การทดสอบยีน caffeate-O-methyl-transferase (COMT) เชิงปริมาณในยางเพื่อเนื้อไม้

Quantitative Gene Expression of Caffeate-O-Methyl-Transferase (COMT) in Wood Timber Rubber Trees

ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

COMT (Caffeate-O-Methyl-Transferase) gene involves in lignin, an important part of wood component synthesis. DNA sequence of COMT genes from genebank information of *Clarkia breweri*, *Liguilambar styraciflua*, *Saccharum officinarum*, *Lolium multiforum* and *Festuca arundinacea* were taken to identify similar base sequence using comparative principle of multiple alignment. The result revealed identical DNA sequence that could be used as primer to increase number of COMT gene parts from cDNA of Chachengsao Para rubber var. 50. When the base sequence were studies, it was found that DNA was 549 bp. And when compared to base sequence in those other crops, it was found that *Liguilambar styraciflua* had 47.5% of identity which was the highest.

Lux primer design by using the sequence of gene parts line up and examining distinctiveness revealed that the primer obtained could increase only one band of K21 Para rubber gene part which was 108 bp., and when examined expression of cloned gene parts with K21 Para rubber leaves, it was found that the obtained primer could be used to check quantity of gene expression with Quantitative Real-Time RT-PCR technique.

รหัสกิจกรรม 05-01-47-03

รหัสการทดลอง 05-01-47-0302

บทคัดย่อ

ยีน COMT (caffeate O-methyl-transferase) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อไม้ จากการนำลำดับดีเอ็นเอของยีน COMT จากฐานข้อมูล GenBank ของ *Clarkia breweri, Liquidambar styraciflua, Saccharum officinarum, Lolium multiflorum และ Festuca arundinacea* มาหาลำดับเบสส่วนที่เหมือนกันโดยอาศัยหลักการเปรียบเทียบ Multiple Alignment พบลำดับเบสที่เหมือนกันและใช้เป็น primer ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน COMT จาก cDNA ของยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 ได้ และเมื่อนำไปหาลำดับเบสพบว่าชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากับ 549 bp. และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน COMT ในพืชชนิดอื่นพบว่ามีลำดับเบสเหมือนกันมากที่สุดใน *Liquidambar styraciflua* มีค่า Identity 47.5%

จากการนำลำดับการเรียงตัวของชิ้นส่วนยีนไปออกแบบ LUX primer และตรวจสอบความจำเพาะ พบว่า primer ที่ได้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนจากยางพาราพันธุ์ K21 ได้เพียงแถบเดียว ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 108 bp. และเมื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้กับส่วนใบของยางพาราพันธุ์ K21 พบว่า primer ดังกล่าวสามารถใช้ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนได้ด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time RT-PCR

คำนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ และทำรายได้ให้เกษตรกรโดยการกรีดยางนำน้ำยางมาผ่านการแปรรูป ส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ จนยางพาราเป็น 1 ใน 4 ชนิดของสินค้าหลักของประเทศ เมื่อประมาณปี 2512 เป็นต้นมา ไม้จากป่าธรรมชาติมีจำนวนลดลงและเริ่มมีราคาสูงขึ้น ผู้ประกอบการที่ต้องการใช้ไม้มาทำลังเพื่อบรรจุผลิตภัณฑ์ เช่น เครื่องยนต์ เครื่องจักร พืชผลทางการเกษตรชนิดต่างๆ ผลผลิตทางทะเล ผู้ประกอบจึงได้หันมาใช้ไม้ชนิดอื่นๆ รวมทั้งไม้ยางพารา ต่อมาได้มีการพัฒนากรรมวิธีวิธีรักษาเนื้อไม้ให้มีความทนทาน และนำมาผลิตเฟอร์นิเจอร์ มีการพัฒนารูปแบบ และส่งออกไปจำหน่ายในประเทศต่างๆ มากขึ้น ในปี 2543 อุตสาหรรมเฟอร์นิเจอร์ไม้ยางพาราได้มีการส่งออกเป็นมูลค่าไม่ต่ำกว่า 22,000 ล้านบาท (สรรพกิจ, 2544)

การปรับปรุงพันธุ์ยางให้มีผลผลิตเนื้อไม้สูงเพิ่มขึ้นจาก 45 ลบ.ม./ไร่ เป็น 60 ลบ.ม./ไร่ ตามเป้าหมายของกรมวิชาการเกษตรนั้น วิธีที่น่าจะทำเพื่อให้ได้ผลผลิตเนื้อไม้ได้ตามเป้าหมายนั้น อาจทำได้โดยการปรับปรุงพันธุ์ยางแบบปกติร่วมกับการใช้เทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ผ่านมา

สถาบันวิจัยยางได้เริ่มดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ยางเพื่อเนื้อไม้ด้วยวิธีการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์โดยดูจากลักษณะทางฟีโนไทป์ ปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็วและมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิด สำหรับในยางพาราเทคโนโลยีชีวภาพ สามารถนำมาใช้เพิ่มผลผลิตเนื้อไม้ได้โดยการค้นหาทดสอบและวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับเนื้อไม้ยาง ที่สามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับปรับปรุงพันธุ์ยางให้มีเนื้อไม้สูงและเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ให้รวดเร็ว แม่นยำ โดยคัดเลือกพันธุ์จากยีนที่มีลักษณะจำเพาะในระดับพันธุกรรม ต้นยางที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว การพัฒนาของท่อลำเลียงน้ำมีประสิทธิภาพ และกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินเกิดขึ้นอย่างเต็มที่เป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้ต้นยางมีผลผลิตเนื้อไม้สูงและมีคุณภาพดี

ในไม้ยืนต้นการเจริญเติบโตของเส้นผ่าศูนย์กลางของต้นเป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของ Vascular cambium (Larson 1994, Telewski et.al.,1996) ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ลำเลี้ยงน้ำ (Xylem) และให้ความแข็งแรงของต้น (Wood) การพัฒนาของท่อลำเลียงน้ำ และท่อลำเลียงอาหาร เกี่ยวข้องกับกระบวนการพื้นฐานของการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดเซลล์ การสร้างผนังเซลล์ ซึ่งมีส่วนสัมพันธ์กับการสร้าง Cellulose, Hemicellulose, ลิกนิน และการตายของเซลล์ ระหว่างขั้นตอนการพัฒนาจะมีผลต่อคุณสมบัติโครงสร้างของเนื้อไม้และเส้นใย

ในพืชลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์ เซลล์ที่ทำหน้าที่ เช่น องค์ประกอบของ tracheary sclerenchyma และ phloem fiber ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้จะมีการพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและอาหาร อีกทั้งเป็นที่ยอมรับกันมานานแล้วว่าการสังเคราะห์ลิกนินมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของลำต้นพืช (Qing *et.al.*, 2002)

ยีน COMT (caffeate O-methyl-transferase) เป็นเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนินในพืช โดยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา methylation ของ caffeic acid ให้เปลี่ยนไปเป็น ferulic acid และเปลี่ยน 5-hydroxyferulic acid ไปเป็น sinapic acid ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างองค์ประกอบของลิกนิน (Chung and Wang, 2000)

ในไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจมีข้อมูลเกี่ยวกับการควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมในการสร้างเนื้อไม้น้อยมาก (Baucher *et.al.*,1998) มีรายงานการศึกษาในพืชไม้เนื้ออ่อน เช่น Zinnia และ Arabidopsis พบว่าต้นที่ได้รับการดัดแปลงทางพันธุกรรมของยีน COMT (caffeate O-methyl-transferase) มีการพัฒนาของท่อลำเลียงต่างไปจากต้นปกติ การเปรียบเทียบการสังเคราะห์ cellulose และ lignin จึงเป็นจุดที่น่าสนใจ ที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อไม้ (Meyer *et.al.*,1996; Pear *et.al.*,1996) ตัวอย่างที่เกี่ยวเนื่องของ lignin กับ monomer ที่เปลี่ยน จาก caffeate O-methyl-transferase (COMT) (Ralph *et.al.*,2001) พบว่าใน trangenic line เมื่อลดกิจกรรมของยีน COMT จะมีส่วนประกอบของ lignin ลดลง

การค้นหายีนโดยวิเคราะห์จากการแสดงออกมีความสำคัญมากในการศึกษาหน้าที่ของยีนที่ผ่านมาการแสดงออกของยีนวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Northern blotting, RNA dot blotting และ RT-PCR การค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันระหว่าง 2 ตัวอย่าง ทำได้โดยใช้เทคนิค differential display แต่เป็นเทคนิคที่ไม่สามารถศึกษาการแสดงออกของยีนในเชิงปริมาณ ปัจจุบันมีเทคนิค Quantitative Real Time RT-PCR สามารถศึกษาการแสดงออกของยีนในเชิงปริมาณได้ ซึ่งช่วยลดข้อจำกัดของกระบวนการ PCR แบบดั้งเดิมที่ไม่สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น บอกได้แต่เพียงว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่หรือไม่ อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบผลได้เร็วหลังจากกระบวนการ PCR เสร็จสิ้นลง นอกจากนี้ยังสามารถหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายจาก unknown sample สามารถทำได้โดยใช้ Standard DNA (ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ทราบปริมาณ) มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมควบคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการทราบปริมาณ (unknown DNA) ข้อมูลที่ได้จากกลุ่มของ Standard DNA จะถูกนำไปสร้างเป็น calibration graph เพื่อให้กลุ่ม unknown DNA ให้เปรียบเทียบหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น(หน่วยไวรัสวิทยาและจุลชีววิทยาโมเลกุล, 2542) ซึ่ง Standard DNA สามารถสร้างได้จาก plasmid ที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ (Wawrik *et al*., 2002)

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนชิ้นส่วนของยีน COMT จากยางพารา พร้อมทั้งหาลำดับเบส และใช้ออกแบบ primer ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน COMT ในยางพาราด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time RT-PCR ทั้งนี้เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในยางพารา

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen life technology)
2. DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology)
3. SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology)
4. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
5. QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
6. pGEM-T Easy เวคเตอร์ System I (Promega)
7. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Appliedbiosystems)
8. เครื่อง spectrophotometer (PERKIN ELMER MBA2000)
9. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)

10. เครื่องแยกสารพันธุกรรมในแนวนอน (GelMate 2000, TOYOBO)
11. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
12. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
13. เครื่องวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer)
14. เครื่องตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง (LightCycler , Roche)
15. ยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 และยางพาราพันธุ์ K21

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การโคลนชิ้นส่วนของยีน COMT จากยางพารา

วิธีการดำเนินงาน

1. การเตรียมตัวอย่างพันธุ์ยางพารา

ต้นยางพาราที่ใช้ในการทดลองได้ดำเนินการจัดเตรียมโดยศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา ต.ลาดกระทิง อ. สนามชัยเขต จ. ฉะเชิงเทรา โดยมาจากการนำกิ่งตายางพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 ไปติดลงบนต้นตอที่ได้จากการเพาะเมล็ด แล้วนำไปปลูกจนเจริญเติบโตเป็นยางชำถุง จากนั้นนำไปปลูกลงถุงขนาดใหญ่จนมีขนาด 3-4 ฉัตร

2. ออกแบบ primer เพื่อค้นหายีน COMT จากยางพารา

ค้นหายีน COMT ที่มีรายงานในพืชชนิดอื่นๆ จากฐานข้อมูล NCBI Sequence GeneBank นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมือนกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment ที่ทำงานบนชุดโปรแกรม BioEdit นำลำดับเบสส่วนที่เหมือนกันใช้ออกแบบ primer สำหรับเพิ่มปริมาณส่วนของยีน COMT จากยางพารา

3. การเตรียม Total RNA จากยางพาราโดยใช้ Concert Plant RNA Reagent

นำชิ้นส่วน แผ่นใบ ก้าน ใบ และ ลำต้นนำมาหั่นให้เป็นชิ้นขนาดเล็กโดยใช้ใบมีดผ่าตัดแล้วบดรวมกันด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง แล้วนำไปแยกสกัด RNA โดยใช้สารเคมีและปฏิบัติตามวิธี Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen life technology) หลังจากนั้นนำหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจสอบดูแถบ RNA ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย GelStar แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80°C

4. การสังเคราะห์ cDNA จาก Total RNA ของยางพาราโดยใช้ SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR

ก่อนที่จะสังเคราะห์ cDNA จะต้องกำจัดดีเอ็นเอที่อาจจะปะปนออยู่ใน Total RNA โดยย่อยด้วย DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology) ทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology) ด้วยTotal RNA ปริมาณ 1 μg และ Oligo(dT) 20 primer

