

การถ่ายฝากยีนสังเคราะห์ในรูปอินทรอนแฮร์พิน RNAi เวกเตอร์ของยีน *ERD15* เข้าสู่ต้นยาสูบ  
Transformation of Intron Hairpin RNAi (ihpRNAi vector)  
of *ERD15* Gene into Tobacco

พยุงค์ศักดิ์ รวยอารี<sup>1/</sup> อรุโณทัย ซาววา<sup>1/</sup> ภาณี สว่างศรี<sup>1/</sup> บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ<sup>1/</sup>  
Payungsak Rauyaree<sup>1/</sup> Aroonothai Sawwa<sup>1/</sup> Paranee Sawangsri<sup>1/</sup> Boonruanrat Rueangwised<sup>1/</sup>

Received 12 Dec 2019 /Revised 19 May 2020/Accepted 4 Aug 2020

---

**ABSTRACT**

*ERD15* (Early Responsive to Dehydration 15) is a negative regulator of abscisic acid (ABA) responses which includes rapid activation or response to drought and freeze as well as stomatal closure regulation. It is widely involved in the process of gene transcription and drought tolerance in plants. The objective of this study was to utilize the high-throughput system for making hairpin RNA (hpRNA) constructs of *ERD15* gene fragment using one tube restriction-ligation approach. The cloning of the 609 bp full-length synthetic *ERD15* gene silencing (GenBank accession number MN816266) flanked with *Bsa*I restriction sites at both sense and antisense using the pRNAi-GG (Golden Gate) based on the Golden Gate (GG) cloning had been successfully constructed and named the synthetic gene pRNAi-*ERD15* construct. For *Agrobacterium*-mediated transformation, the PCR analysis results using 35S CaMV (reverse) and Nos (forward) primers showed that twenty four percent (4 out of 17 calluses) were transformed plants. The *ERD15* gene sequence of the transformed tobacco plant when compared with the nucleotide database in GanBank exhibited sequence similarity to that of *ERD15* gene. In conclusion, we succeeded in constructing ihpRNAi plasmid construct of the *ERD15* gene to be used for plant gene transformation with any other tolerant traits in plants.

**Keywords:** *ERD15* gene, gene silencing, ihpRNAi, drought tolerance, intron hairpin RNA vector

---

<sup>1/</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, 85 หมู่ 1 ถนนรังสิต-นครนายก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

<sup>1/</sup> Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, 85 Moo 1 Rangsit-Nakhon Nayok Road, Thanyaburi, Pathumthani, 12110 Thailand

\*Corresponding author, e-mail: payungsak\_r@yahoo.com

## บทคัดย่อ

ยีน *ERD15* (*Early Responsive to Dehydration 15*) เกี่ยวข้องกับการควบคุมการลด (negative regulator) การตอบสนองต่อ ABA (Abscisic acid) การกระตุ้นหรือตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำและความเย็น รวมทั้งควบคุมการปิดเปิดของปากใบ เกี่ยวข้องในกระบวนการถอดรหัสของยีนและความทนแล้งในพืช การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างโครงสร้าง intron-hairpin RNA ของยีน *ERD15* ที่มีอินทรอนคั่นกลางของยีนภายในโครงสร้าง โดยใช้ระบบการโคลนนิ่งแบบ high-throughput ด้วยวิธีการ one-tube restriction-ligation system สำหรับนำไปใช้ถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบ พบว่า การโคลนชิ้นส่วนแบบเต็มสายยีนสังเคราะห์ *ERD15* ขนาด 609 bp (GenBank accession number MN816266) ที่มีจุดตัด *BsaI* ทั้งสองทิศทาง sense และ antisense ด้วยการใช้พลาสมิด pRNAi-GG (Golden Gate) ตามวิธีการโคลนนิ่งแบบโกลเด้นเกต ให้ชื่อว่า โครงสร้างยีนสังเคราะห์ pRNAi-*ERD15* เมื่อวิเคราะห์ผลการถ่ายฝากยีน *ERD15* เข้าต้นพืชยาสูบโดยวิธี *Agrobacterium*-mediated transformation ด้วยวิธีการพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 35S CaMV (reverse) และ Nos (forward) พบว่า ต้นยาสูบจำนวน 4 ต้นจากจำนวน 17 ต้น ได้รับการถ่ายฝากยีน หรือคิดเป็นร้อยละ 24 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *ERD15* ของพืชยาสูบที่ปรากฏในฐานข้อมูล ซึ่งผลสำเร็จในการสร้างโครงสร้างพลาสมิด (ihpRNAi) ของยีน *ERD15* จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการถ่ายฝากยีนในพืชอื่น ๆ เพื่อให้ต้นพืชแสดงลักษณะต่าง ๆ ตามต้องการต่อไปได้

