



รายงานโครงการวิจัย

การค้นหาคและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

The Discovery and Functional Studies of genes for Crop
Improvement using Modern Biotechnology

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวอรุณทัย ซาววา

Miss. Aroonothai Sawwa

ปี พ.ศ. 2560



รายงานโครงการวิจัย

การค้นหาคและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

The Discovery and Functional Studies of genes for Crop
Improvement using Modern Biotechnology

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวอรุณทัย ซาววา

Miss. Aroonothai Sawwa

ปี พ.ศ. 2560

คำปรารภ

รายงานโครงการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ฉบับนี้ เป็นการศึกษาค้นหายีน ตรวจสอบยีน หน้าที่ของยีน และโคลนยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร รวมถึงศึกษาการแสดงออกยีนในพืชต้นแบบ และถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ มีกิจกรรมภายใต้โครงการจำนวน 3 กิจกรรม มีการทดลองรวมทั้งสิ้นจำนวน 9 การทดลอง ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 การตรวจสอบยีน และศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

การทดลองที่ 1.1 การตรวจสอบการแสดงออกของไซโคลฟิลินและนีโอมายซินฟอสโฟทรานสเฟอเรสพืด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวพาจ

การทดลองที่ 1.2 การตรวจสอบการกลายของยีนที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

กิจกรรมที่ 2 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ

การทดลองที่ 2.1 การโคลนยีนและการแสดงออกของยีน *N-acetylglutamate synthase* เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ

การทดลองที่ 2.2 การโคลน ถ่ายฝากและศึกษายีน *GmPR1* เพื่อความต้านทานโรคในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* สำหรับเตรียมการถ่ายฝากสู่ถั่วเหลือง

การทดลองที่ 2.3 การถ่ายฝากยีน ERD15 ที่อยู่ในรูป RNAi เข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) และศึกษาการแสดงออกของยีน

การทดลองที่ 2.4 การโคลนยีน PIS (Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะทนแล้งในพืชทนแล้ง

การทดลองที่ 2.5 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *calreticulin* และ *calmodulin* เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืชต้นแบบ

กิจกรรมที่ 3 การศึกษาพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่และการทดสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม

การทดลองที่ 3.1 การถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) เข้าสู่หน่วว

การทดลองที่ 3.2 การโคลนยีนและการถ่ายยีนควบคุมการเกิดสีม่วง-น้ำเงินสู่กุหลาบ

ระยะเวลาการดำเนินงานวิจัยโครงการนี้ เดิมเริ่มดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2558 และสิ้นสุดในเดือนกันยายน 2564 แต่เนื่องจากไม่ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยต่อเนื่องในปี 2561 ทุกรายการทดลองจึงสรุปการดำเนินงานทดลองถึงเดือนกันยายน 2560 ดังนั้นจึงได้จัดทำรายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์ขึ้น ซึ่งข้อมูลการวิจัยที่ได้อาจไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ อย่างไรก็ตามผลการวิจัยตลอดระยะเวลา 2 ปี ทำให้ได้ข้อมูลเทคนิควิธีการและยีนบางส่วนที่สามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปได้ในอนาคต

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัย และผู้ที่สนใจเทคนิควิธีการทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ และนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป



(นางสาวอรุณทัย ชาววา)

