การโคลนและวิเคราะห์ยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่างและการถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ

Cloning and Characterization of Cyclophilin Gene from *Sorghum bicolor* (L.) Moench and Its Transformation into Tobacco Plant

สุภาวดี ง้อเหรียญ [1/] พยุงศักดิ์ รวยอารี [1/] กษิดิศ ดิษฐบรรจง [1/]
ชยานิจ ดิษฐบรรจง [1/] หทัยรัตน์ อุไรรงค์ [1/]
Suphawadee Ngorian [1/] Payungsak Rauyaree [1/] Karsedis Distabanjong [1/]
Chayanit Distabanjong [1/] Hathairat Urairong [1/]

ABSTRACT

Cyclophilins are ubiquitous proteins present in all subcellular compartments, which are involved in a variety of processes such as immunosuppression and major biotic and abiotic stresses. The research was made at the laboratory of Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathum Thani province during October 2008 – September 2010. In this study, two full-length genomic DNA sequences of sorghum (*Sorghum bicolor*) encoding cyclophillin (SbCyP) have been isolated from two sorghum varieties named U-Thong 1 (UT1) and Supanburi 60 (SPR 60) via PCR – based method with CyP4 (forward) + CyP4 (reverse). Amino acid sequence of SbCyP disclosed similarity to each other and with that of cyclophillins of various organisms. The gene sequence contains a fragment of 1,062 kb (genbank accession no EU722309), including a 519 bp complete ORF, the 5'UTR of 130 bp, 3'UTR of 413 bp and a typical AATAA motif, encoding the 172 amino acid polypeptide. A 519-bp fragment of the SbCyP gene was further amplified by PCR-based method with CyPXbal (forward) + CyPKpnl (forward), addition of Xbal and Kpnl restriction sites for protein translation purpose and then ligated into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator to obtain 10 kb - pCAMBIA2300 - CyP expression cassette. The expression cassette was then transferred into *Nicotiana tobacum* (tobacco) plant by Agrobacterium-

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi district, Pathum Thani province 12110

mediated transformation with kanamycin antibiotic selection. A total of twenty-five transformed plants were randomly selected and screened for the presentation of transgenes by PCR-based method with two pairs of CyPXbal (forward) + CyPKpnI (reverse) and NOS (forward) + 35SCaMV (reverse). Ten out of twenty-five selected plants were found to be transgenic tobacco plants.

Key words: cyclophilin gene, *Soghum bicolor* gene cloning, cloning, plasmid construct, transformation, model plant

บทคัดย่อ

การโคลนยีนไซโคลฟิลิน (cyclophilin : CyP) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกัน และยับยั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช ซึ่งช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 - กันยายน พ.ศ. 2553 งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีน CyP จากข้าวฟ่าง ซึ่งเป็นพืชที่มีลักษณะทนแล้ง โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน CyP จากฐานข้อมูล NCBI ได้แก่ CyP4 (forward) + CyP4 (reverse) นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่าง 2 พันธุ์ ได้แก่ อู่ทอง 1 (UT 1) และสุพรรณบุรี 60 (SPR 60) ได้ยีนขนาด 1,062 คู่เบส (genbank accession no EU 722309) เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม EMBL-EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่ายีน CyP ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนของ open reading frame (ORF) มีขนาดเท่ากับ 519 คู่เบส 5'UTR มีขนาด 130 คู่เบส 3'UTR มีขนาด 143 คู่เบส และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น AATAA motif สามารถแปลเป็นรหัสเปปไทด์ได้จำนวน 172 amino acid จากนั้นทำการโคลนยีนในส่วนที่มีการแสดงออกโดยการทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่างร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ได้แก่ CyPXbal (forward) + CyPKpnI (forward) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส ได้ยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส ทำการเชื่อมต่อยีน CyP เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ได้พลาสมิดสายผสม (pCAMBIA2300 – CyP) ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส ถ่ายฝากยีนที่ได้เข้าสู่ใบยาสูบโดยใช้วิธีอะโกรแบคทีเรีย คัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin สามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 25 ต้น นำต้นที่ได้รับการคัดเลือกมาตรวจสอบการปรากฏของยีนโดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่

CyPXbaI (forward) + CyPKpnI (reverse) และ NOS (forward) + 35SCaMV (reverse) พบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีจำนวนทั้งหมด 10 ต้น

คำหลัก : ยีนไซโคลฟิลิน ข้าวฟ่าง การโคลนและวิเคราะห์ยีน การถ่ายฝากยีน ยาสูบ

คำนำ

ปัจจุบันประชากรส่วนใหญ่ในทุกภาคของประเทศไทย ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก พืชส่วนใหญ่ที่เกษตรกรทำการเพาะปลูกเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ข้าวโพด ปาล์มน้ำมัน ยางพารา ถั่วเหลือง มันสำปะหลังและอ้อย เป็นต้น (นิรนาม, 2554) การเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจเหล่านี้มักพบปัญหาและอุปสรรคในการเพาะปลูก เช่น โรคพืช แมลงศัตรูพืช และสภาพความแปรปรวนของดินฟ้าอากาศ ทั้งปรากฏการณ์เอลนินโญที่ทำให้เกิดความแห้งแล้ง ในขณะที่ลานินญาทำให้เกิดฝนตกหนักในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเอลนินโญและลานินญาส่งผลกระทบต่อพื้นที่เกษตรกรรมโดยตรง (จารุจินต์, 2554) ปัจจุบันปัญหาดังกล่าวนับวันจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ทำให้เกษตรกรต้องปรับปรุงวิธีการเพาะปลูก รวมทั้งวางแผนการเพาะปลูกให้เหมาะสมกับสภาพดินฟ้าอากาศ นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีพันธุ์พืชที่มีคุณสมบัติสามารถทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ การนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยพัฒนาพันธุ์พืชของไทยให้มีศักยภาพ และมีประสิทธิภาพในการให้ผลผลิตที่สูงขึ้น สามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ จึงเป็นเรื่องที่นักวิจัยไทยต้องทำการวิจัยอย่างเร่งด่วน

