

ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความร้อน *OsHsfA2a* และ *OsHsfB2c* จากข้าวไทย

Variation of Partial Coding Sequence of Heat Stress Transcription Factor Genes,
OsHsfA2a and *OsHsfB2c*, from Thai Rice

แสงทอง พงษ์เจริญกิต*, ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ และ วราภรณ์ แสงทอง

Saengtong Ponjaroenkit, Chotipa Sakulsingharoj and Varaporn Sangtong

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Program of Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

*Corresponding author: saengtong@mju.ac.th

บทคัดย่อ

โปรตีน heat stress transcription factors (Hsfs) มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่ออุณหภูมิสูงของพืช ซึ่งการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Hsfs* พบยีน *Oryza sativa* heat stress transcription factor A2a (*OsHsfA2a*) และยีน *OsHsfB2c* แสดงออกเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้จึงแยกบางส่วนของยีนทั้งสองจากข้าวไทยด้วยเทคนิค PCR เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายของยีนในข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ ซึ่งพบการหายไปของคู่เบสในยีน *OsHsfA2a* ของข้าวไทย เมื่อวิเคราะห์บริเวณ motif ของโปรตีน ไม่พบผลกระทบการทำหน้าที่เป็น transcription factor ส่วนยีน *OsHsfB2c* พบการแทนที่ของคู่เบสในยีนของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าฮ่อ เมื่อวิเคราะห์บริเวณ motif ของโปรตีน พบว่ามีผลกระทบต่อบริเวณจับดีเอ็นเอ จึงคาดว่าจะมีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน *OsHsfB2c* ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าฮ่อ จากความหลากหลายบางส่วนของยีนที่แยกได้ทำให้จะต้องมีการแยกยีนสมบูรณ์ต่อไป

ABSTRACT

Heat stress transcription factors (Hsfs) are important proteins involved in plant response to heat stress. Expression studies of *Hsfs* gene showed the higher expression level of *Oryza sativa* heat stress transcription factor A2a (*OsHsfA2a*) and *OsHsfB2c* in high temperature. Therefore, these two genes were isolated from Thai rice by polymerase chain reaction (PCR) and used for biodiversity study. The nucleotide comparison and protein motif searching of partial coding sequence of *OsHsfA2a* gene revealed 12 bp deletion at N-terminus in Thai rice varieties which may not affect the function of this transcription factor. Whereas partial coding sequence *OsHsfB2c* gene comparison and motif searching revealed transversion in Khao Dawk Mali 105 and Jow Haw which lower DNA binding motif score. This transversion may affect the function of *OsHsfB2c* protein. The full length genes will be isolated for further study.

คำสำคัญ: ยีน *OsHsfA2a*, ยีน *OsHsfB2c*, พีซีอาร์, การขาดหายของคู่เบส, การแทนที่ของคู่เบส

