เฉิน รองยี : คุณสมบัติและหน้าที่ของ Os1BGlu4 เบต้ากลูโคสิเดสจากข้าว
(FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF RICE β-GLUCOSIDASE Os1BGlu4)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 194 หน้า

เบต้ากลูโคซิเดส (β-D-glucopyranosideglucohydrolases, E.C. 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก และปลดปล่อยหมู่ไกลโคซิลออกจากไกลโคไซด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ ในจีโนมของข้าวพบยีนเบต้ากลูโคซิเดสทั้งหมด 34 ยีน จากการวิเคราะห์ลำดับโปรตีนโดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่า Os1BGlu4 จากข้าวจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ BGLU42 จาก *Arabidopsis* และ latex cyanogenic β-glucosidase จาก *Heveabrasiliensis* และเป็นอิสระจากกลุ่มอื่น ๆ เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ Os1BGlu4 จึงทำการผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant Os1BGlu4; rOs1BGlu4) ใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ Origami B(DE3) พบว่าเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนลูกผสมนี้ โดยไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้น (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG) การวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่าที่ค่าพีเอช 6.5 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ การวิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์ rOs1BGlu4 ต่อสารตั้งต้น พบว่าในระดับขั้นโพลีเมอไรเซชัน (degree of polymerization; DP) ของเอนไซม์ลูกผสมนี้มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะ β-(1, 3)-linked oligosaccharides ที่ระดับ 2-3 และพันธะ β-(1, 4)-linked oligosaccharide ที่ระดับ 3-4 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายซับสเตรท โดยอาศัยพื้นฐานของตัวแปรทางจลนศาสตร์ พบว่าเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลาย *p*NP-glucopyranoside (*p*NPG) และ *p*NP-fucopyranoside ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (thin layer chromatography; TLC) ยังแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นจากธรรมชาติ เช่น salicin esculin และ para-coumaryl alcohol glucoside ได้ ในการศึกษาลำดับการย่อยสลายของเอนไซม์โดยใช้ *p*NP-cellobiside เป็นสารตั้งต้น พบว่าเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้เมื่อสารตั้งต้นประกอบไปด้วยกลูโคสตั้งแต่ 2 โมเลกุล ขึ้นไป การศึกษาทรานไกลโคซิเลชั่น พบว่าที่ความเข้มข้น *p*NPG ในระดับสูงเอนไซม์ rOs1BGlu4 มีความสามารถในการส่งต่อกลุ่มของกลูโคสจาก *p*NPG ไปสู่เอทานอลและ *p*NPG ได้ จากการศึกษาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้แสดงให้เห็นว่า $HgCl_2$ delta-glucono-lactone และ $FeCl_3$ มีอิทธิพลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ rOs1BGlu4

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *Os1bglu4* พบว่ายีนนี้มีการแสดงออกสูงที่สุดในช่วงแรกเริ่มของการงอก และค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งอยู่ในระดับคงที่ในวันที่ 6 วัน หลังการงอก ในระยะข้าวออกรวง พบว่ายีน *Os1bglu4* มีการแสดงออกสูงที่สุดในช่อดอก รองลงมาคือ ราก ใบ

และกาบใบ สำหรับการแสดงออกของยีน *Os1bglu4* ในบริเวณอื่น ๆ พบการแสดงออกสูงสุดในวันที่ 14 ของการงอกของราก แต่แสดงออกได้น้อยในต้นอ่อน และใบ ในการวิเคราะห์รูปแบบการถอดรหัสของต้นข้าวที่เติมเกลือ (NaCl) และสารโพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol; PEG) ในขณะที่ทำการปลูกข้าว ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน *Os1bglu4* ที่เพิ่มขึ้นแต่ไม่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของฟีโนไทป์ได้ด้วยตาเปล่า การแสดงออกของยีน *Os1bglu4* เพิ่มมากขึ้นเมื่อข้าวเป็นโรคไหม้ (rice blast) โดยเฉพาะในข้าวปรับปรุงพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ (near isogenic line) การแสดงออกมากกว่าปกติของยีน *Os1bglu4* ในข้าว ส่งผลให้ข้าวมีความต้านทานต่อโรคไหม้ได้มากขึ้น การลดการแสดงออกของยีน *Os1bglu4* ในข้าวก็ส่งผลต่อความต้านทานโรคไหม้ลดลงด้วย ยีน *Os1bglu4* มีการแสดงออกมากขึ้นในราก โดยพบการแสดงออกที่มากขึ้นเมื่อปริมาณขนรากมีมาก เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางฟีโนไทป์ พบว่าต้นกล้าข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีน *Os1bglu4* มากเกินปกตินั้น มีจำนวนของขนรากมากกว่าต้นกล้าข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ลดการแสดงออกของยีนนี้ลงเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติ จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน Os1BGlu4 อาจมีบทบาทในการป้องกันการเกิดโรคไหม้ และการสร้างขนรากในข้าว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

