

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

Vacuolar H^+ -transporting Adenosine Triphosphatase (V-ATPase; EC 3.6.1.34) ราตาจซัค (Ratajczak. 2000 : 17) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการขนส่งสารแบบ Active Transport พบได้ในเมมเบรนของเซลล์ เช่น Clathrin Coated Vesicle, Chromaffin Granule, Endosome, Lysosome, Synaptic Vesicle, Golgi Derived Vesicle และ Tonoplast เป็นต้น เอนไซม์ V-ATPase ประกอบด้วยสองส่วนหลักๆ ที่ทำงานร่วมกัน คือ ส่วนของ V1 และ V0 ส่วนของ V1 อยู่บริเวณผิวของเมมเบรนมีคุณสมบัติเป็น hydrophilic ประกอบด้วยหน่วยย่อยต่างๆ 8 หน่วย คือ หน่วยย่อย A, B, C, D, E, F, G และ H ทำหน้าที่เป็น Catalytic ส่วนของ V0 ฝังตัวอยู่ในเมมเบรนมีคุณสมบัติเป็น Hydrophobic ประกอบด้วยหน่วยย่อย 5 หน่วย คือ หน่วยย่อย a, c, c', c'' และ d ทำหน้าที่เป็น Proton Translocation วิลเคนส์, ชางและเซิ่ง (Wilkins, Zhang and Zheng. 2005 : 109) จากการศึกษาของแพนเดย์, ชางและอัสส์แมน (Pandey, Zhang and Assman. 2007 : 2325-2336) ใน *Vicia faba* พบว่า V-ATPase เกี่ยวข้องกับการขับเคลื่อนโปรตอนภายในเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์คุม (Guard Cell) ที่ควบคุมการเปิดและปิดของปากใบ ซึ่งมีการตรึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง กลไกดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการขับเคลื่อนโปรตอนเข้าสู่แวคิวโอล (Vacuole) ของเซลล์คุม ผ่าน Tonoplast โดยอาศัยตัวขับเคลื่อน (Pump) ซึ่งใช้พลังงานจากกระบวนการสลาย ATP (ATP Hydrolysis) เมื่อแวคิวโอลมีการสะสมโปรตอนสูงขึ้นจะเกิดแรงขับเคลื่อนโปรตอน (Proton Motive Force) เพื่อช่วยในการขนส่งประจุและสารตัวกลางต่างๆ ผ่านช่องโปรตีน ที่อยู่บนโทโนพลาสต์เข้าสู่แวคิวโอล ส่งผลให้ศักย์ของน้ำภายในเซลล์คุมลดต่ำกว่าเซลล์ข้างเคียง น้ำจึงออสโมซิสเข้าสู่เซลล์คุม เมื่อเซลล์คุมเต่งปากใบจึงเปิดออกแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จึงแพร่เข้าไปในใบ กอลด์แดคค์และดิทซ์ (Golldack and Dietz. 2001 : 1643-1654) ศึกษาใน *Mesembryanthemum crysallinum* ซึ่งเป็นพืชทนเค็ม พบว่า มีการแสดงออกของยีน V-ATPase ในใบเพิ่มขึ้นเมื่อชักนำโดยความเค็ม เซา, ชาง, แทง, ลัน, ลีและเลา (Zhou, Zhang, Tang, Lan, Li and Luo. 2011 : 375-380) ถ่ายโอนยีน *AtNHX1* (Vacuolar Na^+/H^+ Antiporter Gene) ของ *Arabidopsis thaliana* ให้กับยาสูบพบว่า ยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *AtNHX1* มีความต้านทานต่อ

ความเค็มได้ดีกว่าสาหร่ายที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน บินเซล (Binzel. 1995 : 722-728) พบว่าในมะเขือเทศมีการแสดงออกของยีน V-ATPase Subunit A เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยความเค็ม

เปลื้อง สุวรรณมณี, สมศักดิ์ โชคนุกูล, นवलพรรณ ศิริบุพผะ, ธนพันธ์ ปัทมานนท์, จารุวัตร จันทร์ประดิษฐ์, ภัทราวุธ จิวตระกูลและวันเพ็ญ นันทานุวัฒน์ (2552 : 92) ได้วิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนในใบยางพารากลุ่มสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและต่ำด้วยเทคนิค cDNA-AFLP สามารถคัดเลือก Transcription Derived Fragments (TDFs) ที่มีการแสดงออกมากในกลุ่มสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง จำนวน 22 TDF โดย TDFLEP083 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ Homology กับ Vacuolar ATP Synthase Subunit G Plant ของ *Ricinus communis* (Accession no. GAHK01014188.1, E value = $1e-25$)

ดังนั้นในการวิจัยนี้จะสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพาราเพื่อใช้ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาโปรตีน V-ATPase G Subunit ในยางพารา เพื่อเป็นแนวทางในพัฒนายีน *V-ATPase* ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงทนทานต่อความเค็มและความแห้งแล้งต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* จากยางพารา
2. เพื่อสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพาราในแบคทีเรีย *E.coli* BL21 StarTM (DE3) One Shot[®]
3. เพื่อเตรียมแอนติบอดีรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพารา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน V-ATPase G Subunit ในยางพารา สำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงและคัดเลือกลายพาราสายพันธุ์ที่ทนแล้งและทนเค็มต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

เพิ่มปริมาณ cDNA ยีน *V-ATPase G Subunit* ของยางพาราด้วยเทคนิค PCR เชื่อมต่อ cDNA ของ *V-ATPase G Subunit* เข้ากับ pET-Vector (+) Expression Vector โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA Ligase จากนั้นถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* DH5α TOP10 แล้ว Subclone เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* BL21 StarTM(DE3) One Short[®] เหนียวนาให้เซลล์สังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพาราและแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี SDS-PAGE แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอและสะโพกของกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White อายุประมาณ 3 เดือน ทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit และโปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพาราโดยวิธี Western Blot

สถานที่และระยะเวลาการทําวิจัย

สถานที่ทําวิจัย : ห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา (SC 327) สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตสงขลา และสถาบันสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ระยะเวลาการทําวิจัย : ตั้งแต่เดือนมกราคม 2556 – เดือนมกราคม 2558