

การโคลนและการศึกษาคุณลักษณะของยีนไคตินเอสจากข้าวไทย (*Oryza sativa* L.)

Cloning and Characterization of Chitinase Gene from Thai Rice (*Oryza sativa* L.)

ไยฟ้า หาญมนตรี (Yaifa Hanmontri)* สุมณฑิพย์ บุนนาค (Sumontip Bunnag)**

อนวัช สุวรรณกุล (Anawat Suwanagul)***

บทคัดย่อ

ไคตินเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งสามารถย่อยสลายไคตินให้เป็น *N*-acetylglucosamine อิสระ เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ มีบทบาทในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด และแมลงศัตรูพืชที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบหลัก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อโคลนและศึกษาคุณลักษณะของยีนไคตินเอส จากข้าวไทย พันธุ์ กข6 โดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และ 5' – 3' Rapid Amplification cDNA Ends (5'-3' RACE) และหาลำดับเบสบางส่วน พบว่าลำดับเบสที่ได้จากการโคลนบริเวณกลางยีนถึงปลายด้าน 3' มีความยาว 624 คู่เบส กำหนดการสร้างกรดอะมิโน 207 เรซิดิว มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 20.54 กิโลดาลตัน โดยมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนระหว่าง ข้าว พันธุ์ กข6 กับ *Oryza sativa* Japonica group (accession number U02286.1) และ *O. sativa* Indica group (accession number L37289.1) เท่ากับ 97 และ 89% ตามลำดับ

ABSTRACT

Chitinase is a hydrolase enzyme that can hydrolyse chitin to *N*-acetylglucosamine. Chitinase is found among organisms that contain chitin. The objective of this research was to clone and characterize chitinase gene from Thai rice (*Oryza sativa* cv. RD6). Chitinase gene from Thai rice cv. RD6 was cloned by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and 5'-3' Rapid Amplification cDNA Ends (5'-3' RACE) techniques and partially sequenced. The sequence of chitinase cDNA from middle of the gene to 3' end was 624 base pairs, encoding 207 amino acid residues with calculated molecular weight of 20.54 kilodaltons. Chitinase amino acids sequence were highly conserved between rice in Indica and Japonica group. The sequence similarity between rice cv. RD6 and that from Indica group (accession number L37289.1) was found to be 89%, while for that of *O. sativa* Japonica group (accession number U02286.1) was 97 %.

คำสำคัญ : ยีนไคตินเอส การโคลน ข้าวไทย พันธุ์ กข6

Key Words : Chitinase gene, cloning, Thai rice cv. RD6

*มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

***นักวิชาการ 9 ฝ่ายเทคโนโลยีทางการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

บทนำ

ไคตินเอส เป็นเอนไซม์กลุ่ม hydrolase ซึ่งจะย่อยสลายไคตินให้ได้เป็น *N*-acetylglucosamine อิสระ มีชื่อทางเคมีว่า poly- β -1,4-(2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolase: E.C.2.2.1.1.4 ซึ่งจะตัดสายยาวของ *N*-acetylglucosamine ตรงตำแหน่ง β ภายในสายยาว โดยตัดแบบสลับ ซึ่งจะได้อะไรสั้น ๆ ของ *N*-acetylglucosamine เอนไซม์ไคตินเอสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ ตัวอย่างได้แก่แมลง ปู กุ้ง และสัตว์ทะเลที่มีเปลือก สหราชอาณาจักร แต่ก็มีพบว่ามีสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด ซึ่งไม่มีไคตินเป็นส่วนประกอบ แต่สามารถสร้าง ไคตินเอสได้ เช่น พืช เชื้อรา แอคติโนมัยซิส และแบคทีเรียบางชนิดที่ใช้ไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ

ในพืชที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงดีไคตินเอสที่อยู่ในแวคิวโอล และ อะพพลาสต์ จะมีการผลิตออกมาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งผลผลิตของไคตินเอสจะถูกควบคุมโดยปัจจัยทางความเครียดหลายอย่าง ทั้งปัจจัยทางชีวภาพ ทางกายภาพ รวมถึง การติดเชื้อ การเกิดบาดแผล ความแห้ง ความเย็น การได้รับโอโซน โลหะหนัก ความเค็ม หรือการได้รับฮอร์โมนพืช เช่น เอธิลีน จัสโมนิคแอซิด ซาลิซิลิกแอซิด ออกซิน และไซโตไคนิน ก็ชักนำให้มีการแสดงออกของไคตินเอสได้ (Kasprzewska, 2003)

พบว่าการสร้างไคตินเอสในพืชหลายชนิด ทั้งใบ เลี้ยงคู่และใบเลี้ยง เดี่ยว เช่น ถั่ว ยาสูบ แตงกวา แครอท ข้าวและมะละกอ ไคตินเอสที่พบในพืชเกิดจากการที่พืชถูกกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก เช่น เอธิลีน จูลินทรีย์ ข้าวเป็นพืชอีกชนิดที่พบว่ามี ไคตินเอส class I ไคตินเอสกลุ่มนี้จะอยู่ใน แวกิวโอล (Brogie and Broglie, 1994) จึงทำให้ ข้าวไม่แสดงความต้านทานต่อโรคถึงแม้ว่าจะพบไคตินเอสในข้าวก็ตาม

Baek et al. (2001) ได้ทำการแยกเอนไซม์ไคตินเอสจาก เมล็ดข้าวที่ผ่านการขัดสี, ไร่ข้าว และเปลือกข้าว ซึ่งได้แยกเอนไซม์ไคตินเอสออกเป็นส่วนที่เป็นกรด และ

ส่วนที่เป็นเบส โดยใช้คุณสมบัติความเป็นกรด-ด่าง เอนไซม์ทั้งสองส่วน ที่สกัดแต่ละส่วนของเมล็ดข้าวได้แสดงคุณลักษณะบน SDS-PAGE ซึ่งมี ไกลคอล ไคติน (glycol chitin) 0.01% เอนไซม์ไคตินเอสที่ได้จากการศึกษานี้เป็น เอนโดไคตินเอส (endochitinase) ของ β -1,3-glucanase, lysozyme และ chitosanase

Aziz (2002) ศึกษาบทบาทของเอนไซม์ไคตินเอสในแบคทีเรีย *Serratia marcescens* ที่มีผลต่อการผลิตสาร Zearalenon จากเชื้อรา *Fusarium graminearum* ที่ทำให้ต้นกล้าข้าวสาลีเกิดโรค และเมื่อนำข้าวสาลีที่มีเชื้อราเหล่านั้นมาใช้เลี้ยงลูกเป็ด ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อลูกเป็ดเนื่องจากมีสาร zearalenone ที่ผลิตจากเชื้อราออกมา แต่เมื่อใช้แบคทีเรีย *S. marcescens* ควบคุม *F. graminearum* ซึ่งตรวจพบว่าแบคทีเรียบนเส้นใย ทำให้เส้นใยแห้ง นอกจากนี้ยังพบว่ามีผลในการรบกวนการผลิตสาร zearalenone ทำให้ปริมาณสารนี้ลดลงหลังจาก 4 สัปดาห์ ดังนั้นเอนไซม์ไคตินเอสที่สร้างจากแบคทีเรีย *S. marcescens* สามารถควบคุมเชื้อ *F. graminearum* ในข้าวสาลีและช่วยให้ไม่มีการผลิตสารพิษที่เป็นอันตรายต่อลูกเป็ด รวมทั้งยังช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ดข้าวสาลีได้