Keywords: *OsHsfA2a*, *OsHsfB2c*, PCR, deletion, transversion

บทนำ

ภาวะโลกร้อนมีผลกระทบต่อการเพาะปลูกข้าว จากรายงานระหว่างปี พ.ศ. 2537-2542 พบว่าอุณหภูมิต่ำสุดของแต่ละวันที่สูงขึ้น หรืออุณหภูมิในเวลากลางคืนที่สูงขึ้น ทำให้ผลผลิตลดลงไปประมาณ 10-20% ในพื้นที่เพาะปลูกหลักของโลก และจากการทำนายของ MetOffice ทำนายว่าโลกจะมีอุณหภูมิเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 4 องศาเซลเซียส ในปี ค.ศ. 2100 ซึ่งประเทศทั่วโลกจะพบกับปัญหาภัยแล้ง และประเทศไทยจะประสบปัญหาพืชผลที่จะเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาวิจัยในพืชพบโปรตีนที่ทำให้พืชสามารถปรับตัวเข้ากับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นได้ คือโปรตีนตอบสนองต่ออุณหภูมิ (heat shock proteins/heat stress proteins; HSPs) ที่ส่วนหนึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มควบคุมการถอดรหัสของยีนที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง (heat stress transcription factors; HSFs) การศึกษายีน *Hsf* จากข้าวพันธุ์ Nipponbare พบว่ามียีน *Hsf* จำนวน 25 ยีน แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามโครงสร้างของโปรตีน คือ กลุ่ม A, B และ C ตามลำดับ จากวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Hsfs* พบยีน *Hsfs* ที่มีตอบสนองต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (Mittal. et al., 2009, Wang et al., 2009, Liu et al., 2010 และ Chandel, et al., 2012) เช่น *Oryza sativa* heat stress transcription factor A2a (*OsHsfA2a*) ส่วนยีน *OsHsfB2c* นั้นมีรายงานว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นถึง 54 เท่าในข้าวจากไปนิกาพันธุ์ทนแล้ง (Chandel. et al., 2012) หากข้าวไทยมียีนดังกล่าวคาดว่าจะมีความสามารถในการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นได้

ในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกบางส่วนของยีนโปรตีนควบคุมการถอดรหัสที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิสูง *OsHsfA2a* และ *OsHsfB2c* เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีนทั้งสองนี้จากข้าวไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ใช้

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง จำนวน 8 พันธุ์ คือ บาสมาติ, ไทซุง 65, กข 33, กุ่มเมืองหลวง, ขาวดอกมะลิ 105, ชัยนาท 80, ข้าวเจ้าหอมพิชฌุโลก 1 และเจ้าฮ่อ

2. การสกัดดีเอ็นเอของจีโนม (Genomic DNA)

ตัวอย่างใบของข้าวพันธุ์ต่างๆ ประมาณ 100 มิลลิกรัม นำมาบดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000)

3. การแยกบางส่วนของยีน *OsHsf* จากข้าวไทย

การแยกบางส่วนของยีน *OsHsfA2a* และ *OsHsfB2c* ด้วยเทคนิค PCR ใช้ดีเอ็นเอของจีโนมจากข้าวไทยเป็นแม่พิมพ์ ไพร์เมอร์สำหรับยีน *OsHsfA2a* และสำหรับยีน *OsHsfB2c* และสภาวะที่ใช้ดังรายงาน Chandel. et al. (2012)

4. การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

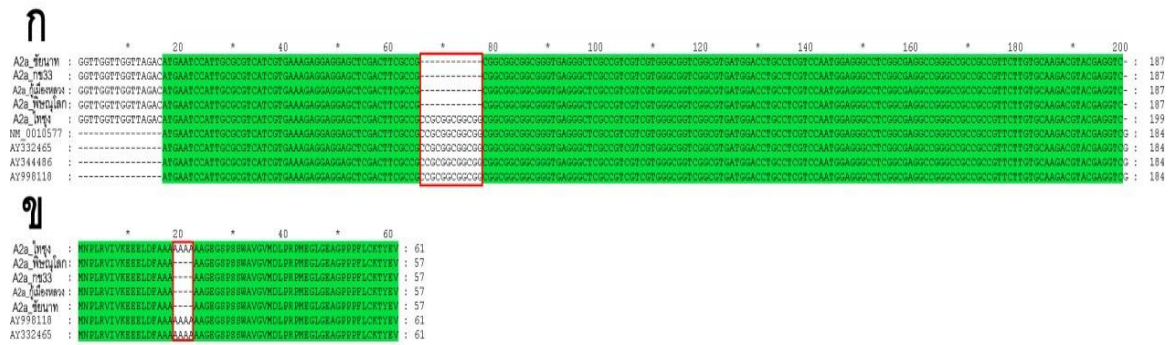
ผลผลิตที่ได้จากทำ PCR จะแยกบริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® Quick Gel Extraction kit (Invitrogen) จากนั้นส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) วิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม BioEdit, ClustalX2.1 และ GeneDoc ส่วนบริเวณ motif ของโปรตีนวิเคราะห์ด้วยการเปรียบเทียบฐานข้อมูลโปรตีน Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>) (Punta et al., 2012)