**คำสำคัญ:** *ERD15*, ihpRNAi, ความทนแล้ง, การยับยั้งการแสดงออกของยีน, เวกเตอร์อินทรอน Hairpin RNA

## บทนำ

สภาวะขาดน้ำ เป็นปัญหาทางกายภาพที่สำคัญที่สุดต่อการผลิตพืชที่ทั่วโลกกำลังเผชิญอยู่ หากพืชมีปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง ความต่างศักย์ของน้ำในเซลล์จะลดลง สูญเสียความดันน้ำในเซลล์ปากใบปิดน้อยลง เกิดการสูญเสียน้ำ และทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง ก่อให้เกิดการสูญเสียผลผลิต อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของกระบวนการทางชีวเคมีและเมตาบอลิซึมของน้ำในพืชผิดปกติ (Shinozaki *et al.*, 2007) รวมทั้งการเพิ่มมากขึ้นของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการใช้น้ำของเซลล์ เช่น AP2/ERF, bZIP, WRKY และ MYB, โปรตีนฟอสฟาเตส, โปรตีนไคเนส, LEA, transcription factors, ยีนที่ตอบสนองต่อ JA, GA, SA, ออกซิน และเอธิลีน เป็นต้น (Ding *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016) อีกทั้งยังเป็นอุปสรรคต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชด้วย (Cattivelli *et al.*, 2008; Sun, 2014) การเปลี่ยนแปลงทางด้านกรแสดงออกของยีนเมื่อพืชได้รับความเครียดจากสภาวะขาดน้ำ ได้แก่การแสดงออกของยีน *ERD15* (*Early Responsive to Dehydration 15*) ซึ่งแบ่งการทำงานเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ขาดน้ำ (dehydration) และช่วงระยะเริ่มต้นในการขาดน้ำ (early responsive to dehydration) (Levitt, 1980; Shinozaki *et al.*, 2007) โดยพบว่า ยีน *ERD15* เป็นกลุ่มยีนที่มีความอนุรักษ์ (conserved gene) ในพืชทุกชนิด ในสภาวะขาดน้ำ ยีน *ERD15* จะถูกกระตุ้นให้เกิดการแสดงออก และเกิดการสร้างโปรตีน ERD15 ภายหลังขาดน้ำภายในระยะเวลาอันสั้น (dehydration-induced protein) (Kiyosue *et al.*, 1994) และมีความเชื่อมโยงกับความเครียดจากปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพ (Shao *et al.*, 2014)

จากการศึกษาโปรตีน ERD4 ในวัชพืชสกุลอะราบิโดพซิส (*Arabidopsis thaliana* L.) พบว่า เป็นโปรตีนประเภทที่พบบริเวณเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์ (chloroplastic envelop membrane)

เป็นโดเมนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (Froehlich *et al.*, 2003) ต่อมาจากการวิจัยเพิ่มเติมในอะราบิโดพซิส พบว่า การแสดงออกของยีน *ERD15* สูงขึ้น เป็นสาเหตุให้เกิดการตอบสนองของวิถีทนทานต่อสภาวะขาดน้ำที่อาศัย ABA (Abscisic acid and Salicylic acid (SA)-dependent pathway) และเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ ABA ที่ลดลง ทำให้พืชสกุลอะราบิโดพซิสที่ได้รับการถ่ายฝากยีนมีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำลดลง และไม่สามารถที่จะเพิ่มความทนทานต่อสภาวะเย็นจัดได้ ในทางตรงกันข้าม การสูญเสียการทำงานของ *ERD15* อันเนื่องมาจากภาวะการยับยั้งการแสดงออกของยีน (gene silencing) ทำให้เกิดภาวะ Hypersensitivity ต่อ ABA พืชจะแสดงความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ และสภาพเย็นจัดได้ (Kariola *et al.*, 2006)

RNA interference (RNAi) เป็นกระบวนการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นหลังจากการถอดรหัสดีเอ็นเอ โดยมีอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) เป็นตัวชักนำ อาร์เอ็นเอสายคู่นี้จะมีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบส mRNA เป้าหมายทำให้เกิดการทำลาย mRNA นั้น RNA interference เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาวิเคราะห์หน้าที่การทำงานของยีนที่สนใจ (Veerakorn, 2007) โดย Yan *et al.* (2012) ประสบความสำเร็จในการถ่ายฝากยีน pRNAi+PCB, pRNAi+GFP และ pRNAi+PCB และทำการถ่ายโครงสร้าง RNAi เข้าสู่มันฝรั่งโดยวิธีอะโกรแบคทีเรีย ซึ่งสามารถให้ต้นมันฝรั่งที่ได้รับการถ่ายที่ 1,500, 1,000 และ 1,000 ต้น ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า โครงสร้างพลาสมิดนี้ มีประสิทธิภาพสูงในการนำไปใช้ในการถ่ายฝากยีน

การนำเทคโนโลยีการยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยใช้ RNAi ถือเป็น “reverse genetics” ที่ใช้ในการ knockdown การแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ใช้ในพืช เช่นเดียวกันกับในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งเน้นการนำ RNAi ไปเป็น

