บทคัดย่อ

การศึกษาทางชีวสารสนเทศ ได้แก่ ขนาด ส่วนอนุรักษ์ของ cysteines โครงสร้างทติยภูมิ ตติยภูมิ คุณสมบัติความน่าจะเป็นโปรตีน antimicrobial peptide ของโปรตีนในอ้อย 5 ชนิด พบ โปรตีน P2C1-6-noT P36m-noT และ P25-50 มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ plant defensin เลือกโปรตีน P36m-noT มาใช้ทดสอบในทดลองต่อไป โดยนำมาปรับลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เหมาะสมในการแสดงออกใน *E.coli* เพื่อการผลิตโปรตีนมากขึ้นในระบบ *E.coli* โดยมีค่า Frequency of Optimal Codons (FOB) เพิ่มขึ้นจาก 75% เป็น 91% ทำการสร้างพลาสมิดสายผสม p36m-noT-op ที่มีการปรับลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เหมาะกับการแสดงออกใน *E.coli* กับพลาสมิดเวคเตอร์ 2 ชนิด พบสามารถผลิตโปรตีนในพลาสมิด pET-SUMO ได้มากกว่า pMAL-c5X ทดสอบอุณหภูมิและความเข้มข้นของสาร IPTG ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรตีนสายผสมของโคลน pET-SUMO-P36mnoT-op และ pMAL-c5X-p36m-noT-op พบที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25°C มากกว่าที่ 30 °C และ 37°C และความเข้มข้นของ IPTG ที่ 3 mM ทำให้ pMAL-c5X-p36m-noT-op มีการแสดงออกของโปรตีนได้มากกว่าที่ 30 0.3 และ 0.03 mM วิธีการสกัดโปรตีนจากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการต้มให้โปรตีนเป้าหมายหลักดีกว่าการใช้ไนโตรเจนเหลวสลับกับให้อุณหภูมิสูง การผลิตโปรตีนในปริมาณมากในโคลนที่ยีน p36m-noT-op ในพลาสมิดเวคเตอร์ pET-SUMO พบว่าโปรตีนมีการตกตะกอนเมื่อความเข้มข้นสูง ไม่สามารถนำมาแยกสกัดโปรตีน p36m-noT-op ออกจากโปรตีนติดตาม (taq protein) การผลิตโปรตีน p36m-noT-op ในพลาสมิดเวคเตอร์ pMAL-c5x พบว่าสามารถแยกสกัดโปรตีนสายผสมและแยกโปรตีน p36m-noT-op ออกโดยการตัดด้วยเอนไซม์ Factor Xa protease ที่อัตราเอนไซม์ต่อโปรตีน 1:150 บ่มที่ 25°C เป็นเวลา 3 วัน มีประสิทธิภาพดีกว่าอัตราเอนไซม์ต่อโปรตีน 1:50 และ 1:100 บ่มเป็นเวลา 2 และ 7 วัน ประสิทธิภาพของโปรตีน p36m-noT-op สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Acidovorax citrulli* และ *Xanthomonas perforans* ในจานหลุมที่ความเข้มข้นโปรตีน 125 ng/ml และ 31.3 ng/ml ตามลำดับ โดยโปรตีนนี้มีคุณสมบัติเป็น bacteriostatic agent ได้พัฒนา real-time PCR ไพร์เมอร์ leuS-F1/leuS-R2 ที่จำเพาะต่อยีน *leuS* สำหรับใช้ตรวจติดตามและหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวอ้อยได้ การเพาะเลี้ยงเชื้อไฟโตพลาสมาในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำได้ยาก ต้นแตกกอฝอย เจริญได้ช้า อ่อนแอ ติดเชื้อได้ง่าย และมีการเปลี่ยนสีต้นจากเขียวเป็นขาวและตายในที่สุด จึงใช้อ้อยที่ติดเชื้อใบขาวที่เพาะในโรงเรือนและแปลงปลูกมาใช้ทดสอบแทน การทดสอบการยับยั้งเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยการถ่ายยีนแบบชั่วคราวในท่อนอ้อย พบอ้อยถ่ายยีนที่มีพลาสมิดที่มียีน p36m-noT ที่มีโปรโมเตอร์ชนิด 35s CaMV ซึ่งสามารถแสดงออกได้ในทุกเซลล์พืช มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาน้อยกว่าที่มีโปรโมเตอร์ชนิด Sac-susy ที่มีการแสดงออกเฉพาะในท่อลำเลียงอาหาร และมีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมน้อยกว่าอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีพลาสมิดที่ไม่มียีน p36m-noT แต่เชื้อไฟโตพลาสมามีปริมาณมากขึ้นเมื่อเวลาหลังการถ่ายยีนนานขึ้น บ่งชี้ถึงการยับยั้งเป็นแบบชั่วคราว สอดคล้องกับผลการยับยั้งเชื้อในจานหลุม จึงคาดว่าการยับยั้งเชื้อในอ้อยด้วยแช่อ้อยในสารละลายโปรตีนโดยตรงอาจให้ผลเพียงการชะลอการเจริญของเชื้อเท่านั้น แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดของตัวอย่างอ้อยที่จะนำมาทดสอบและระยะเวลาจึงยังไม่ได้ทำการทดสอบในขั้นตอนนี้เพื่อยืนยันผล