5. การเพิ่มปริมาณส่วนของยีน COMT ด้วยเทคนิค PCR

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครกรัม, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร, 5 μM Forward Primer (COMT) 2 ไมโครลิตร, 5 μM Reverse Primer ($Oligo(dT)_{20}$) 2 ไมโครลิตร, cDNA Template (จากข้อ 7) 1 ไมโครลิตร, 5 U/μl Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ 20 ไมโครลิตร จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดการเปลี่ยน แปลงของอุณหภูมิเป็น 94°C 2 นาที ในแต่ละรอบของ PCR กำหนดอุณหภูมิเป็น Denature 94°C 30 นาที, Anneal 42°C 1 นาที และ Extend 72°C 2 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ ส่วนในรอบสุดท้ายตามด้วย 72° C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเก็บตัวอย่างไว้ที่ –20°C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผล

6. การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอ

นำผลผลิต PCR ที่เพิ่มปริมาณได้ไปตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5 แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

7. การแยกและดึงดีเอ็นเอกลับมา (Recovery of DNA)

โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit

8. ใช้ดีเอ็นเอที่เพิ่มประมาณด้วยเทคนิค PCR มาแยกด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย gel star (Cambrex)

หลังจากนั้นนำไปตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการบนเครื่อง Dark Reader transilluminators และแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากชิ้นวุ้นโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) เก็บชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้ที่ –20°C จนกว่าจะไปในใช้

9. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ Vector และการทำ Transformation

ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้าน 3′-A overhangs เข้ากับ pGEM-T Vector System I (Promega) นำปฏิกิริยาที่ได้ไปเก็บที่ 4°C นานข้ามคืน หลังจากนั้นทำการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าเชื้อ *Escherichia coli* DH5α ที่นำมาทำให้เซลล์มีคุณสมบัติเป็น Competent cell ด้วย $CaCl_2$ โดยนำไป heat-shock ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที แล้วเติม SOC medium นำไปเลี้ยงที่อุณภูมิ 37°C ที่เขย่าความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป plate บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 100 μg/ml ampicillin 0.5 mM IPTG และ 50 mg/ml X-Gal แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

10. การตรวจหาโคโลนีที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR

ตรวจหาโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR โดยใช้ไม้จิ้มฟันจิ้ม colony นำไปใส่ในหลอดที่มีปฏิกิริยาของ PCR ซึ่ง 1X PCR Buffer minus Mg, 0.2 mM dNTP each, 1.5 mM MgCl2, 0.2 μM T7 Primer, 0.2 μM SP6 Primer, 1 units *Taq* DNA Polymerase, Autoclaved distilled water to 20 μl นำเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Themal Cycler ที่กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนดังนี้ เริ่มต้นที่อุณภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลา Denature 94°C 30 sec, Anneal 55°C 1 min, Extend 72° C 1 min ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ ตามด้วย Final extend 72°C 10 min นำไปตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้ 1.5% Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

11. การแยกพลาสมิดด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5α ที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายในพลาสมิด pGEM-T ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ที่เติม ampicillin 100 μg/ml นำไปเลี้ยงที่อุณภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลาเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์ใน microcentrifuge tube 1.5 ml แล้วนำไปแยกสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) ตรวจสอบพลาสมิดที่แยกได้ใช้ 1% Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำสารละลายที่เหลือเก็บไว้ที่ –20°C จนกว่าจะนำไปใช้หาลำดับเบส

12. การหาลำดับเบสของยีนโดยใช้ ABI PRISM® BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

นำพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน COMT เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการหาลำดับเบสโดยใช้สารเคมีชุด ABI PRISM® BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ร่วมกับ primer ชนิด T7 และ SP6 พร้อมทั้งตรวจสอบลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาการแสดงออกของยีน COMT ด้วยเทคนิค Quantitative Real Time RT-PCR

วิธีการดำเนินงาน

1. การออกแบบ primer สำหรับวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค Quantitative Real Time RT-PCR โดยใช้ลำดับเบสของยีน COMT ที่หาได้จากข้อ 16 ไปออกแบบ LUX primer โดยใช้โปรแกรม D-LUX™ Designer (www.invitrogen.com) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงชนิด FAM โดยปฏิบัติตามขั้นตอนของการใช้โปรแกรมที่อยู่บนอินเตอร์เน็ท ขั้นตอนสุดท้ายจะแสดงผลของลำดับ primer และลำดับคะแนนของแต่ละ primer ให้เลือกใช้เป็นคู่ โดยแต่ละคู่จะประกอบด้วย primer ที่ต้องติดฉลากสารเรืองแสง และ primer ที่ไม่ต้องติดฉลากสารเรืองแสง และสั่งสังเคราะห์ primer ดังกล่าวจากบริษัท Invitrogen

2. การเตรียม Standard DNA เพื่อใช้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน นำพลาสมิด pGEM-T ที่มีชิ้นยีน COMT ไปหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำค่าความเข้มข้นที่ได้มาทำให้เจือจางโดยในปริมาตร 2 ไมโครลิตร ให้มีความเข้มข้นของสารละลายของพลาสมิด 8 ระดับ คือ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 pg สำหรับนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร, 5 mg/ml BSA 1 ไมโครลิตร, 5 μM Forward LUX Primer (COMTFL) 2 ไมโครลิตร, 5 μM Reverse LUX Primer (COMTRU) 2 ไมโครลิตร, 5 U/μl Platinum Taq DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ 18 ไมโครลิตร หลังจากนั้นดูดสารละลาย 18 ไมโครลิตรใส่ในหลอดแก้ว capillary ที่ใช้สำหรับเครื่อง LightCycler แล้วเติม 2 ไมโครลิตรของพลาสมิดที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในแต่ละหลอด แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง LightCycler ที่กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็น 94° C 2 นาที ในแต่ละรอบของ PCR กำหนดอุณหภูมิเป็น Denature 94°C 5 วินาที, Anneal 50°C 10 วินาที (กำหนดค่าเป็น single acquire) และ Extend 72°C 10 วินาที ทำซ้ำจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณของชิ้นส่วนยีน COMT ที่อยู่ในพลาสมิด ด้วยโปรแกรม Quantification Analysis แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปตรวจสอบโดยใช้ 3% Agarose gel electrophoresis โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 5 แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

3. การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน COMT ในชิ้นส่วนใบของยางพารา

นำชิ้นส่วนใบมาแยกสกัด Total RNA โดยใช้สารเคมี Concert Plant RNA Reagent ปฏิบัติตามขั้นตอนในข้อ 3 ทำการกำจัดดีเอ็นเอที่อาจจะปะปนอยู่ใน Total RNA โดยย่อยด้วย DNase I Amplification Grade ปฏิบัติตามขั้นตอนในข้อ 6 และหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA ปฏิบัติตามขั้นตอนในข้อ 4 หลังจากนั้นให้ตรวจสอบดูแถบ RNA ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis ปฏิบัติตามขั้นตอนในข้อ 5 แล้วจึงทำการสังเคราะห์ cDNA จาก Total RNA ของยางพาราโดยใช้ SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR โดยปฏิบัติตามขั้นตอนในข้อ 7