เครื่องมือในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่จำเพาะ หรือตำแหน่ง promoters ของยีนนั้น ๆ โดยอาศัยการทำงานของชิ้นส่วน double strand RNA (dsRNA) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการต่าง ๆ แล้ว จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของ messenger RNA (mRNA) ทำให้ยีนนั้น ๆ ถูกยับยั้งและไม่แสดงออก เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้ลักษณะใหม่ ๆ ที่ต้องการซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นหลัง (Wang *et al.*, 2018) นอกจากนี้ การสร้างอินทรอนแฮร์พินอาร์เอ็นเอ (hairpin RNA) ทั้งแบบ sense และ antisense RNA ให้อยู่ใน promoter เดียวกันโดยมี intron คั่นกลางระหว่างลำดับ sense และ antisense จะเกิดการสร้างเป็น hpRNA หลังจากผ่านกระบวนการถอดรหัส ซึ่งวิธีการใหม่นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในพืชได้ดีกว่า dsRNA โดยจะให้ผล 80-100% (Mallory *et al.*, 2001) ซึ่งหากสร้างเวกเตอร์แบบ ihpRNAi จะลดขั้นตอนและใช้ระยะเวลาการศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของยีนได้รวดเร็วกว่าการใช้วิธีการแบบทั่วไป

เทคนิคการสร้างโครงสร้างแฮร์พินอาร์เอ็นเอที่ประกอบด้วยอินทรอนอยู่ในโครงสร้าง (intron-containing hairpin structure) สามารถนำมาใช้ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนและใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับพืชหลายชนิด Smith *et al.* (2000), William *et al.* (2004) และ Yan *et al.* (2009) ประสบความสำเร็จในการสร้างโครงสร้างแฮร์พินอาร์เอ็นเอที่ประกอบด้วยอินทรอนภายในโครงสร้าง และเมื่อ Li *et al.* (2009) ใช้โครงสร้างดังกล่าวในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *RACK1* ในข้าว พบว่า ข้าวมีความสามารถในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ดียิ่งขึ้น (Li *et al.*, 2009) ต่อมา Yan *et al.* (2012) พัฒนาการโดยเชื่อมต่อยีนและการโคลนนิ่ง แบบ High-throughput เป็นรายงานแรก ซึ่งต่อมานำมาประยุกต์ใช้ในการโคลนนิ่งยีนที่สนใจอื่น ๆ ได้ด้วยเช่นกัน (Yan *et al.*, 2013) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์

ในการสร้างอินทรอนแฮร์พินพลาสไมด์เวคเตอร์แบบ ihpRNAi ของยีน *ERD15* เพื่อใช้ศึกษาการถ่ายฝากโครงสร้างยีนสังเคราะห์ *ERD15* ที่อยู่ในภาวะเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนเข้าสู่ต้นอ่อนยาสูบ ซึ่งเป้าหมายของงานวิจัยสามารถนำโครงสร้างของพลาสไมด์ ihpRNAi มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนต่อการขาดน้ำได้ต่อไปในอนาคต

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. พันธุ์ยาสูบและสายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนีย (*Nicotiana tabacum* 'Virginia Coker') ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 alpha (ThermoFisher Scientific, USA) ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนยีนสังเคราะห์ *ERD15* ที่โคลนในเวคเตอร์ pUC19 (Addgene, USA) แบคทีเรีย ElectroMAX™ DH5 alpha (Invitrogen, USA) ใช้สำหรับเพิ่มจำนวนพลาสไมด์โครงสร้างยีนสังเคราะห์ inhRNAi+ และอะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ ELECTROMAX™ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (ThermoFisher Scientific, USA) สำหรับใช้ในการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ

### 2. การออกแบบและโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีน *ERD15*

การโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีน *ERD15* ด้วยวิธี PCR โดยการออกแบบยีนสังเคราะห์ *ERD15* ของยาสูบ (XP\_009804354.1) ด้วยวิธีการ GeneArt GeneSynthesis (Invitrogen, USA) กำหนดให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบเต็มสายยีนขนาด 584 คู่เบส โดยเพิ่มจุดตัดเอ็นไซม์ *BsaI* ที่ปลาย 5' และ 3' ของยีน *ERD15* และ protective-

bases adapters ทั้งสองด้าน (5'-ACCAGGTCT-CAGGAG-3') และ (5'-ACGATGAGACCTGGT-3') จึงทำให้ได้โครงสร้างยีนสังเคราะห์ที่มีความยาว 609 คู่เบส

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ ได้ดังนี้คือ ไพรเมอร์วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบความถูกต้องของส่วนยีน *ERD15* ได้แก่ ไพรเมอร์ P21 และ P22 และไพรเมอร์ตรวจสอบทิศทางของอินทรอน ได้แก่ P23, P24 และ P25 (Table 1) ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ ขั้นตอน Initial Denaturation 95°C. 30 วินาที จำนวน 1 รอบ, Denaturation 95°C. 30 วินาที, Annealing 65°C. 15 วินาที, Extension 65°C. 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 68°C. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และจบปฏิกิริยาที่ 4°C. (Yan *et al.*, 2012) โคลนชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์เข้าสู่เวคเตอร์ pUC19 (Addgene, USA) และถ่ายฝากเข้าสู่ ELECTROMAX™ DH5α (Invitrogen, USA) เก็บรักษาดีเอ็นเอสังเคราะห์ไว้ในระยะยาวที่อุณหภูมิ - 80°C

### 3. การเชื่อมต่อชิ้นยีน *ERD15* เข้ากับ pRNAi-GG การตรวจสอบทิศทาง และการถ่ายพลาสไมด์โครงสร้างยีนสังเคราะห์เข้าเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