ไซโคลฟิลิน (CyPs) เป็นโปรตีนประเภทเปปติดิลโพรพิล ซิส-ทรานส์ ไอโซเมอเรส (PPIases) ที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ของออร์แกนเนล (organelle) ทั้งในเซลล์โปรคาริโอต และยูคาริโอต มีการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่พืชชนิดนั้นดำรงชีวิตอยู่ เช่น การได้รับผลกระทบจากโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ จากการศึกษาพบว่าในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มียีนชนิดหนึ่งที่สามารถตอบสนองต่อสภาวะความไม่เหมาะสมด้านต่างๆ คือยีนไซโคลฟิลิน โดยมีการสร้างภูมิคุ้มกัน และยับยั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช ซึ่งช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นๆ (Luan *et al.,* 1994; Kong *et al.,* 2001) ไซโคลฟิลินในพืชถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2533 โดยการสกัดแยก cDNA จากมะเขือเทศ ข้าวโพด พืชวงศ์ถั่ว และคาโนลา (Gasser *et al*., 1990) ปัจจุบันมีรายงานพบลำดับเบสที่เหมือนกับยีนไซโคลฟิลินที่โคลนได้จากพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง อ้อย ถั่วเหลือง ฝ้าย ยาสูบ มะพร้าว และอะราบิดอพซิส เป็นต้น อีกทั้งยังพบยีนชนิดนี้ในมนุษย์และสัตว์อีกด้วย

ที่ผ่านมามีงานวิจัยการค้นหายีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะของการทนแล้งในข้าวฟ่าง และพบว่ามียีนไซโคลฟิลินที่มีการแสดงออก

อย่างสูงเมื่อปลูกในสภาพแล้ง อีกทั้งยังพบไซโคลฟิลินมีการแสดงออกอย่างสูงในการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ จากพืชชนิดอื่นด้วย เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง พืชวงศ์ถั่ว คาโนลาและมันฝรั่ง (Marivet *et al.*,1992, 1994, 1995; Godoy *et al.*, 2000; Sharma and Singh, 2003) เป็นต้น

ดังนั้น การโคลนยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่างสายพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ยางพารา ถั่วเหลือง อ้อย และพืชอื่นๆ โดยการถ่ายฝากยีนไซโคลฟิลินเข้าสู่พืชเหล่านั้น เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้มีคุณสมบัติทนแล้งมากยิ่งขึ้น จากยีนที่สามารถพัฒนาขึ้นได้เองในประเทศไทย จะเป็นประโยชน์ต่อการนำพืชทนแล้งที่ได้มาพัฒนาให้สามารถใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การโคลนยีน CyP จากข้าวฟ่าง

1.1 ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีน CyP ที่มีการแสดงออก

ทำการศึกษาโดยค้นหายีน CyP ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต www.ncbi.nim.nih.gov/ นำมาวิเคราะห์หาลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserved region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน CyP ได้ดังนี้คือ CyP4 (forward) และ CyP4 (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีนในส่วนที่มีการแสดงออก คือ CypXbaI (forward) และ CypKpnI (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน CyP เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) (Table 1)

1.2 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอ

คัดเลือกพันธุ์ข้าวฟ่างที่มีลักษณะทนแล้ง จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง 1 และพันธุ์สุพรรณบุรี 60 นำเมล็ดพันธุ์มาเพาะในกระถาง นำใบอ่อนอายุประมาณ 1 เดือน มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ genomic DNA extraction kit (RBC Bioscience, Taiwan) จนได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ นำไปวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (OD: optical density) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

1.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอข้าวฟ่างที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyP คือ CyP4 (forward) และ CyP4 (reverse) โดยใช้ HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN,

USA) ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ 40 - 100 นาโนกรัม 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 M gene specific primer (forward), 0.4 M gene specific primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ pre-denature 93 °ซ. 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ denature 94 °ซ. 30 วินาที annealing 60 °ซ. 30 วินาที extension 70 °ซ. 2 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72 °ซ. 10 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (fermentas, USA) พร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

1.4 การโคลนยีน CyP เข้าสู่ Vector และการวิเคราะห์ลำดับเบส

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ตามคำแนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต (QIAGEN) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel ย้อมด้วย gel star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาด 1 กิโลเบส ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. เติม QG buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ. เป็นเวลา 1 ชม. เขย่าทุกๆ 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายใส่ใน binding column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย binding column วางลงบนหลอดทดลอง เติม EB buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 - 60 °ซ.) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 - 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis นำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ในปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร T&A cloning vector 2 ไมโครลิตร ligation buffer A 1 ไมโครลิตร ligation buffer B 1 ไมโครลิตร T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 22 °ซ. เป็นเวลา 15 – 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม. จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด competent cell 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที นำไป heat-shock ที่อุณหภูมิ 42 °ซ. เป็นเวลา 30 – 45 วินาที แช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม super optimal broth with catabolite repression (SOC) medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ.

เป็นเวลา 1 ชม. นำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) – amplicilin/X-gal/IPTG [(LB : เตรียม 1 ล. : 10 ก. NaCl 10 ก. tryptone 5 ก. yeast extract 15 ก. bacto-agar, ddH2O) 50 ไมโครกรัม/มล. amplicilin 100 ไมโครกรัม/มล. IPTG, 100 ไมโครกรัม/มล. X-gal] บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม.

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ amplicilin (50 ไมโครกรัม/มล.) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 – 16 ชม. นำมาสกัด พลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด geneJETTM Plasmid Miniprep Kit (fermentas) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย resuspension solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม lysis solution 250 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม neutralization solution 350 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายเซลล์ลงใน geneJETTM spin column นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม wash solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย geneJETTM spin column วางบนหลอดทดลองเติม elution buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *BamHI* ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 100 - 200 นาโนกรัม 1X fastdigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน CyP นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน CyP มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (applied biosystems) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (reverse) (Table 1) ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม bigdyeTM 2 ไมโครลิตร ready reaction buffer 1 ไมโครลิตร 5 M ไพรเมอร์ forward/reverse และ ddH2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ denature 96 °ซ. เป็นเวลา 10 วินาที annealing 50 °ซ. เป็นเวลา 5 วินาที, extension 60 °ซ. 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ hold ที่ 4 °ซ. infinity (α) ล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วน

เกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. เติม solution A (ddH2O 16 ไมโครลิตร : 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที กลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 0°ซ. เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 300 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด ละลายตะกอนด้วย HiDi – formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ใส่ตัวอย่างลงในหลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95 °ซ. เป็นเวลา 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่ การเปรียบเทียบชนิดยีนกับพืชที่มีรายงานในฐานข้อมูล genbank โดยวิเคราะห์เป็นค่าความเหมือน (% max identity) การวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์ (amino acid) การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับพืชชนิดต่างๆ และการวิเคราะห์โครงสร้างของยีน ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

2. การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Plant Expresstion Vector และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

2.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ plant expresstion vector

นำพลาสมิด pCAMBIA2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) มีขนาด 9,648 คู่เบส มาใช้เป็น plant expression vector มียีน NPTII (kanamycin) เป็นยีนคัดเลือก และชิ้นดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI ในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของยีน CyP/พลาสมิดดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ความเข้มข้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม 1X fastdigest buffer, 1U fastdigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (ข้อ 1.4) จะได้ชิ้นพลาสมิด pCAMBIA2300 และชิ้นยีน CyP โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจำจดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ KpnI

นำชิ้นยีน CyP เชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) เพื่อสร้างพลาสมิดสายผสมที่สมบูรณ์ pCAMBIA2300 – CyP มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของยีน CyP 100 – 200 นาโนกรัม pCAMBIA2300 50 – 400 นาโนกรัม 1X ligation buffer, T4 DNA ligase ปรับปริมาตรด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°ซ. เป็นเวลา 1 ชม. และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65°ซ. เป็นเวลา 10

นาที จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ DH5α โดยวิธี Heat Shock (Sambrook *et al*., 1989)

2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิค PCR

ทำการตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *KpnI* ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร 1X fastdigest buffer 0.5U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 80°ซ. เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบการปรากฏของยีน ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMv (reverse) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 2U Hot Taq Master Mix, 0.5 M primer (forward) 0.5 M primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ pre-denature 95 °ซ. 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ denature 94°ซ. 30 วินาที annealing 60°ซ. 30 วินาที และextension 72°ซ. 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°ซ. 10 นาที อีก 1 รอบ และรักษาระดับไว้ที่ 4°ซ. infinity (α) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

3. การถ่ายยีน CyP เข้าสู่ยาสูบ

3.1 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด (chimeric construct) เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี Electroporation (Walkerpeach and Velten, 1994)

การเตรียม competent cell โดยนำเชื้อ *A. tumefaciens* มาเลี้ยงในอาหารเหลว yeast extract peptone (YEP) (ปริมาตร 1 ล. : bacto-peptone 10 ก. yeast extract 10 ก. และNaCl 5 ก. agar 1.5%) ผสมสาร rifampicin (50 ไมโครกรัม/มล.) เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 16 ชม. นำเชื้อที่เลี้ยงปริมาตร 1 มล. มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว YEP – rifampicin ปริมาตร 100 มล. เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลาประมาณ 2 – 3 ชม. จนค่า OD_{600} = 0.2 – 0.3 นำเชื้อที่ได้แช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 – 30 นาที นำไปตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที เทอาหารทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ จำนวน 3 รอบ ด้วย 10% glycerol (ที่แช่เย็น) ปริมาตร 100 20 และ 2 มล. ตามลำดับ รอบสุดท้ายละลายตะกอนเซลล์แล้ว

แบ่ง competent cell ที่เตรียมได้ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลอด เก็บเซลล์ที่อุณหภูมิ -80 ํซ.

การเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี Electroporation โดยนำ competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก -80 ํซ. มาละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำพลาสมิด pCAMBIA2300 - CyP gene ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาใส่ลงในหลอด competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ วางไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 – 30 นาที นำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงใน cuvette ขนาด 0.2 ซม. วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 – 30 นาที เคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยใช้สภาวะตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Bio-Rad Gene Pulser) ดังนี้ cuvette gap 0.2 ซม. voltage 2.5 kV, capacitor 25 F และ resistance 480 ก่อน pulse เช็ด cuvette ให้แห้งอย่าให้มีฟองอากาศ หลัง pulse เติมอาหารเหลว YEP ปริมาตร 1 มล. ย้ายส่วนผสมลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ํซ. เขย่าที่ความเร็ว 200 – 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 - 2 ชม. ตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP ปริมาตร 200 ไมโครลิตร spread plate บนอาหารแข็ง YEP -rifampicin (control) และบนอาหารแข็ง YEP - rifampicin - kanamycin เพลทละ 80 ไมโครลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 ํซ. เป็นเวลา 2 - 3 วัน ตรวจสอบการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์ *A tumefaciens* โดยเทคนิค PCR นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CyPXbaI (forward) และ CyPKpnI (reverse) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม 2U Hot Taq Master Mix, 0.5 M primer (forward) 0.5 M primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ pre-denature 95°ซ. 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ denature 94°ซ. 30 วินาที annealing 60°ซ. 30 วินาที extension 72°ซ. 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°ซ. 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°ซ. infinity (α) หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

3.2 การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม (Agrobacterium-mediated gene transfer) ดัดแปลงจากวิธีการของ Horsch และคณะ (1985)

การเตรียมชิ้นส่วนยาสูบเพื่อใช้ในการถ่ายยีน โดยนำเมล็ดยาสูบสายพันธุ์เวอร์จิเนียมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Haiter® Bleach ความเข้มข้น 30% (v/v) เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 3 - 4 ครั้ง จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS

(Murashige and Skoog, 1962) เติม BA 5 M + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 จนเมล็ดงอก ทำการ sub culture เพื่อเพิ่มปริมาณให้มากพอสำหรับใช้ในการถ่ายยีนในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเตรียมเซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ *EHA* 105 ที่มียีน CyP มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2x yeast extract and tryptone (2xYT) (ปริมาตร 1 ล. : bacto-tryptone 16 ก., yeast extract 10 ก., NaCl 10 ก., agar 1.5%, pH 7.5) เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin (50 มก./ล.) บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ. เป็นเวลา 2 - 3 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT - kanamycin ที่อุณหภูมิ 28°ซ. เขย่าด้วยความเร็ว 200 - 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 - 18 ชม. นำมาวัดค่าความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความเข้มข้นที่ OD600 ประมาณ 0.5 - 1.0 ซึ่งเป็น log phase จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ เทลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. นำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทอาหารเหลวในหลอดทิ้ง จากนั้นทำการละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ได้ โดยเติมอาหารเหลว MS + BA 5 M ปริมาตร 1 มล. เตรียมไว้สำหรับใช้ในการถ่ายยีน

การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบ โดยวิธี Leaf Disc Transformation ดัดแปลงจากวิธีการของ Horsch และคณะ (1985) โดยนำเซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ *EHA* 105 ที่มียีน CyP มาเลี้ยงร่วมกับใบยาสูบโดยตัดใบยาสูบให้มีขนาด 0.5 x 0.5 ซม. นำไปจุ่มในอาหารเหลว MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* เจือจาง 1 : 20 เป็นเวลา 1 นาที แล้วผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง Whatman no 1 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS + BA 5 M + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 ในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำใบยาสูบไปเลี้ยงบนอาหาร MS + BA 5 M + carbenicillin 400 มก./ล. + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7 วัน เพื่อทำการฆ่าเซลล์ *A. tumefaciens* หลังจากนั้นเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปอีก 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตรเดิมที่ลดปริมาณ carbenicillin ลงเหลือ 200 มก./ล. และเปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน เพื่อให้ใบยาสูบมีการพัฒนาเจริญเติบโตเป็นยอดอ่อน

หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยย้ายชิ้นส่วนของยอดอ่อนมาเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม kanamycin (200 มก./ล.) + BA 5 M + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ คัดเลือกยอดอ่อนที่รอดชีวิต ย้ายลงในอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณยอด เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ โดยตัดแยกยอดอ่อนที่เจริญเติบโตไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 5 M + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 เพื่อชักนำให้เกิดราก และนำต้นที่ได้จากการถ่ายยีนมาตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอเนื้อเยื่อต้นอ่อนยาสูบที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกในอาหารคัดเลือก จากส่วนใบ ยอด ลำต้นหรือราก ประมาณ 0.1 - 0.3 ก. โดยใช้ Genomic DNA Extraction Kit (ตามข้อ 1.2) นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและวัดค่าความเข้มข้น OD และนำมาเจือจางด้วย TE buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม จากนั้นทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนคือ CyPXbaI (forward) และ CyPKpnI (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวคเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) นำผลผลิต PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีน CyP จากข้าวฟ่าง

สังเคราะห์ยีน CyP ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากข้าวฟ่าง โดยการทำปฏิกิริยา PCR (Figure 1a) พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (Figure 1b) คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบยีนที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,062 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ของยีน CyP ได้จำนวน 172 amino acid อยู่ภายใน Open reading frame ระหว่างตำแหน่งของลำดับดับเบสที่ 131 – 649 และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง polyadenylation signal AATAA motif อยู่ในส่วนของ 3'UTR ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมพบว่ายีน CyP ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวฟ่างมีความเหมือนอย่างสูงกับตำแหน่ง Trp128 (W128) ของยีน CyP ทั้งหมดที่พบในยูคาริโอต (Liu *et al*., 1991) และลำดับกรดอะมิโน KSGKPLH ตำแหน่งที่ 48 - 54 จะมีความเฉพาะเจาะจงกับยีน CyP ในส่วนของ cytoplasmic ที่พบได้ในพืชหลายชนิด (Lippuner *et al*., 1994) (Figure 2) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล genbank พบว่ายีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน CyP ที่พบในอ้อย (GQ246462.1) และข้าวโพด (X68678.1) โดยมีค่าความเหมือน (% max identity) เท่ากับ 89% และ 82%

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม EMBL-EBI database พบว่ายีน CyP ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน (Figure 3) ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (open reading frame : ORF) มีขนาด 519 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (5' Untranslated region หรือ 5'UTR) มีขนาดเท่ากับ 130 คู่เบส และทางด้านปลาย 3' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (3' Untranslated

Table 1. Primer name base sequence, size of CyP gene, melting temperature (Tm) and GC content of designing specific primers from genbank on www.ncbi.nim.nih.gov/

Primer name	Base sequence (5' → 3')	Size (bp)	Tm (°C)	GC content (%)
CyP4 (forward)	CCG GCT ATT TTA CCG CAC CMG TYC TC	26	67.7 (60)	53.8
CyP4 (reverse)	GGG CKA TCC ATG CTT GGC AGT TCA C	25	68.7 (60)	58.0
CyPXbaI (forward)	CAC TCT AGA ATG GCG AAC CCG CGC GTC TTC TTC GAC	36	74.9 (60)	58.3
CyPKpnI (reverse)	CAC GGT ACC CTA GCT GAG CTG GCC GCA GTC AGC ATC	37	78.0 (60)	64.9
NOS (forward)	GTT TGA ACG ATC GGG GAA ATT CGA GCT C	28	67.5 (60)	50.0
35SCaMV (reverse)	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30	70.1 (60)	53.3

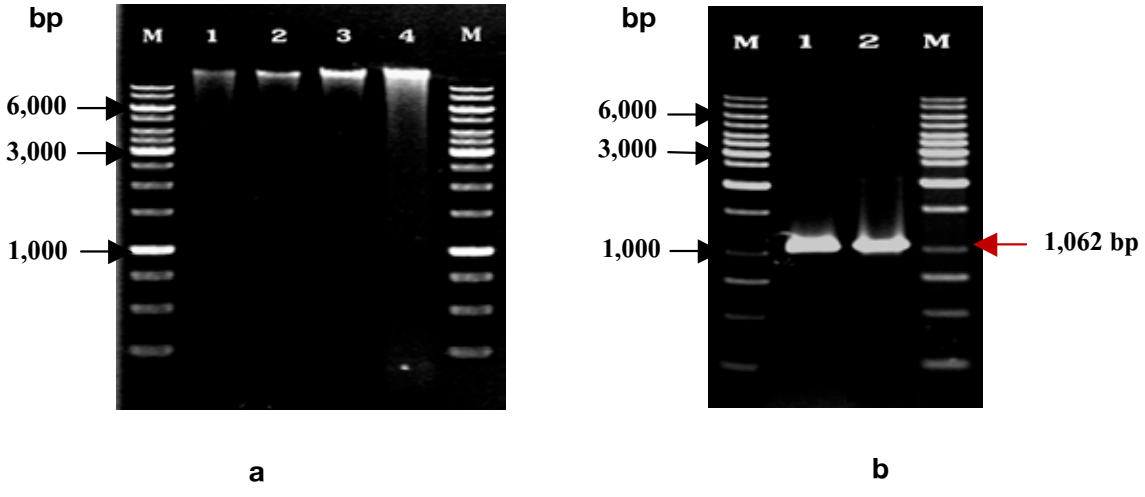


Figure 1. a. Genomic DNA isolated from two sorghum cultivars on 1% agarose gel; Lane M = 1 kb DNA ladder (fermentas), lane 1-2 = genomic DNA from sorghum (UT 1), lane 3-4 = genomic DNA from sorghum (SPR 60)