นำ cDNA ที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน CAD ด้วยเทคนิค Quantitative RT-PCR โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมดเป็น master mix ที่แต่ละหลอดประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร, 5 mg/ml BSA 1 ไมโครลิตร, 5 μM Forward LUX Primer (COMTFL) 2 ไมโครลิตร, 5 μM Reverse LUX Primer (COMTRU) 2 ไมโครลิตร, 5 U/μl Platinum Taq DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ 18 ไมโครลิตร หลังจากนั้นดูดสารละลาย 18 ไมโครลิตรใส่ในหลอดแก้ว capillary ที่ใช้สำหรับเครื่อง LightCycler หลังจากนั้นเติม 2 ไมโครลิตรของ cDNA Template จากข้อ 3 ลงในหลอดแก้วแต่ละหลอด และนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง LightCycler ที่กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็น 94° C 2 นาที ในแต่ละรอบของ PCR กำหนดอุณหภูมิเป็น Denature 94° C 5 วินาที, Anneal 50° C 10 วินาที (กำหนดค่าเป็น single acquire) และ Extend 72° C 10 วินาที ทำซ้ำจำนวน 45 รอบ หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน COMT ด้วยโปรแกรม Quantification Analysis โดยเปรียบเทียบกับค่า Standard ที่เตรียมจากพลาสมิด pGEM-T ที่มีชิ้นยีน COMT แทรกอยู่ ซึ่งมีความเข้มข้นของ Standard เท่ากับ 0.1, 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 pg โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาทั้งหมดเป็น master mix ครั้งเดียวกับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

4. การวิเคราะห์ค่า melting curve เพื่อหาค่า Tm ของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้

นำตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์การแสดงออกของยีนมาหาค่า melting curve โดยกำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็น 90°C 0 วินาที, 55°C 15 วินาที, 90°C 0 วินาที (กำหนดการเพิ่มของอุณหภูมิเป็น 0.1° C ต่อวินาที และกำหนดค่า เป็น continuous acquisition) และ 40°C 0 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ค่า melting curve ด้วยโปรแกรม Melting Curve Analysis

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง 2 ปี (ตุลาคม 2546 – กันยายน 2548)

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนชิ้นส่วนของยีน COMT จากยางพารา

จากการค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีน COMT จากฐานข้อมูล NCBI Sequence GeneBank ของพืชชนิดต่างๆ พบพืชที่มีรายงานยีน COMT ไว้ในฐานข้อมูล คือ *Clarkia breweri, Liquidambar styra, Saccharum officinarum, Lolium multifloru และ Festuca arundinac* และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมือนกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment พบลำดับเบสบางส่วนที่เหมือนกัน และพบส่วนที่มีลำดับเบส TACGGCGCCG CGCCCGTGTGC เพื่อใช้เป็น primer ด้าน 5' ร่วมกับ primer Oligo(dT_{20}) สำหรับเพิ่มปริมาณส่วนของยีน COMT จากยางพารา

จากการแยกสกัด Total RNA ของยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 พบว่า Total RNA ที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 518 ng/μl และมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 1.94 เมื่อนำไปตรวจสอบด้วย Agarose gel พบแถบของ RNA ส่วนที่เป็น 18S rRNA และ 28S rRNA (รูปที่ 1) แสดงให้เห็น Total RNA ที่ได้ไม่ถูกย่อยด้วย RNase การสกัด Total RNA โดยใช้ Concert Plant RNA Reagent ได้มีการนำไปใช้สกัดจากส่วนต่างๆ กับพืชชนิดอื่น เช่น หัวมันฝรั่ง ยอดสนขาว และใบมะเขือเทศ ซึ่งสามารถแยกสกัด Total RNA ได้คุณภาพสูงและมีปริมาณมาก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ได้ดีกับตัวอย่างพืชที่มีสารประกอบพวกฟีโนลิก และแป้งสูง แต่อย่างไรก็ตามการใช้ Concert Plant RNA Reagent จะต้องใช้อย่างระมัดระวัง เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีส่วนผสมของ β–mercaptoethanol และ sodium azide จึงต้องมีการใช้สารนี้ในตู้ดูดควันพิษ และต้องสวมถุงมือป้องกันการสัมผัสด้วย ในขณะที่ทำการสกัดนั้นทุกขั้นตอนของการสกัดหรือทำงานเกี่ยวกับ RNA จะต้องป้องกันการปนเปื้อนของ RNase ที่จะเข้าไปปะปนกับตัวอย่างแล้วจะไปย่อยสลาย RNA ได้ ถ้าหากผลจากการตรวจ RNA บน Agarose gel พบว่าแถบของ RNA ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและเกิดการ smear แสดงว่า RNA ถูกย่อยสลายด้วย RNase อาจจะส่งผลให้การสังเคราะห์ cDNA ไม่ประสบผลสำเร็จ นอกจากนี้ผลจากการสกัด Total RNA พบว่ามีปริมาณเพียงพอสำหรับการเปลี่ยน mRNA ของยีน

COMT ไปเป็น cDNA รวมทั้ง Total RNA ที่ได้ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ SuperScrip III Reverse Transcriptase ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย First Strand cDNA นอกจากนี้ในขั้นตอนก่อนการสังเคราะห์สาย cDNA สำหรับใช้ในงาน RT-PCR จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องกำจัดดีเอ็นเอจากส่วนของจีโนม ซึ่งอาจจะปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง Total RNA ที่เตรียมได้ โดยการเติม DNase I Amplification Grad ทั้งนี้เพื่อไม่ให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจากส่วนของจีโนม ซึ่งการทดลองนี้ต้องการเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนของยีนที่มีการแสดงออกในรูป mRNA ที่ทำให้เปลี่ยนรูปเป็น cDNA เท่านั้น

การสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR เป็นระบบที่สามารถสังเคราะห์ cDNA ที่มีความยาวตั้งแต่ 100 bp. จนถึงมากกว่า 12 kp และยังเป็นระบบที่สามารถใช้ปริมาณ Total RNA เริ่มต้นตั้งแต่ 1 pg ถึง 5 μg เนื่องจากเป็นระบบที่มีเอ็นไซม์ SuperScript III Revers Transcriptase ที่มีการนำเอาเอ็นไซม์ M-MLV Revers Transcriptase มาดัดแปรพันธุกรรมให้กิจกรรมของ RNase H ลดกิจกรรมลง และสามารถทำงานได้ในอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้สามารถใช้สังเคราะห์ cDNA ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 42°C – 55°C จึงเป็นข้อดีที่สามารถเพิ่มความจำเพาะ และสามารถสังเคราะห์สาย cDNA ได้สายยาวมากขึ้น อีกทั้งยังสามารถสังเคราะห์สาย cDNA จาก Total RNA ได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องแยก mRNA ให้บริสุทธิ์ก่อน เนื่องจาก ribosomal RNA และ Transfer RNA ที่อยู่ใน Total RNA ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์ SuperScript III Revers Transcriptase ได้ นอกจากนี้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาย cDNA ได้เติม RNaseOUT Recombinant ลงไปด้วยเพื่อยับยั้งการทำงานของ RNase ที่อาจจะปนเปื้อนมาในขั้นตอนการเตรียม RNA ไม่ให้ไปทำลาย Total RNA ที่สกัดได้ หลังจากการสังเคราะห์ cDNA เสร็จสิ้นแล้วต้องมีการกำจัด RNA ออก โดยการเติม RNase H ทั้งนี้เนื่องจากจะมีการจับกันระหว่าง RNA กับ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งจะส่งผลให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เกิดขึ้นน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าต้องการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอต้นแบบที่มีสายยาว แต่อย่างไรก็ตามต้องระวังอย่าให้ RNase H ปะปนอยู่ในปฏิกิริยาระหว่างการสังเคราะห์สาย cDNA เพราะจะไปทำลาย mRNA ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์สาย cDNA ที่ต้องการ

ผลจากการโคลนส่วนของยีน COMT จากยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 โดยใช้ primer TACGGCGCCGCGCCCGTGTGC ร่วมกับ primer Oligo$(dT)_{20}$ ด้วยเทคนิค PCR พบว่าการใช้ primer ทั้งสองสามารถเพิ่มปริมาณหรือโคลนชิ้นส่วนของยีน COMT จากยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 ได้แถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 550 bp. (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสของยีน COMT ในยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 มีบางส่วนที่เหมือนกันกับยีน COMT ในพืชชนิดอื่นๆ ที่ใช้เปรียบเทียบ

ความเหมือนในการออกแบบ primer ในปฏิกิริยาการเพิ่มประมาณยีน COMT ด้วยเทคนิค PCR ได้ใช้เอ็นไซม์ Platinum Taq DNA Polymerase ซึ่งเป็น hot start เอ็นไซม์ที่ใช้แอนติบอดีสำหรับยับยั้งกิจกรรมของเอ็นไซม์ไม่ให้ทำงานในอุณหภูมิปกติ แต่จะมีกิจกรรมก็ต่อเมื่อได้ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที ถึง 2 นาที จึงเป็นข้อดีของเอ็นไซม์ที่สามารถเพิ่มความจำเพาะ และได้ผลผลิต PCR มาก อีกทั้งยังทำให้การเตรียมปฏิกิริยา PCR มีความสะดวกมากขึ้น รวมทั้งยังกำจัดปัญหาการปนเปื้อนของปฏิกิริยาได้

จากการนำชิ้นส่วนของยีน COMT ที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกให้บริสุทธิ์โดยการแยกผ่านชิ้นวุ้น พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้มีดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ซึ่งมีปริมาณเพียงพอสำหรับนำเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ วิธีการทำให้ชิ้นส่วนของยีน COMT มีความบริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction นั้นเป็นระบบที่ใช้เทคโนโลยี spin column ที่ใช้ silica gel membrane เป็นตัวจับดีเอ็นเอไว้ ซึ่งในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงดีเอ็นเอจะจับอยู่กับ silica gel membrane และส่วนที่ไม่ต้องการจะถูกล้างไหลผ่าน column ไป นอกจากนี้การดูดซับดีเอ็นเอไว้กับ silica จะขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลาย ถ้าค่า pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.5 ดีเอ็นเอจะถูกจับไว้ 95% แต่ถ้า pH สูงขึ้นการจับของดีเอ็นเอจะลดน้อยลงมาก ดังนั้นในระหว่างการทดลองถ้าสังเกตเห็นสารละลายที่เติมบัฟเฟอร์ QG แล้วมีสีม่วง จะต้องเติม 10 ไมโครลิตรของ 3M Sodium acetate pH 5.0 เพื่อปรับค่า pH ให้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.5 โดยจะสังเกตเห็นสารละลายมีสีส้มก่อนที่จะใส่สารละลายลงใน column นอกจากนี้ในขั้นตอนการแยกเอาดีเอ็นเอที่จับกับ silica กลับคืนมา ถ้าต้องการใช้น้ำแทนบัฟเฟอร์ EB จะต้องมั่นใจว่าน้ำที่ใช้นั้นมี pH อยู่ระหว่าง 7.0 ถึง 8.5 ซึ่งการใช้น้ำมีข้อดีที่ไม่มีสารที่จะไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ แต่อาจจะมีผลทำให้การสูญเสียดีเอ็นเอได้ง่าย (QIAGEN, 2002)

ผลจากการนำชิ้นส่วนของยีน COMT ไปเชื่อมต่อกับ pGEM-T เวคเตอร์ และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* พบว่าประสบผลสำเร็จ โดยสามารถตรวจพบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งมีสีขาวเป็นจำนวนมาก การเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีน COMT กับเวคเตอร์ pGEM-T ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการโคลนชิ้นของ PCR เวคเตอร์นี้เตรียมได้มาจากการนำเวคเตอร์ pGEM-5Zf (+) ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoR V และเติม T ของเบสทั้งสองเส้น โดยจะมีลักษณะปลาย T ยื่นออกมา ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เหมาะสำหรับใช้เชื่อมต่อกับผลผลิต PCR ของยีน COMT ที่ถูกเติมด้วย A ทางด้านปลาย 3’ โดยเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase นอกจากนี้เวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยาให้มีการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์นั้น ในกรณีที่เป็นงานเร่งด่วนสามารถใช้เวลา 1 ชั่วโมง ในการบ่มที่อุณหภูมิห้อง แต่ประสิทธิภาพในการเชื่อมต่อจะน้อยลง แต่กรณีที่เป็น

งานทดลองที่ไม่มีความเร่งรีบมากนัก ให้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวคเตอร์เพิ่มมากขึ้น และเมื่อนำไปถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียจะได้โคโลนีที่เป็นสีขาวเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยกลไกลการเกิดโคโลนีสีขาวนั้นเป็นผลมาจากการที่ชิ้นส่วนของยีน COMT ที่สอดแทรกอยู่ในเวคเตอร์ไปขัดขวางการถอดรหัสของยีน β-galactosidase แต่ถ้าไม่มีการสอดแทรกของยีน COMT ในเวคเตอร์จะเกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า

