

นภาพร ธรรมชูเชาวรัตน์ 2554: การศึกษาเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์จากข้าว (*Oryza sativa* L.)
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี) สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
อาจารย์ราตรี วงศ์ปัญญา, Ph.D. 116 หน้า

Betaine Aldehyde Dehydrogenase 2 (BADH2) เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอมหลักชนิดหนึ่งในข้าว นั่นคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) โดยพบยีน BADH2 อยู่ในบริเวณที่เกี่ยวข้องกับความหอม (*gr* gene) บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ยีนดังกล่าวพบได้ทั้งในข้าวหอม และข้าวไม่หอมโดยในข้าวหอมพบว่าเกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 8 นิวคลีโอไทด์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 3 ตำแหน่งในเอกซอนที่ 7 ทำให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของยีนไป ส่งผลให้ข้าวนี้มีการผลิตสารหอม 2AP ขึ้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ในข้าว โดยทำการกลายพันธุ์ด้วยวิธี Site Directed Mutagenesis โดยการเพิ่มกรดอะมิโนไทโรซีนในตำแหน่ง 420 (Y420 insertion) และทำการกลายพันธุ์แบบแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานีนที่ตำแหน่ง 162 260 และ 294 (N162A E260A และ C294A) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทดลองทำการกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยการส่องได้แสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 10 30 วินาที และ 1 นาที จากการทดลองพบว่าเมื่อนำยีนกลายพันธุ์ที่อยู่ในดีเอ็นเอพาหะ pET28b เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* จากนั้นทำการผลิตโปรตีน และทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ Ni-NTA พบว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์จึงนำไปศึกษาประสิทธิภาพการจับกันอย่างจำเพาะระหว่าง BADH2 กลายพันธุ์กับ โคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH เปรียบเทียบกับเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ BADH2 ดั้งเดิม พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 N162A และ E260A ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการจับกับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และ NADH แต่ทำให้การจับกับเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง C294A มีประสิทธิภาพลดลง เมื่อจับกับโคแฟกซ์เตอร์ NAD^+ และมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เมื่อจับกับ NADH เมื่อเทียบกับ BADH2 ดั้งเดิม การศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ต่อสับสเตรท aminobutyraldehyde (AB-ald) และ Betaine aldehyde (Bet-ald) (K_m , k_{cat} และ k_{cat}/K_m) พบว่าเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิมทำปฏิกิริยากับสับสเตรททั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าเอนไซม์ BADH2 กลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบ ซึ่งผลการทำปฏิกิริยานำมาทดสอบหา γ -aminobutyric acid (GABA) ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) พบสาร GABA ในผลผลิตจากกิจกรรมของเอนไซม์ BADH2 ดั้งเดิม เมื่อใช้ AB-ald เป็นสับสเตรท รวมถึง BADH2 กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Y420 และ N162A แต่ในปฏิกิริยาที่ใช้ Bet-ald ไม่พบสาร GABA ในเอนไซม์ทุกชนิด และจากผลการทำกลายพันธุ์แบบสุ่มด้วยการส่องได้แสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 10 30 วินาที และ 1 นาที พบว่า ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีดังกล่าวได้