10 SEP 1999

CLONING AND EXPRESSION OF HELPER COMPONENT-PROTEINASE GENE FROM PAPAYA RINGSPOT VIRUS, THAI ISOLATE

WIPAWANEE KASEMWORAPHOOM

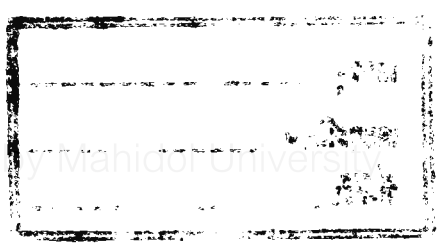
With compliments
of
ปัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1999

ISBN 974-662-499-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
W797 C0
1999



Copyright by Mahidol University

311386 C.2

3936663 MBMG/M : MAJOR: MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING; M.Sc. (MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)
KEY WORD : PAPAYA RINGSPOT VIRUS / HELPER COMPONENT-PROTEINASE / GENE EXPRESSION / *ESCHERICHIA COLI* / POLYCLONAL ANTIBODIES / *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION / TRANSGENIC TOBACCO

WIPAWANEE KASEMWORAPHOOM : CLONING AND EXPRESSION OF HELPER COMPONENT-PROTEINASE GENE FROM PAPAYA RINGSPOT VIRUS, THAI ISOLATE. THESIS ADVISORS: SUNEE KURTBUNDIT Ph.D., MILOSLAV JURICEK Ph.D. 159 p. ISBN 974-662-499-7.

Papaya ringspot virus (PRSV), which is classified to the potyvirus group, causes a serious disease to papaya plantations in Thailand. The helper component-proteinase (HC-Pro) has been shown to be involved in differrent steps of the potyvirus life cycle. The study of HC-Pro would be useful for understanding the molecular mechanism of virus life cycles, which could lead to the development of strategies for preventing virus infection. In this study, the HC-Pro gene was isolated from papaya ringspot virus of Thai isolate. The HC-Pro gene was cloned and was investigated for its expression in plant by using tobacco as a model.

The DNA fragment containing HC-Pro gene was isolated from PRSV, Thai isolate by RT-PCR technique and was cloned into pUC18 vector. The nucleotide sequences of 5′ and 3′ end of recombinant DNA was determined to design specific primers for amplification of HC-Pro gene from the recombinant DNA. Moreover, these specific primers were modified to add the start and stop codon for HC-Pro gene expression. The HC-Pro gene was then cloned into 2 types of vectors. First, the HC-Pro gene was cloned to an *E. coli* expression vector for production of fusion and non-fusion HC-Pro proteins, which were used to produce polyclonal antibodies in rabbits and these polyclonal antibodies would be used for checking the HC-Pro gene expression in transgenic plants later. Second, the HC-Pro gene was cloned to a binary vector for introduction of HC-Pro gene to tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation. From analyses of all 7 transgenic tobacco plants available, all of them contained HC-Pro gene as detection with hot start PCR technique and the transcription of HC-Pro gene to mRNA was also detected in all transformed tobaccos by using RT-PCR technique. The translation of HC-Pro gene to HC-Pro protein was detected by western blotting with polyclonal antibodies. The result showed that the introduced HC-Pro gene could express in transgenic plant B as the presentation of remarkable HC-Pro protein band while transgenic plant A did not show the HC-Pro protein band. The HC-Pro protein bands of transgenic plants C1, C2, D, E and F were very faint. In conclusion, it is possible to isolate the HC-Pro gene from PRSV, Thai isolate and express the gene in transgenic tobacco.

Copyright by Mahidol University

3936663 MBMG/M : สาขาวิชา : อณูพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ ;
วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์)

วิภาวนี เกษมวรภูมิ : การโคลนนิ่งและการศึกษาการแสดงออกของยีนสร้าง helper component-proteinase จากไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอที่พบระบาดในประเทศไทย (CLONING AND EXPRESSION OF HELPER COMPONENT-PROTEINASE GENE FROM PAPAYA RINGSPOT VIRUS, THAI ISOLATE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุณี เกิดบัณฑิต, Ph.D., Miloslav Juricek, Ph.D. 159 หน้า. ISBN 974-662-499-7

เชื้อไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอ (Papaya ringspot virus (PRSV)) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม potyvirus เป็นสาเหตุของโรคระบาดที่สำคัญของมะละกอในประเทศไทย การศึกษา helper component-proteinase (HC-Pro) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับวงจรชีวิตของไวรัสในกลุ่ม potyvirus จะทำให้สามารถเข้าใจวงจรชีวิตของไวรัส PRSV ในระดับโมเลกุล ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัส งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกยีนสร้าง HC-Pro ของไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอที่พบในประเทศไทย,ตัดต่อยีน และศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวในพืช โดยใช้ต้นยาสูบเป็นพืชทดลอง

ได้ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่มียีนสร้าง HC-Pro ของไวรัส PRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR และโคลนชิ้นดีเอ็นเอนี้เข้าเวคเตอร์ pUC18 และทำการศึกษาลำดับเบสทางด้านปลาย 5′ และ 3′ ของชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวเพื่อใช้ออกแบบ primers จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน HC-Pro โดยได้เติมรหัสเริ่มต้นและรหัสหยุดเพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนเข้าไปใน primers จำเพาะนี้ด้วย primers ดังกล่าวนี้ถูกนำมาใช้เพิ่มจำนวนยีนสร้าง HC-Pro ด้วยวิธี PCR แล้วทำการโคลนยีนนี้เข้าสู่เวคเตอร์ 2 ชนิด ชนิดแรก คือ เวคเตอร์สำหรับการแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อให้ได้โปรตีน HC-Pro แบบ non-fusion และ fusion แล้วนำโปรตีนนี้มาสร้างแอนติบอดีเพื่อใช้ในการตรวจสอบโปรตีน HC-Pro ในต้นยาสูบแปลงพันธุ์ อีกชนิด คือ เวคเตอร์ที่เป็น binary plasmid ซึ่งใช้ในการนำยีนสร้าง HC-Pro เข้าสู่ต้นยาสูบด้วยแบคทีเรีย *Agrobacterium* จากการตรวจสอบต้นยาสูบแปลงพันธุ์ทั้งหมด 7 ต้น โดยใช้วิธี hot start PCR พบว่าทั้ง 7 ต้นมียีนสร้าง HC-Pro และตรวจพบการสร้าง mRNA จากยีนดังกล่าวในต้นยาสูบแปลงพันธุ์ทั้งหมดโดยใช้วิธี RT-PCR เมื่อตรวจสอบการสร้างโปรตีนโดยวิธี western blotting กับแอนติบอดีต่อ HC-Pro พบว่า ต้นยาสูบแปลงพันธุ์สายพันธุ์ B สามารถสร้างโปรตีน HC-Pro ได้ โดยได้แถบโปรตีนที่สามารถเห็นได้ชัด ในขณะที่สายพันธุ์ A ไม่สามารถตรวจพบแถบโปรตีนของ HC-Pro ได้ สำหรับต้นที่เหลือ (C1, C2, D, E และ F) ได้แถบโปรตีนจางมาก งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถแยกยีนสร้าง HC-Pro ได้จากไวรัส PRSV และยีนนี้สามารถแสดงออกได้ในต้นยาสูบ

Copyright by Mahidol University