Abstract

Bioinformatics analysis and prediction includes the size, cysteines conserve position, secondary structure, tertiary structure, antimicrobial peptide possibility were tested with 5 sugarcane proteins. Result of P2C1-6-noT, P36m-noT and P25-50 proteins have a structure and characteristic similar to plant defensin. P36m-noT protein was selected for further testing. By adjusting the nucleotide sequence to be suitable for protein expression in *E. coli*, the frequency of optimal codons (FOB) increased from 75% to 91%. Recombinant clone of P36m-noT-op which nucleotide adjusted was recombinded with 2 plasmid vector which pET-SUMO produced more protein than pMAL-c5X. Optimum temperature and concentration of IPTG in culture for producing protein of the both were tested. Both were found protein expressing more at 25°C than 30 °C and 37°C. The concentration of IPTG at 3 mM gave pMAL-c5x-p36m-noT-op more protein expressing than 30 0.3 and 0.03 mM. The method for protein extracted from bacterial cell by boiling method better than liquid nitrogen alternating with high temperatures method. Large amount of protein production of p36m-noT-op in the pET-SUMO plasmid vector was shown protein aggregation and could not do the further step. The production of p36m-noT-op protein in the pMAL-c5x plasmid vector was found to be able to extract the recombinant protein and p36m- noT-op was separated by cutting with factor Xa protease at 1: 150 enzyme ratio, incubated at 25°C for 3 days, had better efficiency than enzyme to protein ratio 1:50 and 1: 100, incubated for 2 and 7 days. p36m-noT-op protein is bacteriostatic agent which inhibited the growth of bacteria *Acidovorax citrulli* and *Xanthomonas perforans* in 96 well plates at protein concentrations of 125 ng/ml and 31.3 ng/ml, respectively. Protein activity decreases bacteria growth rather than cell killing. Real-time PCR primers were developed, LeuS-F1 / leuS-R2 which specific to the leuS gene, for the detection and quantification of sugarcane white leaf phytoplasma. Cultivation of phytoplasma infected sugarcane in tissue culture is difficult. Plantlet showed slow growth, small multiple shoots, and color changing from green or pale green to white and eventually die. Therefore infected sugarcane from the greenhouse and field were used. Phytoplasma inhibition testing was done by transient gene expression in sugarcane setts. The transgenic sugarcane setts with p36m-noT gene with 35s CaMV promoter, expressing in all plant cells, has a lower amount of phytoplasma than the Sac-susy promoter, expressing only in phloem and a lower amount of phytoplasma than the transgenic sugarcane setts with plasmid without a p36m-noT gene. The phytoplasma quantity increases with the longer time after transformation. From the results of sugarcane transformation and bacterial inhibition of this protein test in 96 well plates showing protein activity is a bacteriostatic agent. Therefore, it is expected that inhibition of sugarcane infection by soaking sugarcane setts directly in a protein solution may result in only slowing the growth of the

phytoplasma. However, due to the limitation of sugarcane samples and the time, they have not been tested at this stage to confirm the results.