b. PCR analysis of cyclophilin gene from 2 cultivars of sorghum using specific primer CyP4 (forward) and CyP4 (reverse). lane M = 1 kb DNA ladder (fermentas), lane 1 = PCR product from sorghum (UT 1), lane 2 = PCR product from sorghum (SPR 60)

```
   1  tccggctattttaccgcaccagttctccctccaccagatcagatcagatcacagaacgca
  61  acagccgaaggaaaaatttccccccaaccaaaaaccctctctcccaaaccctagctacct
 121  tcggatcccgatggcgaacccgcgcgtcttcttcgacatgacggtcggcggcgcggcggc
                M  A  N  P  R  V  F  F  D  M  T  V  G  G  A  A  A
 181  ggggcggatcgtgatggagctgtacgcgaacgaggtgcccaagacggccgagaacttccg
        G  R  I  V  M  E  L  Y  A  N  E  V  P  K  T  A  E  N  F  R
 241  cgcgctgtgcacgggcgagaagggcgtggggaagtccgggaagccgctccactacaaggg
        A  L  C  T  G  E  K  G  V  G  K  S  G  K  P  L  H  Y  K  G
 301  ctccaccttccaccgcgtcatcccgcagttcatgtgccagggcggcgacttcacccgggg
        S  T  F  H  R  V  I  P  Q  F  M  C  Q  G  G  D  F  T  R  G
 361  caacgggaccggaggcgagtccatctacggcgacaagttccccgacgagaagttcgtgcg
        N  G  T  G  G  E  S  I  Y  G  D  K  F  P  D  E  K  F  V  R
 421  caaccacacggcccccggggtgctctccatggccaacgccgggcccaacaccaacggctc
        N  H  T  A  P  G  V  L  S  M  A  N  A  G  P  N  T  N  G  S
 481  ccagttcttcatctgcaccgtcgatacccccctggctcgacggcaagcacgtcgtctttgg
        Q  F  F  I  C  T  V  D  T  P  W  L  D  G  K  H  V  V  F  G
 541  ccaggtcgtcgagggcatggacgtcgtcaaggccatcgagaaggtcggatcccgcagcgg
        Q  V  V  E  G  M  D  V  V  K  A  I  E  K  V  G  S  R  S  G
 601  atccacctccaaggaggtcaagatcgctgactgcggccagctcagctagatcgttggtct
        S  T  S  K  E  V  K  I  A  D  C  G  Q  L  S  *
 661  ggtctgcccgtccgccctccctcccgtcatcgtccactccgcctgcgtcccgtcccgttt
 721  ccggtttgcttcgatctgaataagatgatggtgatctgagtggtggtctgagttgagtcg
 781  tttatttatcatgtgcgtctgtctgtgtcgctcgcggtttaatctagcggtgtaggtgtg
 841  gatctccgaatcccatggcgcctctgcttacttcgtgtttcatcaccagttatatgttat
 901  gagatccaggataatgcattaatgctatgagaactgagattcggtttcatgcttcttgtt
 961  ccatgtgccatgtcatgtgcgtcttgttccattgcaagttcggaccccaaaatgattttg
1021  attgtcaatatgttaatgtgaactgccaagcatggatcgccc
```

Figure 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of cyclophilin gene, the start (ATG) and stop (TAG) codons are highlighted; the underline shows the polyadenylation signal AATAA, the blue bold shows the conservative sequence of the plant cytoplasmic cyclophilin and the red bold shows conservative amino acid of cyclophilin in all kinds of organisms

region หรือ 3'UTR) มีขนาดเท่ากับ 143 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ยีน CyP ที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความสมบูรณ์จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ submit ลงในฐานข้อมูลของ genbank accession no EU722309.

เมื่อนำข้อมูลยีน CyP จากข้าวฟ่างในส่วนที่มีการแสดงออกมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน CyP ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล genbank www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi พบว่ายีน CyP ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวฟ่างมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยวคือ ข้าวฟ่างอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) และข้าวโพด (*Zea mays* L.) (Figure 4)

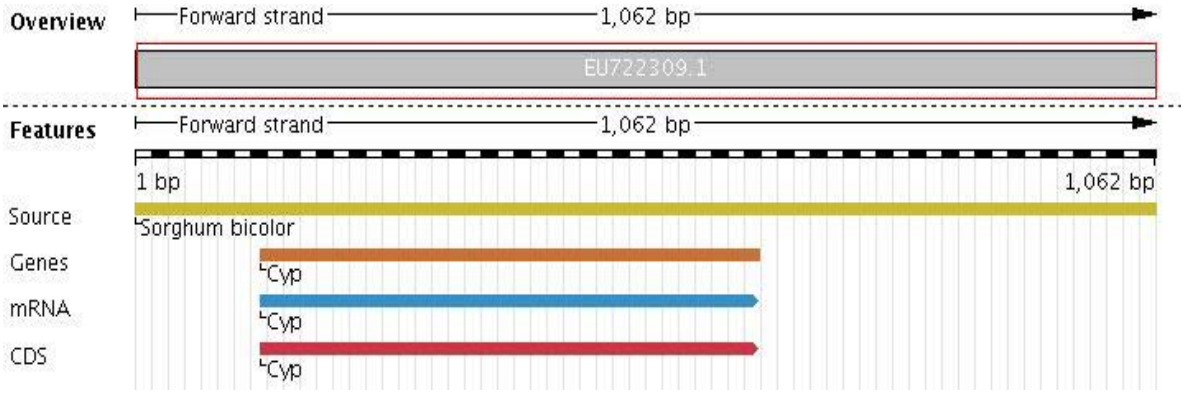


Figure 3. Structure of cyclophilin gene analyzed by EMBL-EBI database; the 1,062 bp fragment of CyP gene is shown above (yellow bar), coding sequence (CDS) of this gene is 519 bp (red arrow).

2. การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Plant Expresstion Vector และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

นำชิ้นยีน CyP ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 519 คู่เบส เชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) (Figure 5a) ขนาดประมาณ 9,640 คู่เบส ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI (Figure 5b) โดยที่ pCAMBIA2300 ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน neomycin phospho transferase (nptII) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP ซึ่งมี 2 วิธีด้วยกัน วิธีแรกคือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *KpnI* พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 1 และ 9 กิโลเบส (Figure 6a.) และวิธีที่สองคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส (Figure 6b) โดยโครงสร้างของ พลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ (pCAMBIA2300 – CyP) จะมีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส (Figure 7)

3. การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ และการคัดเลือกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน

การถ่ายยีน CyP ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA2300 เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* (L.)) โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ *EHA105* ภายหลังการถ่ายยีนต้องกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบออกจากพืชให้หมด โดยการใช้สารปฏิชีวนะชนิด

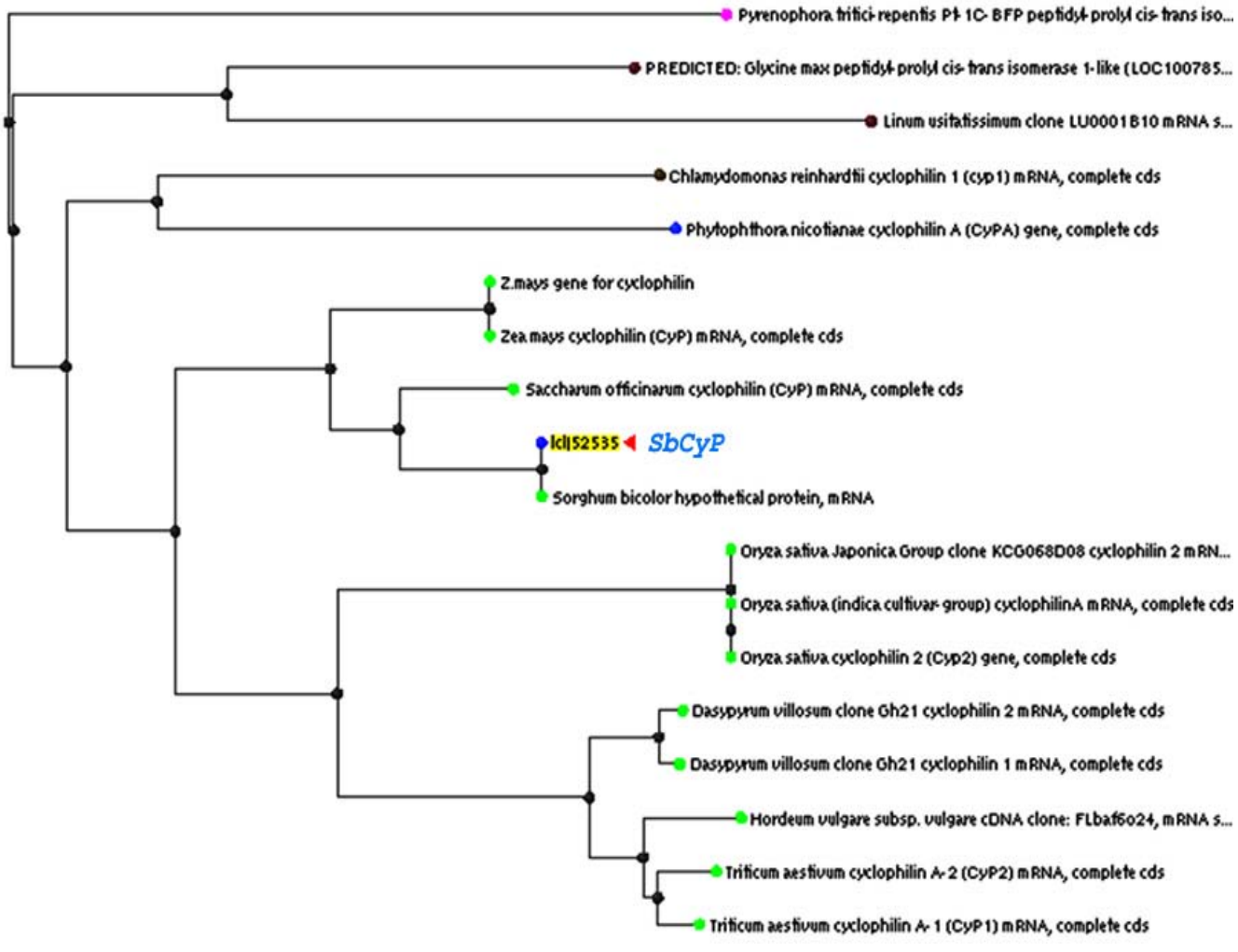


Figure 4. Phylogenetic tree of cyclophilin gene showing the relationship between the *Sorghum biocolor* and different plant species

carbenicillin 400 มก./ล. ซึ่งปริมาณที่ใช้มีความเหมาะสมสามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน CyP บนอาหารคัดเลือก สูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 200 มก./ล. + BA 5 M + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกยอดอ่อนที่รอดชีวิต ย้ายลงในอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณยอด เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ทำการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ พบว่าต้นยาสูบที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก MS – kanamycin มีจำนวน 25 ต้น โดยคัดเลือกจากยอดอ่อนที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไปได้ (Figure 8) และยอดอ่อนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่สามารถเจริญได้