หัวหน้าโครงการวิจัยฯ

มีนาคม 2561

สารบัญ

	หน้า
กิตกรรมประกาศ	5
ผู้วิจัย	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	7
บทนำ	8
บทคัดย่อ	12
กิจกรรมที่ 1 การตรวจสอบยีน และศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร	15
การทดลองที่ 1.1 การตรวจสอบการแสดงออกของไซโคลฟิลินและนีโอมายซินฟอส	15
โพทรานสเฟอเรสด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ	
การทดลองที่ 1.2 การตรวจสอบการกลายของยีนที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อ	28
โรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ	
กิจกรรมที่ 2 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ	46
การทดลองที่ 2.1 การโคลนยีนและการแสดงออกของยีน <i>N-acetylglutamate</i>	46
<i>synthase</i> เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ	
การทดลองที่ 2.2 การโคลน ถ่ายฝากและศึกษา ยีน <i>GmPR1</i> เพื่อความต้านทานโรค	70
ในพืชต้นแบบ <i>Arabidopsis thaliana</i> สำหรับเตรียมการถ่าย	
ฝากสู่ถั่วเหลือง	
การทดลองที่ 2.3 การถ่ายฝากยีน ERD15 ที่อยู่ในรูป RNAi เข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ)	81
และศึกษาการแสดงออกของยีน	
การทดลองที่ 2.4 การโคลนยีน PIS (Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase ที่	96
เกี่ยวข้องกับสภาวะทนแล้งในพืชทนแล้ง	
การทดลองที่ 2.5 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน <i>calreticulin</i> และ	106
<i>calmodulin</i> เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืช	
ต้นแบบ	
กิจกรรมที่ 3 การศึกษาพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่และการทดสอบพืช	129
ดัดแปลงพันธุกรรม	
การทดลองที่ 3.1 การถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) เข้าสู่หน้าว	129
การทดลองที่ 3.2 การโคลนยีนและการถ่ายยีนควบคุมการเกิดสีม่วง-น้ำเงินสู่กุหลาบ	136
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	148
บรรณานุกรม	150
ภาคผนวก	159

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทดลองวิจัย ขอขอบคุณ ผศ. ดร. รัชณี อังประยูร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ดร.อลงกรณ์ กรณ์ทอง (รองอธิบดีกรมการข้าว อดีตดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ) ดร.สมศักดิ์ ศรีสมบูรณ์ (อดีตผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ สวพ.1) ดร.กษิตศ ดิษฐบรรจง (ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) และ ผอ.ชยานิจ ดิษฐบรรจง (ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ) ที่ให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณ คุณฉลาด ไหวติง คุณศุภรสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ คุณวัชรินทร์ ศรีประยูร และคุณวิภาวรรณ วงศ์สุทธิ ที่ช่วยงานในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณสถาบันวิจัยพืชสวนศรีสะเกษ และศูนย์วิจัยพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดมะละกอและตัวอย่างใบมะละกอสำหรับการศึกษาทดลองในครั้งนี้ ขอขอบคุณพนักงานราชการ และพนักงานอัตราจ้างของ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่กรุณาให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้การทดลองดำเนินไปได้เป็นอย่างดี

ผู้วิจัย

อรุณทัฬห ชาววา	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อัจฉราพรรณ ใจเจริญ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
สุภาวดี จ้อเหรียญ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
จิราพร แก่นทรัพย์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
พยงค์ศักดิ์ รวยอารี	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
กุหลาบ คงทอง	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภรณี สว่างศรี	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประสาน สืบสุข	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อำไพ สิ้นพัฒนานนท์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
สมชาย หลวงสนาม	สังกัด มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
กัลยา เกาะกากลาง	สังกัด ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง
อำนวยการ อรรถถังรอง	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
ศรีเมฆ ชาวโพงพาง	สังกัด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

V _L	= Light chain	V _H	= Heavy chain
L	= Liters	ml	= Milliliters
kg	= Kilograms	cm	= Centimeters
hr	= Hour	%	= Percentage
°C	= Degree Celsius	μl	= Microliters
μM	= Micromoles	mM	= Millimoles
ng	= Nanograms	mg	= Milligrams
g	= Grams	rpm	= Rounds per Minute