ผลการทดลองและวิจารณ์

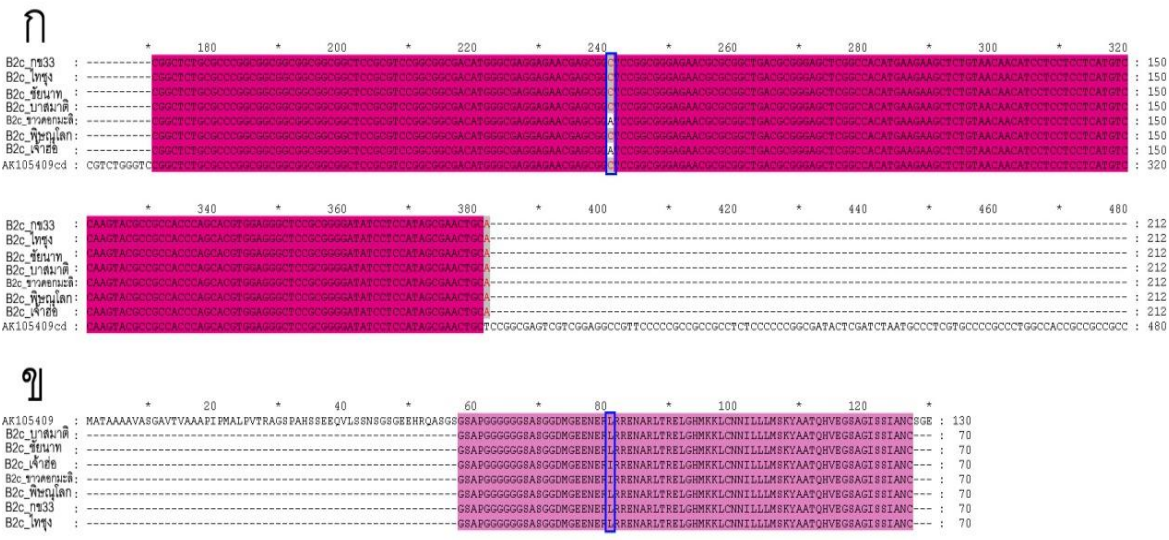
1. การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอและลำดับกรดอะมิโน

การแยกบางส่วนของยีนด้วยเทคนิค PCR ของดีเอ็นเอของจีโนมของข้าวพันธุ์ต่างๆ พบยีนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 และ 300 คู่เบส สำหรับยีน *OsHsfA2a* และ *OsHsfB2c* ตามลำดับ เมื่อนำไปอ่านลำดับดีเอ็นเอสามารถอ่านยีน *OsHsfA2a* จากข้าว จำนวน 5 พันธุ์ คือ กข 33, กุ่มเมืองหลวง, ชัยนาท 80, ข้าวเจ้าหอมพิชฌุโลก 1 และไทซุง 65 ส่วนยีน *OsHsfB2c* ได้จากข้าวจำนวน 7 พันธุ์ คือ กข 33, บาสมาติ, ชัยนาท 80, ข้าวเจ้าหอมพิชฌุโลก 1, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าฮ่อ และไทซุง 65