นำยีน *ERD15* เชื่อมต่อเข้าพลาสไมด์ไกลเด็นเกต pRNAi-GG (GenBank accession number JQ085427) ด้วยปฏิกิริยาสมบูรณในหลอดเดียว ซึ่งประกอบด้วยการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และทำการเชื่อมต่อ (one tube restriction-ligation step) ด้วยเอ็นไซม์ T4 DNA ligase พร้อมกัน ทำให้เกิดรีคอมบิแนนต์ ihpRNA องค์ประกอบของเวคเตอร์ pRNAi-GG ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ 35SCaMV, Nos terminator ยีนคัดเลือกกานามัยซิน (kanamycin resistance gene) ใช้เซลล์เจ้าบ้านเป็น *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ตามวิธีการของ Yan *et al.* (2009)

**Table 1** Primers used for recombinants and orientation identifications

Primer Names	Sequence (5' - 3')	Description
P21	accatttacgaacgatagcc	For recombinants identification and sequencing
P22	gtaaacgacggccagtg	For recombinants identification and sequencing
P23	cgaatctcaagcaatcaagc	For recombinants sequencing and intron orientation identification
P24	catttagcttccttagctcc	For recombinants and intron orientation identification
P25	catttgattgattacagttgg	For recombinants and intron orientation identification

Source: Yan *et al.* (2012)

และ Yan *et al.* (2012) ทั้งนี้ การเติมเอนไซม์ T4-DNA ligase เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ SacI ทำให้ยีน *ccdB* ในเวกเตอร์ถูกแทนที่ด้วยยีน *ERD15* ทั้งด้าน sense และ antisense พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยา และมีอินทรอนคั่นกลางระหว่างยีนทั้งทิศทาง sense และ antisense ภายในโครงสร้างบันทึกลำดับเบสสังเคราะห์ที่ได้ในฐานข้อมูล NCBI (MN816266) และบันทึกภาพด้วยกล้องบันทึกภาพ (SONY-DSC-W800 Cyber shots)

#### 4. การถ่ายฝากโครงสร้างของยีน *ERD15* เข้ายาสูบ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404

##### 4.1 ขั้นตอนการถ่ายฝากยีน

นำ *A. tumefaciens* LBA4404 จากอุณหภูมิ -20°C. มาละลายบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที ผสมอะโกรแบคทีเรียขึ้นลงเบา ๆ ด้วยไปเปต ดูดเซลล์อะโกรแบคทีเรีย 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. (วางบนน้ำแข็ง) ที่ประกอบด้วยโครงสร้างพลาสมิดเอ็นเอจากข้อ 3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมดีเอ็นเอและอะโกรแบคทีเรียเบา ๆ ด้วยไปเปต นำส่วนผสมที่ได้วางบนน้ำแข็ง 30 นาที เคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรีย ด้วยวิธี Electroporation โดยใช้สภาวะตามคำแนะนำบริษัทผู้ผลิต (Biorad Gene Pulser) ได้แก่ ในคิวเวตต์ 0.2 ซม. (Electroporation cuvette, 0.2 cm, Invitrogen,

life technology) ที่สภาวะ 25  $\mu$ F, 200 โอมห์ และ 2.5 kV เติมหาอาหารเหลว YEP (bacto-tryptone 10 ก./ล. yeast extract 10 ก./ล. NaCl 5 ก./ล. pH 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 1 มล. ลงในคิวเวตต์ และดูดลงในหลอดทดลองแบบมีฝาปิดขนาด 15 มล. เติมริแฟมพิซิน 100 มก./ล. และกานามัยซิน 50 มก./ล. เลี้ยงเขื่อนานข้ามคืน (ให้ได้ ค่า O.D.<sub>600</sub> ที่ 0.1 บ่มต่อที่ 25°C. นาน 1-2 ชม. (ในสภาพมืด) ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 g นาน 5 นาที อุณหภูมิ 25°C. เจือจางด้วย infiltration buffer (NAA 0.1 มก./ล. +น้ำตาลซูโครส 3% pH 5.7 +100 ไมโครโมลาร์ อะซีโตไซรีนไกล) เขย่าหลอดที่ 200 รอบ/นาที นาน 3 ชม. ตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C. นาน 1 นาที

ห่อเมล็ดยาสูบด้วยผ้าขาวบาง แช่เมล็ดยาสูบในน้ำปลอดเชื้อเป็นเวลา 12 ชม. ล้างเมล็ดด้วย 95% แอลกอฮอล์ นาน 5 นาที เขย่าด้วยมือตามด้วยการล้างด้วย 10% คลอโรกซ์ สองครั้ง ๆ ละ 10 นาที เขย่าด้วยมือ ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เขย่าด้วยมือเบา ๆ จากนั้นทำมาเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม BA 5 โมลาร์ + น้ำตาลซูโครส 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) + gelrite 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปรับพีเอชเท่ากับ 5.7 เพราะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ก่อนนำมาใช้ในการถ่ายฝากยีน

