การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีน *OSB2* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

Cloning and characterization of *OSB2* gene controlling anthocyanin biosynthesis in rice

พูนศรี อินต๊ะ[1] วิศิษฏ์ พงศ์บุรพัฒน์[2] แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[3] วราภรณ์ แสงทอง[1] และ ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์[1]*

Poonsri Inta[1], Wisit Phongburaphat[2], Saengtong Pongjareankit[1], Srimek Chowpongpang[3], Varaporn Sangtong[1] and Chotipa Sakulsingharoj[1]*

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2]สาขาวิชาพืชผัก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[3]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ 10900

[1]Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

[2]Division of Vegetable Technology, Faculty of Agriculture Production, Maejo University, Chiang Mai 50290

[3]Program in Plant Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

**Corresponding author: chotipas@mju.ac.th*

บทคัดย่อ

ยีน *OSB2* เป็นรหัสของ *myc* transcription factor ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว งานวิจัยนี้ได้ค้นหายีน *OSB2* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ coding sequence (cds) ของยีน *OSB2* โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์มาจาก mRNA ที่สกัดจากใบอ่อนและเมล็ดอ่อนของข้าวพันธุ์ลืมผัว หอมนิล และก่ำ พบยีน *OSB2* ที่มี open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp ซึ่งมีความเหมือนกับยีน *OSB2* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB021080) ถึง 99 % และพบยีน *OSB2* ที่ประกอบด้วย ORF ขนาด 1101 bp ซึ่งมีบริเวณ exon ที่ 2 ขาดหายไป (255 คู่เบส) ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของ ORFs ขนาด 1356 bp และ 1101 bp พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 451 และ 366 หน่วย ตามลำดับ ซึ่งมีความคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. BAB64302) ถึง 99 % จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนแสดงว่า ยีน *OSB2* ที่โคลนได้ในงานวิจัยนี้อาจมี 2 รูปแบบ หรืออาจมียีนรูปแบบเดียวในจีโนมข้าว แต่เกิดการเลือกตัดอินทรอน (alternative splicing) ในงานวิจัยต่อไปจะศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนที่โคลนได้ เพื่อให้เข้าใจการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

ABSTRACT

The *OSB2* gene encodes *myc* transcription factor which regulates expression of several structural genes involved with anthocyanin biosynthesis in rice. In this study, the complete coding sequences (cds) of *OSB2*

genes were isolated from young leaves and developing seeds of rice by RT-PCR. Nucleotide sequencing analysis revealed that all 3 black rice varieties, Lerm-Poa, Hom-nin and Khum had a single open reading frame (ORF) of 1356 bp which were 99 % identical to the *OSB2* gene reported in GenBank (accession no. AB021080). These rice varieties also had an *OSB2* gene containing a single ORF of 1101 bp with 99 % identity with the 1356 bp fragments except for the deletion of the 2nd exon (255 bp deletion). The deduced amino acid sequences of the 1356 and the 1101 bp ORFs are composed of 451 and 366 amino acid residues, respectively, which showed 99 % similarity to those of OSB2 (accession no. BAB64302). The results suggested that the *OSB2* genes from this study may have 2 forms. Alternatively, the 1356 bp and 1101 bp ORFs may be due to alternative splicing of mRNA transcribed from a single *OSB2* gene in rice genomes of these black rice varieties. The cloned *OSB2* genes will be further analyzed for structure and gene functions to understand the regulation of anthocyanin biosynthesis in colored rice.