Jinzhua และคณะ (2005) ศึกษาการแสดงออกของยีนไคตินเอสจากเชื้อรา *Tricoderma aureoviride* โดยโคลนยีนไคตินเอส (*ech42*) จากเชื้อราชนิดนี้และส่งถ่ายยีนนี้เข้าสู่เชื้อรา *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อตรวจสอบยีนที่ทำการส่งถ่ายพบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *ech42* 42 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของยีนไคตินเอสที่พบในเชื้อรา *T. harzianum* เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่ามี accession number คือ AY 850032 มีความเหมือนกับยีน *chi42* ของเชื้อรา *T. viride* 98 เปอร์เซ็นต์ ยีน *chi 42* ของเชื้อรา *T. viride* สายพันธุ์ ATCC32630 91 เปอร์เซ็นต์ ยีน *ech42* จากเชื้อรา *T. harzianum* 97 เปอร์เซ็นต์ ยีน *chiHAR3* จากเชื้อรา *T. harzianum* SK-55 93 เปอร์เซ็นต์ และยีน *THECH42* จากเชื้อรา *T. harzianum* IMI 206040 93 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ายีน *ech42* จากเชื้อรา *T. aureoviride* นี้จะ

สังเคราะห์โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 4231 กรดอะมิโน ซึ่งเป็นรหัสในการสังเคราะห์เอนไซม์ไคดินเนส

ในการวิจัยนี้ใช้ข้าวไทยที่สังเคราะห์เอนไซม์ไคดินเนสและโคลนยีน และศึกษาคุณลักษณะของยีนไคดินเนส เพื่อพัฒนาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข6 ปลุกบนกระดาดที่ขรุขระ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วคั้นน้ำอีก 1 สัปดาห์

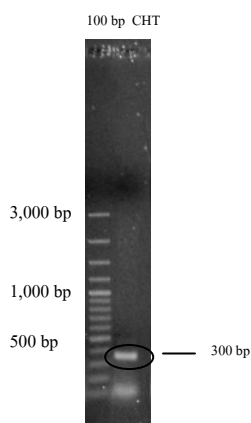
สกัด RNA โดยการดัดแปลงจากวิธีของ Suzuki และคณะ (2001) จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA บริเวณกลางยีนด้วย วิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ template RNA 1 ไมโครกรัม ไพรเมอร์ที่ใช้ได้แก่ CHT:F 5' - GGAAGCGGGAGGTGgcngcnttyt - 3' และ CHT:R 5' - CCTGCGGGGtcaccaraavc - 3' ทำการสังเคราะห์ first strand โดยเติม template RNA ลงใน Ready-To-Go RT-PCR beads (Amersham Biosciences) ที่มี poly d(T) 12-18 0.5 ไมโครกรัม นำสารละลายดังกล่าวมาต้มที่ 42 องศาเซลเซียส 30 นาที และที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเติมไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีน จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวเข้าเครื่อง PCR (Ampliton II thermocycler, Thermolyn, USA) เพื่อทำการสังเคราะห์ยีน โดยใช้โปรแกรมสำหรับการสังเคราะห์ดังนี้ 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที, 35 รอบที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 1 รอบที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 1.2% agarose gel ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ออกจาก agarose gel เพื่อสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany) เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy (Promega) จากนั้นทำการส่งถ่าย ดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock

ทำการตรวจสอบโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จากนั้นคัดเลือกโคลนเพื่อหาลำดับเบส

ทำการสังเคราะห์ยีนด้านปลาย 3' ด้วย SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech) โดยไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีนด้านปลาย 3' คือ 5' - CATCCAACCTCTCCTTCAACTTCAAC - 3' ทำการสังเคราะห์ยีนตามวิธีการในคู่มือ ตรวจสอบผลที่ได้ด้วย gel electrophoresis ใน 1.2% agarose gel ทำการโคลนยีนตามวิธีข้างต้น ตรวจสอบการมีดีเอ็นเอสายผสม และคัดเลือกโคลนเพื่อหาลำดับเบส แล้วนำลำดับเบสที่ได้จากทั้งสองบริเวณมารวมกัน เพื่อหาลำดับเบสของยีนวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)