ตัดใบอ่อนยาสูบที่ขนาด 50 ตร.มม. มาใช้ในการถ่ายฝากยีน โดยเขย่าชิ้นส่วนใบร่วมกับสารแขวนลอยเชื้อ (co-cultivation) บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที นาน 60 นาที ในสภาพมืด นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการปลูกเชื้อไปวางลงบนกระดาษซับ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสารอะซิโตไซริงโณน (acetosyringone) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28°C. นาน 5 วัน หลังจากนั้น นำชิ้นส่วนพืชไปล้างด้วยสารละลาย MS ที่เติมซีโฟแทกซิม (cefotaxime) ความเข้มข้น 100 มก./ล. เพื่อขจัดเซลล์อะโกรแบคทีเรีย เพราะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชต่อในอาหารแข็ง MS สภาพมีแสง 16 ชม./วัน (8 ชม. กลางคืน) ที่อุณหภูมิ 28°C. นาน 5 สัปดาห์ สังเกตการเกิดแคลลัสและเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ สองสัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณยอด จากนั้น นำแคลลัสมาเลี้ยงต่อในอาหารแข็งสูตร MS+NAA 0.1 มก./ล. + น้ำตาลซูโครส 3% + gelrite 0.3% pH 5.7 ที่เติมกานามัยซิน 50 ไมโครกรัม/มล. และไฮโกรมัยซิน 20 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดราก จากนั้น คัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายฝากโครงสร้างยีน inhRNAi+ERD15 โดยแคลลัสที่มีชิ้นยีนจะสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินและไฮโกรมัยซิน เลี้ยงประมาณ 2 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารทุกสัปดาห์ จนพัฒนาเป็นต้นอ่อน

##### 5. การตรวจสอบและคัดเลือกต้นอ่อนยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน ERD15

สกัดดีเอ็นเอจากใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีนตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต (NucleoSpin Plant L Kits, Takara Bio, USA) ตรวจสอบและคัดเลือกต้นอ่อนยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน ERD15 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ ได้แก่ Nos (Forward) (5'-GTTTGAACGATCGGGAAATTCGAGCTC-3') และ 35SCaMV (Reverse) (5'-CATTTGGAGAGGACACGCTGACAAGCTGAC-3') ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยขั้นตอน Initial Denaturation 95°C. 5 นาที จำนวน

1 รอบ, Denaturation 95°C. 3 นาที, Annealing 60°C. 1 นาที, Extension 72°C. 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ Final extension 72°C. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และจบปฏิกิริยาที่ 4°C. นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบบน 1.2% อะกาโรสเจล ต้นอ่อนยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน ERD15 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏประมาณ 600 คู่เบส เทียบกับ 100 bp DNA ladder (Fermentas)

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การออกแบบและโคลนชิ้นดีเอ็นเอของยีน ERD15

ยีนสังเคราะห์ ERD15 มีขนาดส่วนที่มีการแสดงออกของยีน (ORF) 579 คู่เบส เมื่อทำการเติม protective-base adapters ที่ตำแหน่ง 5' และ 3' โครงสร้างยีนมีขนาดนิวคลีโอไทด์ 609 คู่เบส (GenBank accession number MN816266) (Figure 1) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนอย่างสูง (% Max Identities) กับยีน ERD15 ที่พบในยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) (XM\_016582044.1) ที่ 100%, ยาสูบ (*Nicotiana glauca*) (XM\_019372630.1) ที่ 100% , ยาสูบ (*Nicotiana attenuata*) (XM\_009806053.1) ที่ 97.95%, ยาสูบ (*Nicotiana glauca*) (XM\_016582043.1) ที่ 99.72%, ยาสูบ (*Nicotiana glauca*) (XM\_009806052.1) ที่ 99.72%, และยาสูบ (*Nicotiana glauca*) (XM\_009624730.2) ที่ 94.44% เมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นกรดอะมิโน ได้สายโพลีเปปไทด์ขนาด 193 กรดอะมิโน จัดเป็นประเภทไฮโดรฟิลิก เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีนสังเคราะห์ ERD15 มาทำการเปรียบเทียบในฐานข้อมูลพบว่า ใกล้เคียงกับโปรตีน ERD15 ของ *Nicotiana tabacum* (XM\_016582044.1 และ XM\_019372630.1) มากที่สุด ที่ 100%