เมื่อเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอ พบว่าเป็น *OsHsfA2a* ของข้าวไทยที่เป็นข้าวอินดิกันนั้นจะมีการขาดหายคู่เบส (deletion) ยาว 12 นิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปที่ 1ก โดยบริเวณที่หายไปนั้นเป็นบริเวณซ้ำของอะลานีน 4 หน่วย (รูปที่ 1 ข) ส่วนยีน *OsHsfB2c* นั้นพบการแทนที่คู่เบส (transversion) จาก C ไปเป็น A ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าฮ่อ ที่ทำให้เปลี่ยนลิวิซีนเป็นไอโซลิวิซีน เป็น neutral mutation (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอ (ก) ลำดับกรดอะมิโน (ข) บางส่วนของยีน *OsHsfA2a* โดยที่ 33, กข 33, กู้เมืองหลวง, พิษณุโลก และไทยสูง คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 80, กข 33, กู้เมืองหลวง, ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1 และ ไทยสูง 65 ตามลำดับ ส่วน AY998118 และ AY332465 คือยีน *OsHsfA2a* จากฐานข้อมูล GenBank



รูปที่ 2 ผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอ (ก) ลำดับกรดอะมิโน (ข) บางส่วนของยีน *OsHsfB2c* โดยที่ กข 33, ไทยสูง, ชัยนาท, บาทสมมติ, ขาวดอกมะลิ, พิษณุโลก และเจ้าฮ่อ คือ ข้าวพันธุ์ กข 33, ไทยสูง 65, ชัยนาท 80, บาทสมมติ, ขาวดอกมะลิ 105, ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1 และเจ้าฮ่อ ตามลำดับ ส่วน AK105409 คือ ยีน *OsHsfB2c* จากฐานข้อมูล GenBank

การวิเคราะห์บริเวณ motif ของโปรตีน

เมื่อวิเคราะห์บริเวณ motif ของลำดับกรดอะมิโนของบางส่วนของยีน *OsHsfA2a* ของข้าวไทยสูง 65 และข้าว กข 33 เป็นตัวแทนของยีนที่มีอะลานีน 9 และ 5 กรดอะมิโน ตามลำดับ พบว่าการขาดหายของอะลานีน (*OsHsfA2a* ของข้าว กข 33) ทำให้ไม่พบบริเวณ Chorion_2 ที่เป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของพอลิคลูลาร์เซลล์ของแมลงหวี (ตารางที่ 1) การลดลงของอะลานีนนี้อาจไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน heat stress transcription factor กลุ่ม A2a จากข้าวอินดีกาและจาโปนิกา

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของบางส่วนของยีน *OsHsfB2c* ของข้าวไทยสูง 65 (EENERLRREN) และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ENERLRREN) เป็นตัวแทนของยีนที่เป็นลิวซีนและไอโซลิวซีนตามลำดับ ไปวิเคราะห์บริเวณ motif แบบ pfam-A พบว่าลิวซีนเป็นกรดอะมิโนสำคัญของบริเวณจับดีเอ็นเอ (Homeobox associated leucine zipper) ซึ่งเมื่อเปลี่ยนเป็นไอโซลิวซีนทำให้บริเวณนี้หายไป และเมื่อเปรียบเทียบแบบ pfam-B พบว่าเหมือนกับ *A. thaliana* heat stress transcription factor B-2a โดยที่ลิวซีน (40.8) จะมีค่า bit-score สูงกว่าไอโซลิวซีน (38.3) ดังแสดงในตารางที่ 1 การเปลี่ยนกรดอะมิโนนี้น่าจะกระทบต่อการจับดีเอ็นเอของโปรตีน ซึ่งอาจจะมีผลต่อการทำงานของโปรตีน *OsHsfB2c* ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าฮู้เมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นๆ และอาจจะส่งผลกระทบต่อความสามารถในการตอบสนองต่อความร้อนของข้าวไทยทั้งสอง

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ motif ของโปรตีนด้วยการเปรียบเทียบฐานข้อมูลโปรตีน Pfam