การตรวจสอบเพื่อยืนยันผลที่ได้ด้วยเทคนิค Single Colony PCR พบว่าทุกโคโลนีที่มีสีขาวได้มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายไป แทรกอยู่ทุกโคโลนี การทำ PCR จากโคโลนีโดยตรงเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาโคโลนีเป้าหมายได้รวดเร็ว ไม่มีขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อ และไม่ต้องสกัดพลาสมิด ทำให้ทราบผลได้ภายใน 1 วันการแยกสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายจากแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α สามารถแยกพลาสมิดได้ 70 ng/μl และพลาสมิดที่สกัดได้โดยวิธีนี้มีปริมาณเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในปฏิกิริยาการหาลำดับเบส โดยมีระดับความบริสุทธิ์ที่ไม่ส่งผลยับยั้งปฏิกิริยาการหาลำดับเบสเมื่อใช้ BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing การแยกพลาสมิดในขั้นตอนนี้เป็นการแยกพลาสมิดที่ใช้ QIAprep Miniprep ที่ใช้ด่างทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกตัว และตามด้วยการใช้เทคโนโลยี silica membrane ดูดซับดีเอ็นเอไว้ เมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมก็สามารถชะล้างดีเอ็นเอออกจาก silica ได้ ถือได้ว่าเป็นระบบที่ปฏิบัติได้ง่าย รวดเร็ว และปลอดภัย เนื่องจากไม่ต้องใช้สารพวกฟีนอล คลอโรฟอร์ม และ เอทานอล นอกจากนี้ยังช่วยลดสารเคมีที่เหลือใช้จากห้องปฏิบัติการอีกด้วย

ผลจากการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน COMT ที่แทรกตัวอยู่ใน pGEM-T Vector ด้วย primer T7 และ SP6 เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาตัดส่วนที่เป็นเวคเตอร์ออกพบว่าลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน COMT ที่โคลนได้จากยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 มีขนาดเท่ากับ 549 bp. ซึ่งลำดับเบสได้หาโดยการใช้ BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing โดยมีส่วนประกอบของสารเคมีครบชุด ที่พร้อมสำหรับการหาลำดับเบสของสารพันธุกรรม เพียงแต่เติมพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน COMT สอดแทรกอยู่ และ primer T7 หรือ SP6 ในปริมาณที่เหมาะสมก็สามารถใช้ได้ทันที ซึ่ง primer T7 และ SP6 จะมีลำดับเบสที่เป็นเบสคู่สมกับตำแหน่งของเบสบนพลาสมิด pGEM-T ลำดับเบสที่ได้จากการใช้ primer T7 และ SP6 จะต้องนำมาวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของพลาสมิด pGEM-T แล้วตัดส่วนของเบสที่เป็นของพลาสมิดออกจึงได้ลำดับเบสของยีน COMT ที่ต้องการ

การเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน COMT กับพืชชนิดอื่นใน GenBank พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกันมากที่สุดกับ Liquidambar styraciflua รองลงมาคือ *Clarkia breweri, Saccharum*

officinarum, Lolium multiflorum และ *Festuca arundinacea* ซึ่งมีค่า Identity 47.5% 47.3% 44.4% 43.0% และ 42.8% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความเหมือนกันต่ำ ทั้งนี้เนื่องมาจากยีน COMT ในพืชชนิดต่างๆ ที่ทำการเปรียบลำดับเบสก็มีความเหมือนกันต่ำด้วย เช่น การเปรียบเทียบระหว่าง Liquidambar styraciflua กับ *Festuca arundinacea* มีค่า Identity เท่ากับ 45% ส่วน Liquidambar styraciflua กับ *Lolium multiflorum* มีค่า Identity เท่ากับ 45%เช่นกัน ซึ่งค่าที่ได้น้อยกว่าค่าความเหมือนกันระหว่างยีน COMT ในยางพารา กับ Liquidambar styraciflua จึงเป็นเหตุผลที่สนับสนุนว่าชิ้นส่วนของยีน COMT ที่โคลนได้จากยางพารามีค่าความเหมือนกับยีน COMT ในพืชชนิดอื่นๆ ต่ำ

2. ศึกษาการแสดงออกของยีน COMT ด้วยเทคนิค Quantitative Real Time RT-PCR

เมื่อนำลำดับการเรียงตัวของ ยีนที่โคลนได้จากยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 ไปออกแบบ primer ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน COMT ในยางพาราด้วยเทคนิค Quantitative Real-time PCR ด้วยใช้โปรแกรม D-LUX™ Designer ได้ลำดับเบสเพื่อใช้สังเคราะห์ primer (Forward : GGAATCCAAGGGGAAATTCG, Reverse : TTCAGCAGATGA TCCCATATTCTC) ที่ไม่มีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงนำมาตรวจสอบความจำเพาะ การที่ต้องนำ primer ที่ไม่มีการติดฉลากมาทดสอบก่อนนั้นเพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายได้ ในกรณีที่ primer นั้นมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากกว่าหนึ่งแถบ ซึ่งจะต้องเปลี่ยน primer คู่ใหม่ ดังนั้นการทดสอบ primer ก่อนทำการติดฉลากจึงมีความจำเป็น ในการทดลองนี้พบว่า primer ที่ได้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน COMT เพียงแถบเดียว ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 108 bp. (รูปที่ 3) จึงได้นำ Forward primer ไปสังเคราะห์ LUX primers ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงชนิด FAM เพื่อใช้ทดสอบปริมาณการแสดงออกของยีน COMT ในยางพารา ซึ่ง LUX primer เป็นชนิดของ primer ที่ใช้งานได้ง่าย มีความไวสูง และมีความเหมะสมกับงาน Real Time PCR ทั้งในด้าน Quantitative PCR (qPCR) และ RT-PCR (qRT-PCR) อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์หาค่า melting curve ของชิ้นดีเอ็นเอได้ โดยระบบนี้จะติดฉลากสารเรืองแสงที่ปลายด้าน 3’ ของ primer เพียงเส้นเดียว ส่วน primer อีกเส้นหนึ่งไม่มีการติดฉลาก ซึ่งเส้นที่ติดฉลากจะเติมเบส 4-6 เบสที่ปลายด้าน 5’ และมีเบสคู่สมกับด้าน 3’ ที่ติดฉลาก จึงทำให้โครงสร้างของ primer เป็นแบบ hairpin แล้วส่งผลให้การเรืองแสงของสารที่ติดฉลากลดลง แต่เมื่อ primer ปรากฏอยู่ในเส้นดีเอ็นเอที่เป็นสายคู่ในระหว่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สารเรืองแสงที่ใช้ติดฉลากจะมีการเรืองแสงเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า (Invitrogen, 2004) การใช้ LUX primer เป็นตัวตรวจจับดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Real Time PCR เป็นทางเลือกหนึ่งที่ค่อนข้างประหยัดกว่าการใช้เทคโนโลยี FRET (Fluorescene Resonance Enercy