5'-accaggctcaggag

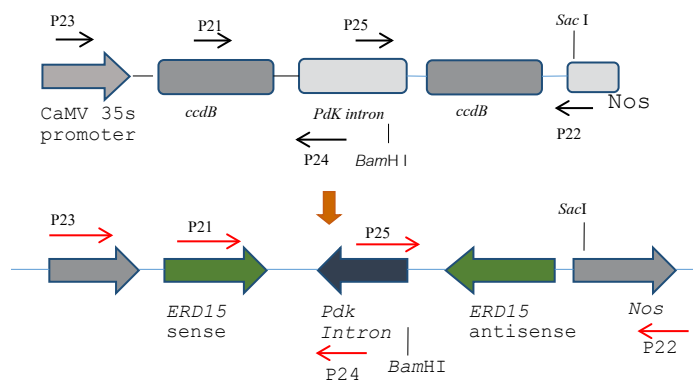
atggcgtagtttcaggaggaaggtcgacactgaatccgaatgcacctctttcatcccgtcttatgtgctcaagtggaggacttttcacccgaatgggtgaatttggg  
gacaacttcgacatgggtccatgattatggacgagggcagcatcaaggagaggaatattggcgtatgatgcttttgggttactgggaatgatgttctgactgcttccc  
aaaatatcgatcttgatgtgatgaagatatttgaacatggaagctcagtttgaagaattctccaatcatctgaaagtgaacaacaaggaatcaagtcacacctat  
gggtatcagtggtatgcttctatttgggtatatactccattatctacaattatagtcgatgatagtgatagagccacaaatttatactaggggattcaaaagtatactgaccaa  
gggttcggaggcactcgttaaggacactgagcatatcaaaaggggcccacaaatctccattgagccacaaagfactatgagaaaccagcaaaagattgtagcccaaa  
gaacagccttcgcccgcacatccagcaacctcgcacgatgagacctgggt-3'

**Figure 1** The 609 bp *ERD15* gene synthesis with *Bsal* restriction enzymes at both 5' and 3' ends. Protective bases-adapters for pRNAi-GG (5'-protective-abases adapters -*Bsal*- ORF (*ERD* open reading frame)-*Bsal*-protective-bases adapters - 3') with restriction site *Bsal* (GGTCTC) is shown

**2. การเชื่อมต่อชิ้นยีน *ERD15* เข้ากับ pRNAi-GG การตรวจสอบทิศทาง และการถ่ายพลาสมิดโครงสร้างยีนสังเคราะห์เข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$**

ยีนสังเคราะห์ *ERD15* ได้แทนที่ยีน *ccdB* (*ccdB* lethal gene) ในทิศทาง sense และ anti-sense ตามแผนภาพ (Figure 2) ที่ประกอบด้วย 35S CaMV Promoter และ Nos terminator

โดยมีอินทรอน *Pdk* คั่นกลางภายในโครงสร้าง การถ่ายฝากโครงสร้างยีน *ERD15* โดยวิธีอินทรอนแฮร์พิน RNAi เข้าสู่พลาสมิดโกลเด้นเกต ประสบความสำเร็จ จากการตรวจสอบโครงสร้างยีนสังเคราะห์ *ERD15* และทิศทางอินทรอนภายในพลาสมิดด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Xba*I และ *Sac*I เปรียบเทียบกับ RNAi loading และ ท่อนยีน *ERD15* ที่เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด



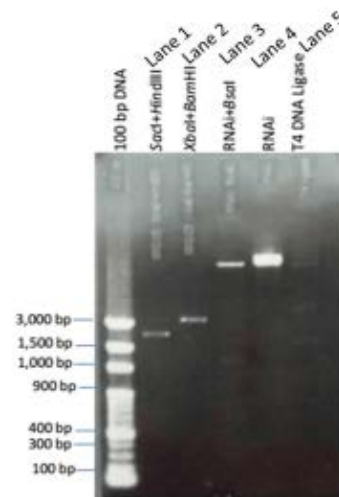
**Figure 2** Schemes of inhRNAi construct with *Pdk* Intron and *ccdB* genes in which hairpin RNA constructs containing *ccdB* genes to be replaced with *ERD15* target genes. The cassette gene under the control of 35S CaMV promoter and Nos terminator at their 5' and 3' respectively. In this case, *ccdB* genes at both sense and antisense within the pRNAi vector are replaced with *ERD15* gene

pRNAi ที่ได้จากปฏิกิริยา T4 DNA ligase บนอะกาโรสเจล พบว่า ดีเอ็นเอ *ERD15* ที่ได้รับการถ่ายฝากเข้าสู่พลาสมิดโกลเด้นเกต ให้ผลเป็นโครงสร้างยีนสังเคราะห์ pRNAi-GG+*ERD15* (inhRNAi+*ERD15*) ขนาดความยาว 609 คู่เบส (Figure 3)

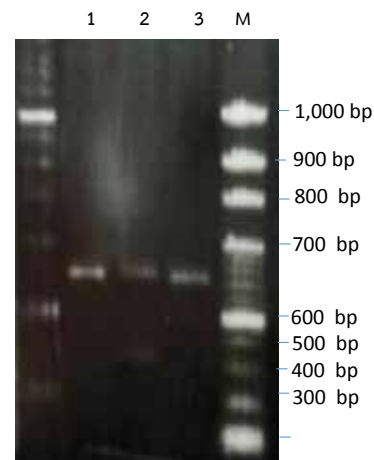
### 3. การตรวจสอบและคัดเลือกต้นอ่อนยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน *ERD15*