คำสำคัญ: ยีน *OSB2*, ข้าว, แอนโทไซยานิน
Keyword: *OSB2* gene, rice, anthocyanin

บทนำ

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุในดอกไม้และผลไม้ เพื่อดึงดูดให้แมลงช่วยในการผสมเกสร ปกป้องผักและผลไม้จากการทำลายของรังสี UV-B และเป็น anti-oxidant ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ในการป้องกันและลดความเสี่ยง ต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันและโรคมะเร็ง (Geekiyanage *et al*., 2007)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในข้าวคือ ยีนควบคุม (regulatory gene) และยีนโครงสร้าง (structural gene) โดยยีนควบคุมเป็นรหัสของ transcription factor ที่สำคัญ 2 กลุ่มคือ MYB transcription factor และ MYC transcription factor ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ส่วนยีนโครงสร้างเป็นรหัสของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในpathway การสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Geekiyanage *et al*., 2007) ยีนควบคุมที่สำคัญได้แก่ ยีนในตำแหน่ง *Puple leaf (Pl)* ซึ่งคล้ายกับกลุ่มของ *R/B* loci ของข้าวโพด และอยู่ในกลุ่มของ MYC transcription factor (basic helix-loop-helix (bHLH) protein) พบว่า ตำแหน่งนี้เป็นที่ตั้งของยีน *OSB1* และ *OSB2* (Sakamoto *et al*., 2001) โดย *OSB2* มีรายงานว่าเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าไม่แสดงออกในข้าว *japonica* ที่มีเมล็ดขาว (Shih *et al*., 2008) ส่วนตำแหน่ง *C* locus ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 เป็นตำแหน่งของยีน *OSC1* ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ R2R3-Myb transcription factors (Saitoh *et al*., 2004)

อย่างไรก็ตามกลไกของยีนในการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน โดยการทำงานของยีนควบคุมและยีนโครงสร้างในข้าวยังไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จะได้โคลนยีนและศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เพื่อทำให้เข้าใจกลไกการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากใบและเมล็ดข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาคือ ข้าวเมล็ดขาว ได้แก่ พันธุ์ Kitaake กข6 และหอมมะลิ 105 ข้าวเมล็ดแดง ได้แก่ พันธุ์หอมมะลิแดง และข้าวเมล็ด

ดำ ได้แก่ พันธุ์ลืมผัว หอมนิล และก่ำ โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนและเมล็ดข้าวในระยะน้ำนมด้วย TRIzol reagent (invitrogen, USA)

การโคลนยีน *OSB2* โดยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ oligo (dT) ทำตามขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) จากนั้นนำ cDNA ไปเป็นแม่พิมพ์ในการโคลนยีน *OSB2* ในข้าวพันธุ์ต่างๆ โดยเทคนิค RT-PCR

การเชื่อมต่อชิ้นยีน *OSB2* กับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม

นำยีน *OSB2* ที่โคลนได้มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสม และส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE (Malaysia)

กาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *OSB2*

เปรียบเทียบลำดับเบสและลำดับของกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้ กับยีนที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม ClustalX 2.1 และ GeneDoc และวิเคราะห์ motif ของลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม motif scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การค้นหาและโคลนยีนบริเวณ coding sequence ของยีน *OSB2* ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการค้นหายีน *OSB2* ที่เป็นบริเวณ complete coding sequence (cds) โดยใช้ cDNA เป็นแม่พิมพ์ ด้วยวิธี RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1100 และ 1300 bp เฉพาะในข้าวสีทั้งใบและเมล็ด ได้แก่ ข้าวพันธุ์ลืมผัว หอมนิล และก่ำ (Figure 1) เมื่อนำลำดับเบสของยีนขนาด 1300 bp จากข้าวพันธุ์ต่างๆ มาเปรียบเทียบกับยีน *OSB2* จากข้าว nearly isogenic Pl^{w} Taichung 65 ที่เป็นข้าวสีในฐานข้อมูล (accession no. AB021080) พบว่าเป็นบริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp และมีลำดับเบสเหมือนกัน 99% โดยมีลำดับเบสต่างกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น (Figure 2) ส่วนการเปรียบเทียบยีน 1100 bp กับลำดับเบสของจีโนมิกดีเอ็นเอของยีน *OSB2* ของข้าว Japonica ในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AL606682) พบว่า เกิดลำดับเบสหายไป 255 bp ซึ่งเป็นส่วนของบริเวณเอกซอนที่ 2 (Figure 2)

ลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ที่ได้จากการแปลรหัส พบว่า ได้ลำดับกรดอะมิโนขนาด 451 และ 366 หน่วย ของยีนขนาด 1356 และ 1101 bp ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้ จากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ กับลำดับกรดอะมิโนของยีน *OSB2* ใน GenBank

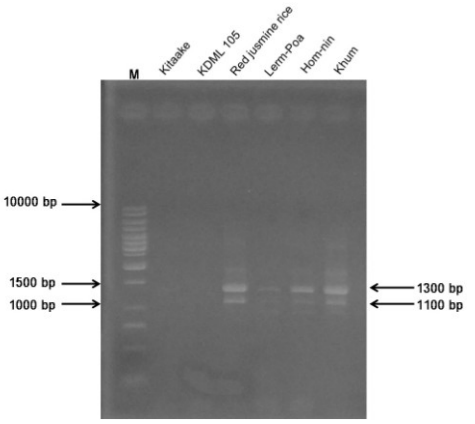

Figure 1 RT-PCR analysis of coding sequences (cds) of *OSB2* gene in rice varieties (Kitaake, KDML 105, Red jasmine rice, Lerm-Poa, Hom-nin and Khum) using cDNA prepared from rice leaves. Lane M; 1 Kb DNA Ladder.

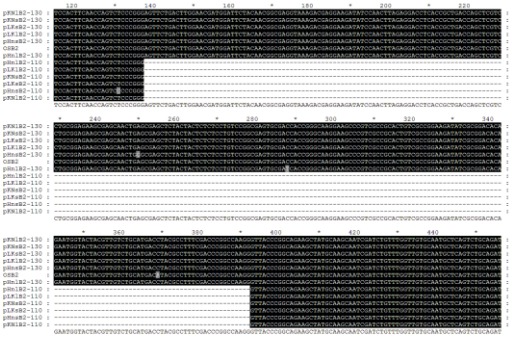

Figure 2 Alignment of 1300-bp and 1100-bp coding sequences of *OSB2* genes cloned from various rice varieties and *OSB2* gene from GenBank (accession no. AB021080). The figure shows deletion of the 2nd exon of the 1101-bp ORFs. pLKlB2 and pLKsB2 = leaves and seeds from Lerm-Poa. pHnlB2 and pHnsB2 = leaves and seeds from Hom-nin. pKnlB2 and pKnsB2 = leaves and seeds from Khum. *OSB2* = *OSB2* gene from GenBank.

(accession no. BAB64302) พบว่ามีความคล้ายกัน 99% เช่นกัน มีเพียง 8 กรดอะมิโนที่แตกต่างกัน และพบบริเวณที่เป็น basic helix-loop-helix (bHLH) domain ที่ตำแหน่ง 377-428 ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับโปรตีน transcription factor (Figure 3)

สรุปผลการทดลอง

จากการค้นหายีน *OSB2* ที่เป็นบริเวณ coding sequence โดยวิธี RT-PCR เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 1100 และ 1300 bp เฉพาะในข้าวสีแต่ไม่พบในข้าวขาวอาจเนื่องจากในข้าวขาวมีการแสดงออกของยีน *OSB2* น้อย หรือไพรเมอร์ที่ออกแบบไม่สามารถจับลำดับเบสของยีน *OSB2* จากข้าวขาวได้ ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนในบริเวณ coding sequence