บทนำ

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มีบทบาทสำคัญต่อการวิจัยและพัฒนาทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เนื่องจากสามารถช่วยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ปกติ (conventional breeding) ให้ง่ายและรวดเร็วขึ้น ดังนั้นจึงมีการนำเอาเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การโคลนยีน (genes cloning) เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เทคโนโลยีดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ต้องมีการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของยีนก่อนจะนำมาประยุกต์ใช้ ยกตัวอย่างเช่น การค้นหายีน (Gene Discovery) เป็นการดำเนินงานวิจัยในการค้นหาตำแหน่งยีนที่เป็นลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจหรือมีประโยชน์ทางการเกษตร เช่น การสร้างห้องสมุดชิ้นส่วนขนาดใหญ่จีโนม (BAC Library) ทำแผนที่จีโนมทางกายภาพ (Physical Mapping) และการหาลำดับเบสขนาดใหญ่ เมื่อได้ยีนตามลักษณะที่ต้องการจึงนำมาการศึกษาหน้าที่ยีน (Functional Genomics) เช่น การศึกษาแสดงออกของยีน (gene expression) ที่ตอบสนองต่อสภาวะต่างๆ ศึกษาการถ่ายยีนให้มีการแสดงออกที่มากกว่าปกติ (Over-expression) หรือศึกษาการถ่ายยีนให้ยับยั้งการทำงานของอาร์เอ็นเอที่สนใจ (RNA interference) เพื่อนำไปสู่การหาหน้าที่ของยีนจากพืช การศึกษาดังกล่าวจะเป็นแหล่งข้อมูลที่สามารถรวบรวมไว้เป็นฐานข้อมูล สามารถสืบค้นหาข้อมูลได้ประกอบด้วยลำดับดีเอ็นเอของพืช สามารถทำนาย (prediction) บทบาทหน้าที่และการทำงานของยีนต่างๆ รวมถึงโครงสร้างของโปรตีนซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในการแสดงออกของยีนและโปรตีนได้ดียิ่งขึ้น

ปัจจุบันสภาพแวดล้อมของโลกมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว สาเหตุหนึ่งเกิดจากภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) หรือ ภาวะโลกร้อน (Global Warming) ซึ่งมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น และเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ทำให้ไม่สามารถคาดการณ์ปริมาณน้ำฝนที่ตกในแต่ละปีได้ อาจเกิดสภาวะน้ำท่วมฉับพลัน หรือเกิดความแห้งแล้งอย่างรุนแรง มีการระบาดของโรคและแมลง ส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไปโดยอาศัยวิธีการแบบปกติที่ผ่านมานั้นไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร และต้องอาศัยระยะเวลาในการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะตรงตามต้องการ นักวิจัยส่วนใหญ่ได้พยายามหาแนวทางการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยนำเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่เข้ามาช่วยในการพัฒนาพันธุ์พืชกันมากขึ้น และเป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหาอันเกิดจากภาวะโลกร้อน อีกทั้งยังเป็นการช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกทางหนึ่ง นอกจากนี้การพัฒนาพันธุ์พืชให้มีความต้านทานต่อโรคและแมลงหรือมีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ด้วยการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีปกตินั้น ต้องใช้เวลา พื้นที่ แรงงาน และค่าใช้จ่ายมาก นอกจากนี้การปรับปรุงพันธุ์ในอดีต เมื่อได้พันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคแล้ว แต่เวลาผ่านไปพันธุ์เหล่านั้นมีความต้านทานต่อโรคลดลง ดังนั้นเทคนิคการโคลนยีนและถ่ายฝากยีนที่พัฒนาลักษณะที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาพันธุ์พืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถเลือกยีนที่ส่งผลต่อลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการได้อย่างเจาะจง กระบวนการปฏิบัติรวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีปกติลดภาระการทำงาน และค่าใช้จ่ายในการดูแลพืชได้

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตรในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ ได้แก่ จุลินทรีย์ยีสต์ สาหร่ายต้นแบบ (*Chlamydomonas reinhardtii*) หรือ พืชต้นแบบ เช่น มะเขือเทศ ยาสูบ และอราบิดอบซิส ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ ถูกใช้ในการศึกษาด้านการแสดงออกของยีนอย่างแพร่หลาย เนื่องจากวงจรชีวิตสั้น ทราบลำดับสารพันธุกรรมทั้งหมด การถ่ายฝากยีนสามารถทำได้ง่าย และต้นพืชมีขนาดเล็กทำให้ไม่เปลืองพื้นที่ในการทดลองจึงสามารถปลูกในห้องทดลองได้ หลังจากทราบข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของยีนแล้วก็จะสามารถ