ผลจากการใช้ไพรเมอร์ Nos (forward) และ 35S CaMV (reverse) ตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายฝากเวกเตอร์โครงสร้างยีนสังเคราะห์อินทรอนแอส์พินอาร์เอ็นเอของยีน *ERD15* เข้าสู่ต้นอ่อนยาสูบ พบว่า ยาสูบจำนวน 4 ต้น จากทั้งหมด 17 ต้น (24%) ให้ผลผลิตพีซีอาร์เป็นแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 600 คู่เบส เมื่อเทียบกับ 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA) (Figure 4) สอดคล้องกับรายงานของ Shao *et al.* (2014) ที่รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการตัดแยกและศึกษาการแสดงออกของยีน *ERD15* ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะขาดน้ำในมันเทศ ด้วยวิธีการเดียวกัน นอกจากนี้ Ziaf *et al.* (2011) รายงานว่า การถ่ายฝากยีน *SpERD15* เข้าสู่มะเขือเทศ และตรวจสอบด้วย CaMV35S forward และ gene-specific reverse primers พบว่า มีประสิทธิภาพการถ่ายฝากจำนวน 9 ต้น จากจำนวนทั้งหมด 27 ต้น (33.33%) ขณะที่ Alves *et al.* (2011) พบว่า *GmERD15* ในถั่วเหลือง จะเพิ่มการแสดงออกของยีนรายงานผล (reporter gene) เมื่อพืชประสบกับสภาวะขาดน้ำ ภายหลังพืชการได้รับการถ่ายฝากยีน

ข้อดีของการนำยีน *ERD15* โคลนเข้าสู่พลาสมิดโกลเด้นเกตแทนการโคลนนิ่งแบบดั้งเดิม คือสะดวก รวดเร็ว สามารถได้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ในรูปเวกเตอร์ที่สามารถใช้เพิ่มจำนวนได้ดีเอ็นเอมีความถูกต้อง สามารถนำไปสร้าง inhRNAi



**Figure 3** Gene identification of ihpRNAi+*ERD15* construct digested with *SacI*, *HindIII*, *XbaI* and *BamHI* restriction enzymes for their size identifications by gel electrophoresis. (Lane 1; *SacI*-*HindIII*), (Lane 2; *XbaI*-*BamHI*), (Lane 3; full length of *ERD15* cut with *BsaI*), (Lane 4; RNAi loading) and (Lane 5; RNAi+T4 DNA ligase)



**Figure 4** The gel electrophoresis result of transformed plants analysis by PCR. M = 100 bp plus DNA ladder (Fermentas, USA). Lane 1, Lane 2 and Lane 3 showed PCR amplification products with primers specific to *ERD15*



ของยีนสังเคราะห์ *ERD15* แทนวิธีการโคลนนิ่งแบบเดิมที่ต้องใช้การเชื่อมต่อหลายขั้นตอน ประโยชน์อีกประการหนึ่งคือ ยีนสังเคราะห์สามารถเชื่อมต่อเข้ากับตำแหน่งโคลนนิ่งและมีตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะภายในเวกเตอร์ได้สำเร็จสมบูรณ์ในหลอดเดียว งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยครั้งแรกที่ศึกษายีนทนแล้งสังเคราะห์ *ERD15* มาใช้กับการโคลนนิ่งแบบ *inhRNAi* อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการทดสอบการแสดงออกของยีน *ERD15* ในต้นพืชภายหลังจากที่ได้รับการถ่ายฝากที่มีต่อผลกระทบจากสภาวะขาดน้ำต่อไป ซึ่งจะช่วยเพิ่มข้อมูลและประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งได้ต่อไปในอนาคต

### สรุปผลการทดลอง

การสังเคราะห์ยีนทนแล้ง *ERD15* เข้าสู่เวกเตอร์ *inhRNAi-GG* โดยวิธีการ *one tube restriction ligation system* พบว่า ส่วนนิวคลีโอไทด์ของยีนสังเคราะห์มีขนาดแบบเต็มสายยีน 609 คู่เบส ประกอบด้วยกรดอะมิโนเมไทโอนีน (Met) และรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน (TGA) เมื่อนำโครงสร้างพลาสมิดเข้าสู่พลาสมิดโฮสต์ให้ผลบวก 100% แม้ว่าการนำโครงสร้างยีนสังเคราะห์มาใช้ในการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ต้นยาสูบด้วยวิธี *Agrobacterium-mediated transformation* มีประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีนคิดเป็นเพียงร้อยละ 24 (4/17 ต้น) แต่งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการนำเทคนิค *pRNAi-GG* มาใช้ในการสร้างพลาสมิดยีน *ERD15* เพื่อใช้ถ่ายฝากเข้าสู่ต้นอ่อนยาสูบได้ ซึ่งสามารถนำโครงสร้างพลาสมิดที่ได้ไปใช้ในการถ่ายฝากยีนทนแล้ง เข้าสู่ต้นพืชชนิดอื่น ๆ เพื่อศึกษาถึงลักษณะพันธุ์ที่สนใจเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ทั้งนี้ เพื่อช่วยเพิ่มความรู้ความเข้าใจด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความสามารถในการทนแล้งได้ต่อไป

### คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมวิชาการเกษตร ขอขอบคุณ คุณวิภาวรรณ วงศ์สุทธิ นักวิจัย กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลืองานวิจัย การเตรียมสารเคมี และการวิเคราะห์ยีน *ERD15* ในห้องปฏิบัติการ การถ่ายฝากโครงสร้างยีนสังเคราะห์ *ERD15* เข้าสู่เวกเตอร์อินทรอนแฮร์พิน (*inhRNAi*) และดูแลต้นอ่อนยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝาก