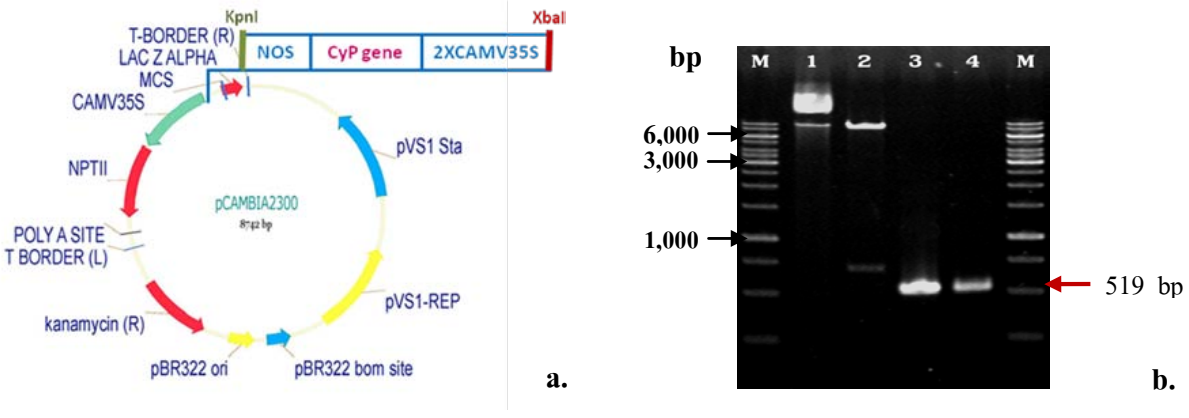


Figure 5. a. Map of plant expression vector (pCAMBIA2300) and position of the cyclophilin (CyP) gene in plant expression vector

b. DNA of a plant expression vector (pCAMBIA 2300) and a cyclophilin (CyP) gene digested with specific enzyme XbaI and KpnI; lane M = 1 kb ladder (fermentas), lane 1 = plasmid DNA of pCAMBIA2300, lane 2 = plasmid DNA of pCAMBIA2300 digested with specific enzyme XbaI and KpnI, lane 3 = PCR product CyP gene, lane 4 = PCR product CyP gene digested with specific enzyme XbaI and KpnI

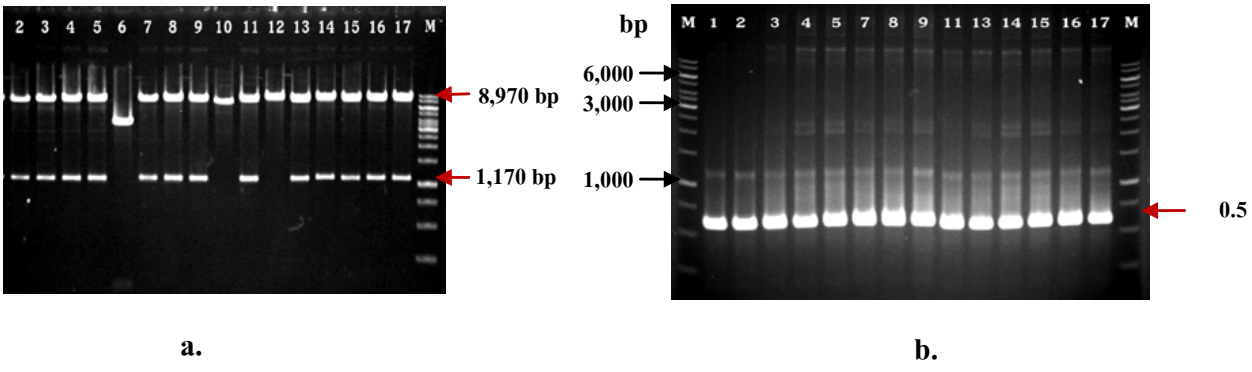


Figure 6. a. Pattern of DNA derived from recombinant plasmid DNA (pCAMBIA2300 – CyP) digested with specific enzyme *HindIII* and *KpnI*. lane M = 1 kb ladder (fermentas), lane 1-17 = pCAMBIA2300 – CyP clone 1 – 17

b. PCR analysis of plasmid DNA (pCAMBIA2300 – CyP) using specific primer NOS (forward) and 35SCaMV (reverse), lane M = 1 kb ladder (fermentas), lane 1-14 = pCAMBIA2300 – CyP clone 1-5, 7-9, 11 และ 13-17

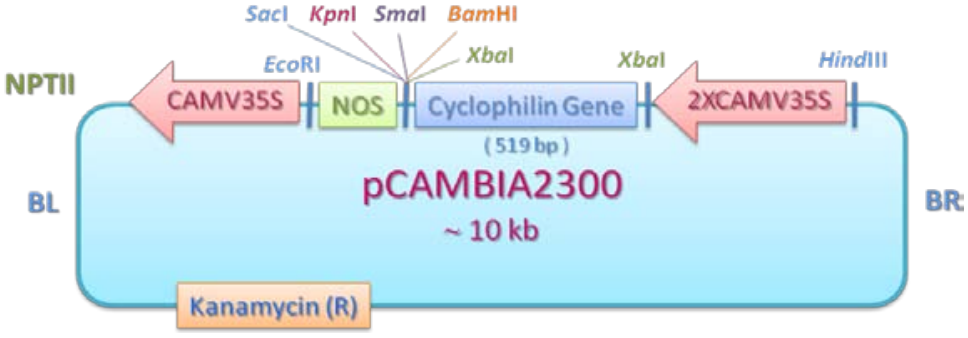


Figure 7. Structure of plasmid construct pCAMBIA2300 – CyP

บนอาหารคัดเลือก หรือเรียกว่า ต้น escape นั่นเอง (Figure 8b) สารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมาย (selectable marker gene) ที่ใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยถ่ายฝากยีนเข้าไปในจีโนมพืชพร้อมกับยีนเป้าหมาย ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin จะไม่สามารถทำอันตรายแก่เนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับยีนจะตายในอาหารคัดเลือก (Miki and McHugh, 2004) งานวิจัยนี้พบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีนสามารถพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยสามารถอยู่รอดบนอาหารคัดเลือก kanamycin ที่ความเข้มข้นในระดับค่อนข้างสูงคือ 200 มก./ล. ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากยีน CyP ที่อยู่ในพลาสมิดสายผสมที่มียีน nptII สอดแทรกอยู่ในจีโนมของยาสูบด้วย

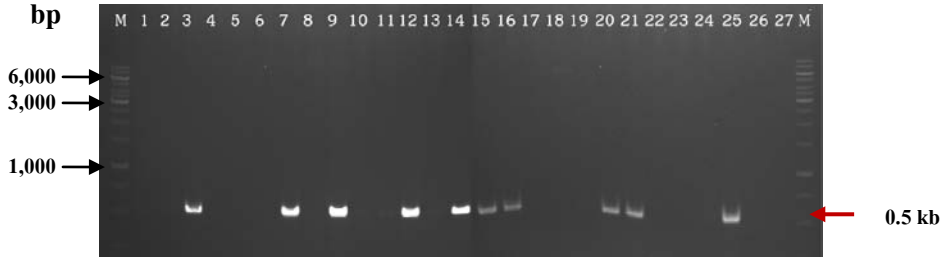
4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในยาสูบโดยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP จากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน คือ CyPXbaI (forward) และ CyPKpnI (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวคเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่ามีต้นยาสูบจำนวน 10 ต้น ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับยีนที่ได้สอดแทรกเข้าไป

a b

Figure 8. a. Transformed tobacco plant containing cyclophilin gene cultured on MS media supplemented with 200 mg/l

b. Non – transformed tobacco plant cultured on the same media as a.



a.

b.