Type	Description	Entry type	Clan	HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites
<i>OsHsfA2a</i> ของข้าวไทยสูง 65							
Pfam-A	Chorion_2	Chorion family 2	Family	77	99	13.9	0.059
	#HMM	aAasalaalnaGsykvwkvpsyevd					
	#MATCH	aAa+a+aa +Gs+++w+v + +++					
#SEQ	AAAAAAAA GEKSPSSWAVGMDLP						
<i>OsHsfA2a</i> ของข้าว กข 33							
ไม่พบความเหมือน							
<i>OsHsfB2c</i> ของข้าวไทยสูง 65							
Pfam-A	HALZ	Homeobox associated leucine zipper	Family	38	45	12.2	0.11
	#HMM	aendsLqkEkekLraevlsL					
	#MATCH	+en++L++E+++L e+ +					
#SEQ	EENER L RRENARLTRELGHM						
Pfam-B	Pfam-B_17160	<i>A. thaliana</i> HSF B-2a	-	425	40.8	2.4e-10	-
	#HMM	denerlrkenvqltkelaemrslcnniyslmSsYgnk					
	#MATCH	+enerlr+en lt+el m+ lcnni lmS Y+					
#SEQ	EENER L RRENARLTRELGHMCKLNNILLMSKYAAT						
<i>OsHsfB2c</i> ของข้าวขาวดอกมะลิ 105							
Pfam-A	ไม่พบความเหมือน						
Pfam-B	Pfam-B_17160	<i>A. thaliana</i> HSF B-2a		425	38.3	1.5e-09	-
	#HMM	denerlrkenvqltkelaemrslcnniyslmSsYgnk					
	#MATCH	+ener r+en lt+el m+ lcnni lmS Y+					
#SEQ	EENER I RRENARLTRELGHMCKLNNILLMSKYAAT						

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้สามารถแยกบางส่วนของยีน *OsHsfA2a* และ *OsHsfB2c* จากข้าวไทย โดยเทคนิค PCR ในยีน *OsHsfA2a* ของข้าวไทย พบการขาดหายของคู่เบสทำให้กรดอะมิโนอะลานีนหายไป 4 หน่วย เมื่อนำไปวิเคราะห์หาบริเวณ motif ของโปรตีน ไม่พบผลกระทบต่อบริเวณสำคัญของ transcription factor ทำให้คาดว่าจะไม่มีผลต่อการทำงานของโปรตีน *OsHsfA2a* ในข้าวอินดิกาและข้าวจาโปนิกา ส่วนยีน *OsHsfB2c* นั้นพบการแทนที่คู่เบส 1 ตำแหน่ง ในยีนของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าฮ่อ เมื่อนำไปวิเคราะห์หาบริเวณ motif ของโปรตีน พบว่ามีผลกระทบต่อบริเวณจับดีเอ็นเอ คาดว่าการแทนที่คู่เบสนี้น่าจะมีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน *OsHsfB2c* ในข้าวขาวดอกมะลิ และเจ้าฮ่อ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในสถาบัน อุดมศึกษาของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2555

เอกสารอ้างอิง

- Liu Ai-Ling, Zou Jie, Zhang Xian-Wen, Zhou Xiao-Yun, Wang Wen-Fang, Xiong Xing-Yao, Chen Li-Yun, Chen Xin-Bo. Expression Profiles of Class A Rice Heat Shock Transcription Factor Genes Under Abiotic Stresses. *J. Plant Biol.* 2010; 53:142–149.
- Chuang Wang, Qian Zhang, Hui-xia Shou. Identification and expression analysis of *OsHsfs* in rice. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10(4):291-300.
- Mittal Dheeraj, Chakrabarti Sveta, Sarkar Anshuk, Singh Amanjot, Grover Anil. Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2009; 47 (9):785-795.
- Chandel G., Dubey M., Meena R. Differential expression of heat shock proteins and heat stress transcription factor genes in rice exposed to different levels of heat stress. *J. Plant. Biochem. Biotechnol.* 2012;
- Punta M., Coggill P.C., R.Y. Mistry Eberhardt, J., Tate J., Bournsnell C., Pang N., Forslund K., Ceric G., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E.L.L., Eddy S.R., Bateman A., Finn R.D. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research.* (2012) Database Issue 40:D290-D301.