### เอกสารอ้างอิง

- Alves, M.S., P. A. B. Reis, S. P. Dadalto, J. A. Q. A. Faria, E.P. B. Fontes, and L.G. Fietto. 2011. A novel transcription factor, *ERD15* (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *J. Biol. Chem.* 286(22): 20020-20030.
- Cattivelli, L., F. Rizza, F-W. Badeck, E. Maz-zucotelli, A.M. Mastrangelo, E. Francia, C. Mare, A. Tondelli and A. Michele Stanca. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Res.* 105(1): 1-14.
- Ding, Y., N. Liu, L. Virilouvet, J-J. Riethoven, M. Fromm and Z. Avramova. 2013. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 13: 229.
- Froehlich, J.E., C. G. Wilkerson, W.K. Ray, R.S. Mc Andrew, K.W. Osteryoung, D.A. Gage and B.S. Phinney. 2003.

- Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* 2(4): 413-425.
- Kariola, T., G. Brader, E. Helenius, J. Li, P. Heino and E.T. Palva. 2006. Early Responsive to Dehydration 15, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 142(4): 1559-1573.
- Kiyosue, T., K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1994. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L. identification of three ERDs as HSP cognate genes. *Plant Mol. Biol.* 25(5): 791-798.
- Kiyosue, T., K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1994. Plant gene register. *ERD15*, a cDNA for a dehydration-induced gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106(4): 1707.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1, Acad. Press, 496 p.
- Li, K.Q., X-Y. Xu and X-S Huang. 2016. Identification of differentially expressed genes related to dehydration resistance in a highly drought-tolerant pear, *Pyrus betulaefolia*, as through RNA-Seq. *PLoS ONE* 11(2): e0149352. doi:10.1371/ journal.pone.0149352.
- Li, D.H., L. Hui, Y.L. Yang, P.P. Zhen and J.S. Liang. 2009. Down-regulated expression of RACK1 gene by RNA interference enhances drought tolerance in rice. *Rice Sci.* 16(1): 14-20.
- Li, Y., K. Wang, -iQ. Lu, J. Du, Z. Wang, D. Wang, B. Sun, and H. Li. 2017. Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing a hairpin RNAi construct of a nematode *Rs-cps* gene exhibit enhanced resistance to *Radopholus similis*. *Sci. Rep.* 7: 13126 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13024-9>.
- Mallory, A.C., L. Ely, T.H. Smith, R. Marathe, R. Anandalakshmi, M. Fagard, H. Vaucheret, G. Pruss, L. Bowman and V.B. Vance. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile silencing signal. *Plant Cell.* 13(3): 571-584
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.
- Smith, N. A., S.P. Singh., M. Wang, P.A. Stoutjesdijk., A.G. Green and P.M. Waterhouse. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature.* 407(6802): 319-320.
- Sun Q., D. Kong, C. Miao, Q. Duan, T. Yang, A. Ye, Z. Di and W. Gong. 2014. Variations in global temperature and precipitation for the period of 1948 to 2010. *Environ. Monit. Assess.* 186(9): 5663–5679.

- Shao, H.H., S.D. Chen, K. Zhang, Q.H. Cao, H. Zhou, Q.Q. Ma, B. He, X.H. Yuan, Y. Wang, Y.H. Chen and B. Yong. 2014. Isolation and expression studies of the *ERD15* gene involved in drought-stressed responses. *Genet. Mol. Res.* 13(4): 10852-10862.
- Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58(2): 221-227.
- Veerakorn, H. 2007. *Reporter Gene Silencing by Production of Hairpin RNA in Tobacco (Nicotiana tabacum L.)* Thesis (M.sc). Chulalongkorn University, 119 P.
- Wang, J., L. Zhang, Y. Cao, C. Qi, S. Li, L. Liu, G. Wang, A. Mao, S. Ren and Y.D. Guo. 2018. CsATAF1 positively regulates drought stress tolerance by an ABA-dependent pathway and by promoting ROS scavenging in cucumber. *Plant Cell Physiol.* 59(5): 930-945.
- Williams, M., G. Clark, K. Sathasivan and A.S. Islam. 2004. RNA interference and its application in crop Improvement. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 14(1): 1-18.
- Yan, P., W. Shen, X. Gao, J. Duan and P. Zhou. 2009. Rapid one-step construction of hairpin RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383(4): 464-468.
- Yan, P., W. Shen, X.Z. Gao, X. Li, P. Zhou and J. Duan. 2012. High-throughput construction of intron-containing hairpin RNA vectors for RNAi in plants. *PLoS ONE.* 7(5): e38186. Doi:10.1371/journal.pone.0038186.
- Yan, P., W. Shen, X. Li and P. Zhou. 2013. Progress in construction of hpRNA vector for plant RNAi (*In Chinese*). *Biotechnol. Bulletin.* 9(1): 7-12.
- Ziaf, K., R. Loukehaich, P. Gong, H. Liu, Q. Han, T. Wang, H. Li and Z. Ye. 2011. A multiple stress-response gene *ERD15* from *Solanum pennellii* confers stress tolerance in Tobacco. *Plant Cell Physiol.* 52(6): 1055-1067.