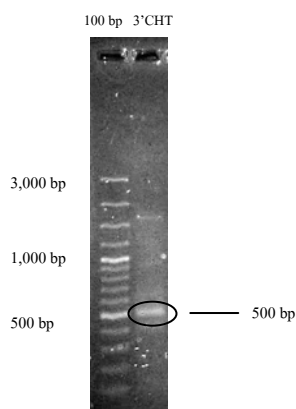
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

เมื่อทำการสังเคราะห์ cDNA ยีนไคดินเนสในข้าวไทยพันธุ์ กข 6 (*Oryza sativa* cv RD6) บริเวณกลางยีน และด้านปลาย 3' ด้วยเทคนิค RT-PCR และ 3' RACE และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส (ภาพที่ 1) และ 500 คู่เบส (ภาพที่ 2) ตามลำดับ หลังการโคลนยีนหาลำดับเบส นำลำดับเบสทั้งสองบริเวณมารวมกัน และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ได้จากการโคลนยีนพบว่า ลำดับเบสของยีนไคดินเนส บริเวณกลางยีนถึงปลายด้าน 3' ที่มีความยาว 500 คู่เบส เมื่อนำเบสของยีนไคดินเนสแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 207 หน่วย (residue) และสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 20.54 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไคดินเนสจากข้าวไทยพันธุ์ กข 6 กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) พบว่ามีความเหมือนกับไคดินเนสใน *O. sativa* Japonica group (accession number U02286.1) และ *O. sativa* Indica group (accession number L37289.1) เท่ากับ 97 และ 89% ตามลำดับ



ภาพที่ 1 แถบ DNA ของยีนไคตินเนส ที่ได้จากวิธี

RT-PCR



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอของ 3' ไคตินเนส จาก 3' RACE-

PCR

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาลำดับเบสของบริเวณรหัสของยีนสำหรับเอนไซม์ไคตินเนสในข้าวไทยพันธุ์ กข 6 (*Oryza sativa* cv RD6) พบว่าลำดับเบสของบริเวณรหัสของยีนตั้งแต่บริเวณกลางยีนถึงปลายด้าน 3' ที่ได้ทำการศึกษา มีความยาว 624 คู่เบส สามารถแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 207 หน่วย การศึกษาในลำดับต่อไปคือ การตรวจสอบหาลำดับเบสบริเวณปลายด้าน 5' และเชื่อมต่อกับลำดับเบสทุกส่วนของยีน แล้วตรวจสอบคุณลักษณะของยีน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนนทิพย์ บุนนาค อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร.อนวัช สุวรรณกุล อาจารย์ที่ปรึกษา

ขอขอบคุณโครงการ การสร้างภาติในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Aziz, H.N. 2002. The Role of Chitinase of *Serratia marcescens* in Controlling the Production of Zearalenone by *Fusarium graminearum*. *Acta Microbiological Polonica* 50(2): 131-137.
- Baek, J.H., Han, B.K. and Jo, D.H. 2001. Distribution of Chitinase in Rice (*Oryza sativa* L.) Seed and Characterization of a Hull-Specific Chitinase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 34: 310-315.
- Brogie R. and Broglie K. 1994. Chitinase Gene Expression in Transgenic Plants : A Molecular Approach to Understanding Plant Defense Responses. In: Bevan MW, Harrison BD, Leaver CJ, editors. *The Production and Uses of Genetically Transformed Plants*. UK: The Royal Society ; 77-82.
- Jinzh, I.E., Bernard, E.C. and Qian, P. 2005. Expression of the Chitinase Gene from *Trichoderma aureoviride* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 39-43.
- Kasprzewska A. 2003. Plant chitinase-regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 8(3): 809-824
- Suzuki, Y., Makino, A. and Mae, T. 2001. An Efficient Method for Extraction of RNA from Rice Leaves at Different Ages Using Benzyl Chloride. *Journal of Experimental Botany*. 52: 1575-1579