Transfer) ที่สามารถกระทำได้ในลักษณะต่างๆ เช่น 1) Hybridization probe ที่ใช้ Oligonucleotide probe สายสั้นสองสาย 2) Hydrolysis probe (Taqman) ที่ใช้สาย Oligonucleotide เส้นเดียวแล้วติดฉลากด้วย Reporter dye และ Quencher dye 3) Molecular Beacons ที่มีการสังเคราะห์ probe ให้โค้งงอเป็น hair pin loop ซึ่งจะต้องติดฉลากด้วย Fluorochrome และ Quencher dye จะเห็นได้ว่าการใช้ LUX primer ค่อนข้างประหยัดกว่าระบบที่กล่าวข้างต้น ซึ่งใช้วิธีการติดฉลากที่สาย Oligonucleotide ที่ใช้เป็น primer เพียงที่เดียวเท่านั้น นอกจากใช้กับการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเชิงปริมาณแล้ว และใช้หาค่า melting curve ของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้อีกด้วย

ผลจากการสร้างค่า Standard เพื่อใช้เปรียบเทียบและคำนวณหาจำนวน copy number ของยีน COMT ในยางพารา โดยเตรียมจาก Plasmid pGEM-T ที่มีชิ้นยีน COMT แทรกอยู่ ที่ระดับความเข้มข้นของ Plasmid 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 pg เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ LUX primers ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงชนิด FAM (Forward:cgaat GGAATC CAAGGGGAAATT[FAM]G) Reverse :(TTCAGCAGATGATCCCATATTCTC) พบว่าสามารถตรวจสอบชิ้นของยีน COMT ที่แทรกตัวอยู่ใน Plasmid ได้ค่า Crossing Point ตั้งแต่ 46.61 46.03 41.69 34.96 29.92 26.27 22.85 และ 17.44 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่ใช้น้ำแทนดีเอ็นตั้งต้น (No Template Control : NTC) ให้ค่า Crossing Point เท่ากับ 47.82 ซึ่ง Standard ที่ได้มีค่า r.-0.99 slope. –4.342 intercept. 48.14 เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปตรวจสอบด้วย 3% Agarose gel electrophoresis (รูปที่ 4) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบตั้งแต่ 0.1 – 10,000 pg สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยไม่มีส่วนที่เป็น primer dimer ส่วนที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.001 pg ได้เกิดแถบดีเอ็นเอส่วนที่เป็น primer dimer ซึ่งจะส่งผลให้การตรวจวัดการเรืองแสงของ FAM ที่อยู่กับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายมีความผิดพลาดได้

จากการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน COMT ในใบของยางพาราพันธุ์ K21 โดยใช้ LUX primer ร่วมกับเทคนิค Two Step Quantitative Real-Time RT-PCR พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนได้ โดยตรวจสอบพบระดับการแสดงออกของยีน COMT เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า Standard มีค่าเท่ากับ 1.95 pg (รูปที่ 5) โดยชิ้นดีเอ็นเอของยีน COMT ที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม melting curve พบว่ามีค่า Tm เท่ากับ 81.2^{o} C

สรุปผลการทดลอง

จากการสกัด Total RNA ของยางพาราพันธุ์พันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 พบว่าได้ปริมาณ Total RNA 518 ng/μl และมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 1.94 สามารถนำไปใช้สังเคราะห์ cDNA เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน COMT โดยใช้ primer ที่ได้จากนำพืชชนิดอื่นมาหาลำดับเบสส่วนที่เหมือนกัน เมื่อนำมาใช้ร่วมกับ primer Oligo$(dT)_{20}$ พบว่าสามารถนำมาเพิ่มปริมาณส่วนของยีน COMT จากยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50 ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 bp. และชิ้นดีเอ็นเอนี้เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธ์สามารถนำเข้าไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pGEM-T และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ DH5α ได้สำเร็จ โดยโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้นเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าทุกโคโลนีมีการแทรกของชิ้นส่วนยีน COMT เมื่อนำโคโลนีเพิ่มปริมาณแล้วสกัดพลาสมิดได้เท่ากับ 70 ng/μl และนำไปหาลำดับเบสพบว่าชิ้นดีเอ็นเอของยีน COMT มีขนาดเท่ากับ 549 bp. โดยมีลำดับเบสเหมือนกันมากที่สุดกับ Liquidambar styraciflua ลำดับเบสที่ได้สามารถนำไปใช้ออกแบบ LUX primer ที่ให้ความจำเพาะกับยีน COMT และสามารถใช้ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Two Step Quantitative Real-Time RT-PCR จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน COMT ในใบยางพาราพันธุ์ K21 เมื่อเทียบกับค่าดีเอ็นเอมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 1.95 pg โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีค่า melting curve เท่ากับ 81.2°C

อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ได้ primer ที่สามารถตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน COMT ในยางพาราเท่านั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนำ primer ที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนกับยางพาราพันธุ์ต่างๆ ที่ให้เนื้อไม้สูงและต่ำ เพื่อให้ทราบข้อมูลระดับการแสดงออกของยีน COMT ในยางพาราแต่ละพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจในการคัดเลือกพันธุ์ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ยางเพื่อเนื้อไม้ ต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ยางพาราสำหรับใช้ในการทดลองในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สรรพกิจ ถาวรวงศ์. 2544. เอกสารประกอบการสัมมนายางพาราแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 4 เรื่อง "พัฒนายางพาราไทย กู้ภัยเศรษฐกิจ"

หน่วยไวรัสวิทยาและจุลชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2542. http://www.virusrama.org/real_time_pcr/real_time_PCR.htm

Appliedbiosystems. 2003. Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR. http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/ quant_pcr.pdf.

Baucher M., Monties B., Van Montagu M, and Boerjan W. 1998. Crit. Rev. Plant Sci. 17, 125 -197.

Chabannes M, Ruel K, Yoshinaga A, Chabbert B, Jauneau A, et al. 2001. In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. Plant J. 28: 271-82.