เมื่อนำลำดับเบสของชิ้นยีนขนาด 1300 bp ไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับยีน *OSB2* จากฐานข้อมูลที่บริเวณ open reading frame (ORF) ขนาด 1356 bp และมีลำดับเบสต่างกันเพียงบางตำแหน่งเท่านั้น และยีนขนาด 1100 bp เกิดลำดับเบสหายไป 255 bp ในบริเวณ exon ที่ 2 ของยีน อาจเนื่องจากยีนในข้าวที่ศึกษาในงานวิจัยนี้อาจมี 2 รูปแบบ ที่มี ORFs ขนาด 1356 และ 1101 bp หรืออาจมียีนเดียวแต่มีการตัดแปลง mRNA โดยเกิดการเลือกตัดอินทรอนแตกต่างกัน (alternative splicing) ทำให้เกิด mRNA 2 รูปแบบที่มีขนาดต่างกัน โดยลำดับดีเอ็นเอที่หายไปสอดคล้องกับกรดอะมิโนที่หายไป 85 หน่วย และพบบริเวณที่

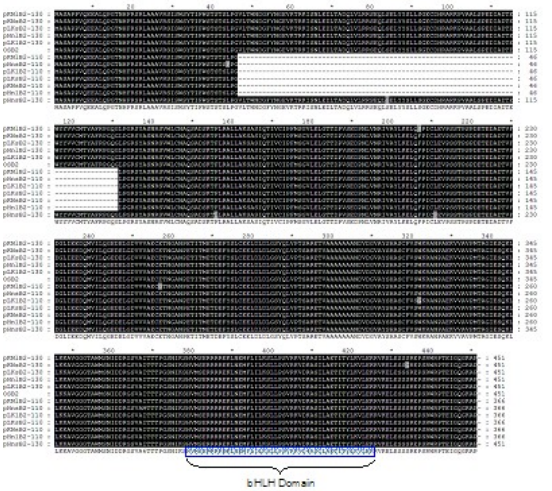

Figure 3 Alignment of deduced amino acid sequences from ORFs of *OSB2* genes cloned from various rice varieties and OSB2 amino acid sequences from GenBank (accession no.BAB64302). The bHLH domains are highlighted in blue at 377-428 amino acid positions.

เป็น basic helix-loop-helix (bHLH) domain ในยีน *OSB2* ทั้งขนาด 1356 และ 1101 bp ในบริเวณ C terminus ซึ่งเป็นบริเวณ DNA binding domain ที่มีความสำคัญต่อการทำงานของโปรตีน transcription factor จากการวิเคราะห์ motif ของลำดับกรดอะมิโน พบว่า ยีนขนาด 1101 bp มีการขาดหายของ exon ที่ 2 และขาดกรดอะมิโน 85 หน่วย ทำให้มีบริเวณ phosphorylation site บางส่วนหายไปซึ่งอาจมีผลต่อกลไกควบคุมการทำงานของ transcription factor ในการควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

ในงานวิจัยขั้นต่อไปจะศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของยีน *OSB2* ที่โคลนได้เพื่อให้เข้าใจการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าว และประยุกต์ใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ และทุนการศึกษาประเภททุนศิษย์เรียนดี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปี 2555 ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนการศึกษาแก่นางสาวพูนศรี อินต๊ะ

เอกสารอ้างอิง

Geekiyanage S, Takase T, Ogura Y and Kiyosue T (2007) Anthocyanin production by over-expression of grape transcription factor gene *VlmybA2* in transgenic tobacco and Arabidopsis. Plant Biotech Rep 1: 11–18.

Saitoh K, Onishi K, Mikami I, Thidar K and Sano Y (2004) Allelic diversification at the *C (OsC1)* locus of wild and cultivated rice: Nucleotide changes associated with phenotypes. Gen Soc America 168: 997–1007.

Sakamoto W, Ohmori T, Kageyama K, Miyazaki C, Saito A, Murata M, Noda K and Maekawa M (2001) The *Purple leaf (Pl)* locus of rice: the Pl^{w} allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. Plant Cell Physiol 42: 982–991.

Shih CH, Chu H, Tang LK, Sakamoto W, Maekawa M, Chu IK, Wang M and Lo C (2008) Functional characterization of key structural genes in rice xavonoid biosynthesis. Planta 228: 1043–1054.