของ Scp	27
6.	ปริมาณของ Scp หลังจากเซลล์แขวนลอยยางพารา ถูกกระตุ้นด้วย culture filtrate	35
7.	ปริมาณของโปรตีนรวมหลังจากเซลล์แขวนลอยยางพารา ถูกกระตุ้นด้วย culture filtrate	35
8.	ปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังจากเซลล์แขวนลอยยางพารา ถูกกระตุ้นด้วย culture filtrate เมื่อใช้ Scp เป็น substrate	36
9.	ปริมาณของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหลังจากเซลล์แขวนลอยยางพารา ถูกกระตุ้นด้วย culture filtrate เมื่อใช้ guaiacol เป็น substrate	36
10.	ปริมาณโปรตีนรวมภายในเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อย้ายเลี้ยงใน MES buffer	37
11.	ปริมาณเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสภายในเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อย้ายเลี้ยงใน MES buffer	38
12.	แอคติวิตีของ PI (ต่อ subtilisin) ภายในเซลล์แขวนลอยยางพารา และที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ เมื่อย้ายเลี้ยงใน MES buffer	38
13.	ปริมาณโปรตีนรวมจากส่วนของตะกอนเซลล์ และส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลา 48 ชม. เมื่อกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ ความเข้มข้นต่างๆ	39
14.	แอคติวิตีของ PI (ต่อ subtilisin) จากส่วนของตะกอนเซลล์ และส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์ ณ เวลา 48 ชม. เมื่อกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ ความเข้มข้นต่างๆ	40
15.	แอคติวิตีของ PI (ต่อ subtilisin) จากส่วนของตะกอนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ 20 µM ณ เวลาต่าง ๆ ระหว่างชุดทดสอบและชุดควบคุม	40

16. แอคติวิตีของ PI (ต่อ subtilisin) จากส่วนที่ถูกส่งออกมานอกเซลล์ซึ่ง ผ่านการกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ 20 µM ณ เวลาต่างๆ ระหว่างชุดทดสอบ และชุดควบคุม 41

17. แอคติวิตีของ PI จากเซลล์แขวนลอยยางพาราพันธุ์ BPM-24 ต่อเอนไซม์ protease ชนิดต่างๆ 41

18. แอคติวิตีของ PI จากส่วนของตะกอนเซลล์และส่วนที่ส่งออกมานอกเซลล์เมื่อกระตุ้นด้วย $CuSO_4$ 20 µM ที่เวลา 48 ชม. 42

19. ปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของ PI หลังผ่านคอลัมน์ DEAE-sepharose CL-6B 43

20. แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยวิธี Native-preparative gel electrophoresis 44

21. เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin จากตัวอย่างในแต่ละหลอดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แบบ Native-preparative gel electrophoresis 44

22. แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยวิธี SDS-preparative gel electrophoresis 45

23. เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin จากตัวอย่างในแต่ละหลอดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แบบ SDS-preparative gel electrophoresis 45

24. แบบแผนโปรตีนจากตัวอย่างแต่ละขั้นตอนการทำบริสุทธิ์หลังจากทำอิเลคโตรโฟริซิสแบบ Tricine-SDS-PAGE 46

25. เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin ของ PI บริสุทธิ์ ที่ pH 2-10 47

26. เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง subtilisin ของ PI บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 ^{o}C 47

27. การยับยั้ง subtilisin ด้วย PI (µg) ปริมาณต่างๆ 48

28. แสดงการงอกของซูโอสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* หลังจากทิ้งไว้ 2 ชม. เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า 50

29. แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. palmivora* เปรียบเทียบระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ (a) หลังจากเลี้ยงไว้บน PDA เป็นเวลา 5 วัน (b) หลังจากวางบนใบยางพาราเป็นเวลา 2 วัน 50

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ชม.	=	ชั่วโมง
ซม.	=	เซ็นติเมตร
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
µl	=	Microliter
^{o}C	=	Degree celsius
DEAE	=	Diethylaminoethyl
EDTA	=	Ethylenediamine tetra acetic acid
kDa	=	Kilodalton
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
µM	=	Micromolar
nM	=	Nanomolar
O.D.	=	Optical density
PDA	=	Potato dextrose agar
PDB	=	Potato dextrose broth
pH	=	-log hydrogen ion concentration
PI	=	Protease inhibitor
pmole	=	Picomole
Scp	=	Scopoletin
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
α	=	Alpha
β	=	Beta
λ	=	Lamda
%	=	Percent