Figure 9. a. PCR analysis of tobacco plant using specific primer CyPXbaI (forward) and CyPKpnI (reverse)

b. PCR analysis of tobacco plant using specific primer NOS (forward) and 35sCaMV (reverse), lane M = 1 kb ladder (fermentas), lane 1-2 = no. 1 – 2 control (no gene transfer had been performed), lane 3-27 = no. 3 – 27 (transgenic model plant).

ในจีโนมของยาสูบ ในขณะที่ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว (Figures 9a, 9b)

สำหรับงานวิจัยที่ได้ศึกษาในครั้งนี้สามารถต่อยอดเพิ่มเติมได้โดยนำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP ไปตรวจสอบการปรากฏของชุดยีนด้วยเทคนิค southern blotting จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน และศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม ที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ซึ่งยีน CyP ที่พัฒนาได้อยู่ในรูปของพลาสมิดสายผสม ที่มีความสมบูรณ์สามารถนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชที่ต้องการเพิ่มลักษณะทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เพื่อช่วยในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

การโคลนยีน CyP จากจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่างพันธุ์อู่ทอง 1 และสุพรรณบุรี 60 พบว่า ยีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,062 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่ายีนที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) จำนวน 519 คู่

เบส สามารถแปลรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ของยีน CyP จำนวน 172 amino acid และยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน CyP ที่พบในอ้อยและข้าวโพด โดยมีค่า % max identity เท่ากับ 89% และ 82% ตามลำดับ

การสร้างพลาสมิดสายผสม โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS เมื่อตรวจสอบผลการปรากฏของยีนดังกล่าว โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเทคนิค PCR พบว่าได้พลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ pCAMBIA2300 – CyP มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส จำนวน 14 โคลน

การถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 - CyP เข้าสู่ใบยาสูบ โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม สามารถคัดเลือกต้นยาสูบบนอาหารคัดเลือกและอาหารชักนำให้เกิดต้นที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบต้นยาสูบที่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไปได้จำนวน 25 ต้น

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน CyP ในยาสูบ โดยใช้เทคนิค PCR พบต้นยาสูบแปลงพันธุ์ที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสมทั้งหมด 10 ต้น คิดเป็นประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้ร้อยละ 40

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวฟ่าง ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา และอนุเคราะห์ plant expression vector (pCAMBIA2300) สำหรับใช้ในการทดลองวิจัย ขอขอบคุณ คุณสุทวัฒน์ สินธีรโรจน์ และคุณขวัญจิต ชั้นปั้นแตง ผู้ช่วยนักวิจัย สำหรับความช่วยเหลืองานวิจัยด้านต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

จารุจินต์ นภีตะภัฏ, 2554. *เอลนินโญ/ลานินญา.* http:// www.tistr.or.th/t/publication/page__area__show__ bc.asp?i1=86&i2=6. 12/12/ 2554.

นิรนาม, 2554. *ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร.* สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. แหล่งที่มา : http:// www.oae.go.th/main.php?filename=agri__productio 12/12/ 2554.

Gasser, C.S., D.A. Gunning, K.A. Budelier and S.M. Brown. 1990. Structure and expression of cytosolic cyclophilin peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher-plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli. Proc. Nat.l Acad. Sci.* 87: 9519 – 9523.

Godoy, A.V., A.S. Lazzaro, C.A. Casalongue and B. San Segundo. 2000. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. *Plant Sci.* 152: 123 – 124.

Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into *plants. Sci.* 227 : 1229 – 1231.

Kong, H.Y., S.C. Lee and B.K. Hwang. 2001. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 59: 189 – 199.

Lippuner, V., I.T. Chou, S.V. Scott, W.F. Ettinger, S.M. Theg and C.S. Gasser. 1994. Cloning and characterisation of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana. J Biol Chem.* 269 : 7863–7868.

Liu, J., C.M. Chen and C.T. Walsh. 1991. Human and *Escherichia coli* cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin a correlates with a specific tryptophan residue. *Biochem.* 30 : 2306–2310.

Luan, S., M.W. Albers and S.L. Schreiber. 1994. Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher-plant. *Proc. National Acad. Sci.* 91: 984 – 988.

Marivet, J., P. Frendo and G. Burkard. 1992. Effects of abiotic stresses on cyclophilin gene-expression in maize and bean and sequence analysis of cyclophilin cDNA. *Plant Sci.* 84: 171-178.

Marivet, J., M. Margispinheiro, P. Frendo and G. Burkard. 1994. Bean cyclophilin gene-expression during plant development and stress conditions. *Plant Mol. Biol.* 26: 1181-1189.

Marivet, J., P. Frendo and G. Burkard. 1995. DNA-sequence analysis of a cyclophilin gene from maize-developmental expression and regulation by salicylic acid. *Mol. Gen. Genet.* 247 : 222-228.

Miki, B and S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. of Biol.* 107 : 193 – 232.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*. 15 : 473 – 497.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 545 p.

Sharma, S.D. and P. Singh. 2003. Effect of water stress on expression of a 20 kD cyclophilin-like protein in drought susceptible and tolerant cultivars of Sorghum. *J. Plant Biochem Biol.* 12 : 77 – 80.

Walkerpeach, C. R. and J. Velten. 1994. Agrobacterium-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems *In: Plant Molecular Biology Manual,* 2nd edn. S. B. *Gelvin and R. A. Schilperoort (eds).* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. B1: 1-19.