รหัสโครงการ: MRG5080360

ชื่อโครงการ: การโคลนและการศึกษาการทำงานของตัวยับยั้งเอนไซม์ซีสเตอีนโปรตีเนสจากน้ำยางพารา

ชื่อนักวิจัย: นายภูวดล บางรักษ์
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช รหัสไปรษณีย์ 80160

E-mail address: bphuwado@wu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (2 กรกฎาคม 2550- 1 กรกฎาคม 2552)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตัวยับยั้งเอนไซม์ซีสเตอีนโปรตีเนส (cysteine proteinase inhibitor) หรือ phytocystatin จาก cDNA library ของน้ำยางพาราพันธุ์ RRIM 600 แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปออกแบบไพรเมอร์เพื่อขยายชิ้นยีนให้สมบูรณ์ด้วยวิธี rapid amplification of cDNA ends (RACE) พบยีนตัวยับยั้งเอนไซม์ซีสเตอีนโปรตีเนส (*HbCPI*) ขนาด 588 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนของ open reading frame (ORF) ขนาด 306 คู่เบส ซึ่งสามารถแปลรหัสได้ 101 อะมิโน โดยมี inhibitory motifs ของ phytocystatin superfamily คือ central signature motif QXVXG, GG doublet และ LARFAV-like motif ตรงบริเวณปลายอะมิโนและ A/PW ตรงบริเวณปลายคาร์บอกซิล เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในธนาคารยีน (GenBank) พบว่ามีความเหมือนกับตัวยับยั้งเอนไซม์ซีสเตอีนโปรตีเนสของละหุ่ง (*Ricinus communis*) และมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) มากที่สุดถึงร้อยละ 83 และ 84 ตามลำดับ หลังจากทำการสร้างโปรตีนลูกผสมใน *Escherichia coli* M15 โดยการโคลน *HbCP* เข้ากับ pQE40 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอพาหะที่เชื่อมต่อกับ 6 x histidine tag และทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย Ni-NTA agarose ปรากฏว่าได้โปรตีนลูกผสม HbCPI ขนาดประมาณ 14 kDa ซึ่งมีสมบัติทนความร้อนสูงและสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ papain แบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) โดยมีค่า K_i เท่ากับ 1.54 x 10^{-8} M จากการศึกษาแสดงออกของ *HbCPI* โดยวิธี RT-PCR พบการแสดงออกของยีนทั้งในใบ เมล็ดอ่อน และน้ำยาง นอกจากนี้ยังพบว่าบาดแผลและเชื้อราก่อโรคยางพารา *Phytophthora palmivora* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า *HbCPI* มีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนของยางพาราในการตอบสนองต่อการเกิดบาดแผลและการติดเชื้อโรค

Project Code: MRG5080360

Project Title: Molecular cloning and biochemical characterization of cysteine proteinase inhibitor from *Hevea* rubber latex

Investigator: Mr. Phuwadol Bangrak
School of Sciences, Walailak University, Thasala, Nakhon Sri Thammarat, Thailand, 80160

E-mail address: bphuwado@wu.ac.th

Project Period: 2 years (2 July 2007- 1 July 2009)

A novel cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor or phytocystatin was isolated from *Hevea brasiliensis* RRIM 600 rubber latex cDNA library. The full-length *HbCPI* obtained from rapid amplification of cDNA ends (RACE) contains 588 bp. An open reading frame (ORF) of 306 bp encodes for a protein of 101 amino acids with the typical inhibitory motifs of phytocystatin superfamily, namely the central signature motif QXVXG, a GG doublet and LARFAV-like motifs in the N-terminal part, and conserved A/PW residues in the C-terminal region. Sequence comparison showed that the deduced amino acid sequence was similar to that of cysteine protease inhibitors from the *Ricinus communis* (83% identity) and *Manihot esculenta* (84% identity). The *HbCPI* was subcloned into expression vector pQE40 and then overexpressed in *Escherichia coli* M15 strain (pREP4) as a His-tagged recombinant protein with molecular mass approximately 14 kDa. The purified HbCPI shows thermal stable property and efficiently inhibits the protease activity of papain by non-competitive inhibition with K_i value of 1.54×10^{-8} M. Besides latex, *HbCPI* also transcripts in leaf and young seed. The *HbCPI* message accumulation is induced by wounding and phytopathogenic fungi *Phytophthora palmivora* infection. These data suggest that HbCPI might play the crucial roles in defense mechanism against abiotic stress and biotic stimuli.