Chung Kyoon and Wang Zengyu. 2000. Molecular cloning and characterization of caffeic acid o- methytransferase cDNA from Tall fuscue (*Festuca arundinacea* Schreb.). American Society of Plant Biologests. http://abstracts.org/pb2000/public/P30/0430.htm.

Jones L, Ennos AR, Turner SR. 2001. Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severly lignindeficient mutant of Arabidopsis. Plant J. 26: 205-16.

Invitrogen. 2004. Instruction manual of LUX fluorogenic primers for real time PCR and RT-PCR. Invitrogem.com.

Larson. P. R. 1994. The Vascular Cambium: Development and Structure. Springer Series in Wood Science (Springer, Berlin).

Meyer K., Cusumano J. C. Somerville C. and Chapple C. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA .93, 6869-6874.

Pear J. R., Kawagoe Yl., Schreckengost W. E., Delmer D. P. and Stalker D. M. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12637-12642.

Qing Hu Ma, Yang Xu, Zhan Bing Lin and Ping He. Cloning of cDNA encoding COMT from wheat which is differentially expressed in lodging sensitive and resistant

cultivars. Journal of Experimental Botany, 53 : 2281-2282.

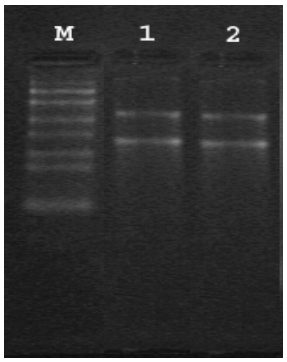
QIAGEN. 2003. QIAprep miniprep handbook. pp. 1-23.

Ralph J, Lapierre C, Marita JM, Kim H, Lu F, et al. 2001. Elucidation of new structure in lingins of CAD and COMT deficient plants by NMR. Phytochemistry. 57 : 993-1003.

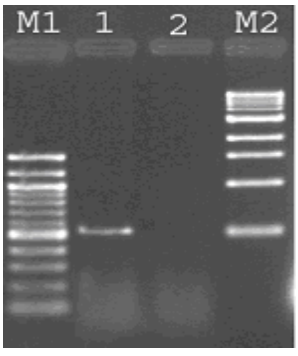
Takabe K, Nakashma J, Hibino T, et al, 1995. Control of Lignification in Plant Cell Wall. http://www.metla.fi/iufro/iufro95abs/d5pap13.htm

Telewski F. W., Aloni R. And Sauter J. J. 1996. In Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation, eds. Stettler R. F., Bradshaw H. D., Heilman P. E. and Hinckley T. M. (NRC Research, Ottawa, ON, Canada), pp. 301-330.

Wawrik B, Paul J.H. and Tabita F.R, 2002. Real-Time PCR Quantification of *rbcL* (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase) mRNA in Diatoms and Pelagophytes. Applied and Environmental Microbiology. Aug. 3771-3779.

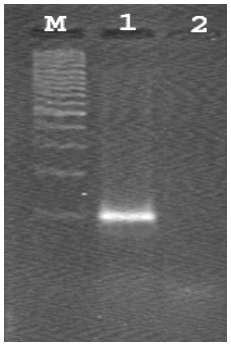


รูปที่ 1 แสดง Total RNA ที่แยกด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide M :RNA Ladder High Range (Fermentas), 1 - 2 : Total RNA ที่สกัดได้จากยางพาราพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50

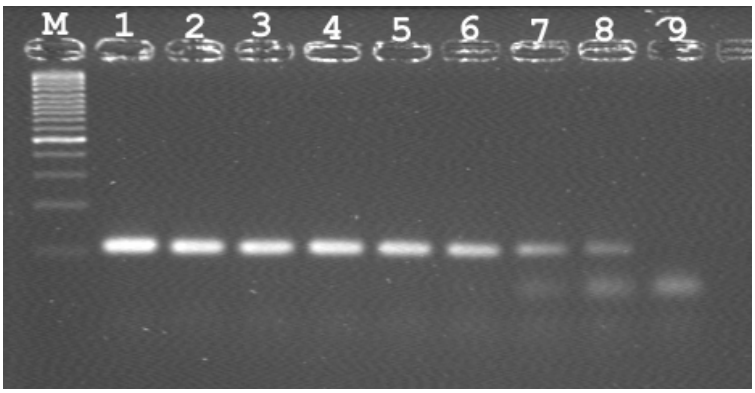


รูปที่ 2 แสดงชิ้นส่วนของยีน COMT ที่เพิ่มปริมาณได้จากยางพันธุ์ฉะเชิงเทรา 50, M1 :100 bp

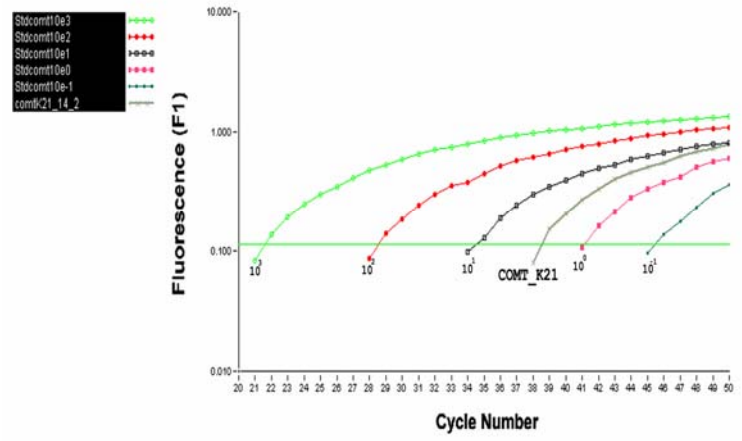
DNA Ladder,1 : ชิ้นส่วนยีน COMT ขนาด 550 bp. 2 : Control PCR (น้ำ) และ M2 :1Kb DNA Ladder



รูปที่ 3 แสดงการตรวจสอบความจำเพาะยีน COMT, M : 100 bp.DNA Ladder, 1 : แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากการใช้ LUX primers ขนาดเท่ากับ 108 bp. , 2 : control PCR



รูปที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากการใช้ Plasmid pGEM-T ที่มีชิ้นยีน COMT แทรกอยู่ (Standard DNA) ช่องที่ 1 - 8 10,000 - 0.001 pg , 9 :น้ำ, M : 100 pb.DNA Ladder



รูปที่ 5 กราฟแสดงปริมาณการแสดงออกของยีน COMT ในใบของยางพาราพันธุ์ K21 กับค่า Standard DNA ที่ระดับความเข้มข้น 1000 - 0.1 pg