CHEN ROUYI : FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF RICE β-GLUCOSIDASE Os1BGlu4. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 194 PP.

RICE/BETA-GLUCOSIDASE/HYDROLYSIS KIENTICS/TRANSGENIC RICE/RNAi/TRANSCRIPTION PATTERN

Beta-glucosidases (β-D-glucopyranosideglucohydrolases, E.C. 3.2.1.21) are enzymes that hydrolyze glycosidic bonds to release nonreducing terminal glucosyl residues from glycosides and oligosaccharides. Thirty-fouractive rice β-glucosidase genes had been identified in the rice genome. Protein sequence based phylogenetic analysis showed that Os1BGlu4 along with *Arabidopsis* BGlu42 and *Heveabrasiliensis* latex cyanogenic β-glucosidase represented an independent cluster. To help narrow the possible functions of Os1BGlu4, recombinant Os1BGlu4 (rOs1BGlu4) was expressed in *E. coli* Origami B(DE3). The optimized expression conditions showed that 16 hrs incubation at 20 ^{o}C without isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) inducer was the optimum condition for the expression. Biochemical analyses showed that pH 6.5 and 45 ^{o}C were optimum condition for the hydrolysis activity of rOs1BGlu4. The rOs1BGlu4 efficiently hydrolyzed β-(1,3)-linked oligosaccharides of degree of polymerization (DP) 2-3 and β-(1, 4)-linked oligosaccharide of DP 3-4. The rOs1BGlu4 can hydrolyze *para*nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (*p*NPG) and *p*NP-β-D-fucopyranoside efficiently, based on the kinetic parameters. Hydrolysis of natural substrates salicin, esculin and para-coumarylalcohol glucoside by rOs1BGlu4 can be detected by thin layer chromatography (TLC). The study of *p*NP-cellobioside sequential hydrolysis showed that the initial hydrolysis was

between the two glucosyl moieties. The transglycosylation studies showed that a high concentration of pNPG, rOs1BGlu4 has the ability to transfer the glucose group of *p*NPG to ethanol and *p*NPG. The inhibition study revealed that $HgCl_2$, delta-gluconolactone and $FeCl_3$ strongly inhibited the hydrolysis activity of rOs1BGlu4.

The *Os*1*bglu*4 had the highest expression level at the early stage of germination and decreased gradually to a steady level at 6 day after germination. In terms of spatial expression, *Os*1*bglu*4 had the highest expression in 14 day seedling root, low expression in shoot and leaf. The transcription pattern analysis of sodium chloride (NaCl) and polyethylene glycol (PEG) treated plants showed that the expression of *Os*1*bglu*4 increased, but no visible phenotype was observed. The expression of *Os*1*bglu*4 was also highly induced when treated with rice blast, especially in the rice blast resistant near isogenic line. The *Os*1*bglu*4 gene over-expression (oe) and knock-down transgenic rice were generated. Over-expression of *Os*1*bglu*4 gene in rice resulted in enhanced resistance to rice blast infection. Knock-down (RNAi) of *Os*1*bglu*4 in rice resulted in decreased resistance to rice blast infection. The expression of *Os*1-*bglu*4 was higher in root with more root hair than that with less root hair. Phenotype analysis showed that the oe lines had more root hair and the RNAi lines had lower root hair when compared to wild type rice seedling. These results suggest that Os1-BGlu4 might play some roles in rice blast defense and root hair formation in rice.

School of Biotechnology
Academic Year 2012

Student's Signature_____
Advisor's Signature_____
Co-advisor's Signature_____