นำมาประยุกต์ใช้กับพืชที่ต้องการและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น การสร้างพืชให้ต้านทานต่อโรคและแมลง การสร้างพืชที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมไม่ว่าจะเป็น สภาวะแล้ง ดินเค็ม หรือน้ำท่วม นอกจากนี้การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกต่างประเทศ ภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา แนวทางการสร้างสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นการนำการวิจัยทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ร่วมกับงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่ไม้ดอกที่สำคัญหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการส่งออกไม้ดอกในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อค้นหา ยีน ตรวจสอบ ยีน ศึกษาหน้าที่ของยีนและโคลนยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ศึกษาการแสดงออกยีนในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ และถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ในพืชเศรษฐกิจต่อไป

วิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การตรวจสอบยีน และศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

การทดลองที่ 1.1 การตรวจสอบการแสดงออกของไซโคลฟิลินและนีโอมายซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส ด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ

ทำการผลิตคลังแอนติบอดี (Antibody library) โดยโคลนยีนแอนติบอดีจากหนูด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (phage display) จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ไซโคลฟิลินและ NPT II คัดเลือกแอนติบอดีจากคลังแอนติบอดี ตรวจสอบคุณสมบัติของแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไซโคลฟิลินและ NPT II นำแอนติบอดีที่ได้ไปคัดเลือก/ตรวจสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรม ด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา เช่น ELISA และ Western blotting นอกจากนี้คลังแอนติบอดีที่ผลิตได้ ยังสามารถนำไปใช้คัดเลือกโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยไม่ต้องมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันสัตว์ทดลองอีก เพื่อใช้ในการตรวจสอบต่อไปในอนาคตได้ด้วย

การทดลองที่ 1.2 การตรวจสอบการกลายของยีนที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

ทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบการกลายของยีนในมะละกอที่มีการกลายพันธุ์ตามวิธีธรรมชาติ และมะละกอที่ได้รับการกลายพันธุ์โดยขั้นตอนที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenesis) โดยศึกษา ยีนที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ได้แก่ ยีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation initiation factors) และยีนในกลุ่มกระบวนการ RNA silencing โดยการโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม เพื่อศึกษาความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายของยีนส่งผลให้ลำดับอะมิโนแอซิดของมะละกอเปลี่ยนแปลงไป

กิจกรรมที่ 2 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ

การทดลองที่ 2.1 การโคลนยีนและการแสดงออกของยีน *N-acetylglutamate synthase* เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ

ทำการโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารออร์นิทีน (ornithine) อาร์จินีน (arginine) และโพรลีน (proline) ในพืช ซึ่งช่วยให้พืชสามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะเครียดอันเนื่องมาจากสภาวะขาดน้ำ โดยทำการโคลนยีน NAGS จากพืช และนำยีนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีน NAGS ในพืชต้นแบบ เพื่อให้ทราบกลไกการทำงานของยีนภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยสามารถนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เพื่อเพิ่มศักยภาพในลักษณะการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้

การทดลองที่ 2.2 การโคลน ถ่ายฝากและศึกษายีน *GmPR1* เพื่อความต้านทานโรคในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* สำหรับเตรียมการถ่ายฝากสู่ถั่วเหลือง

ทำการโคลนและถ่ายฝากยีนต้านทานโรค *GmPR1* ในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การทดลองที่ 2.3 การถ่ายฝากยีน ERD15 ที่อยู่ในรูป RNAi เข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) และศึกษาการแสดงออกของยีน

ทำการโคลนและถ่ายฝากยีน *ERD15* ในรูปแบบ RNAi ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งหรือในสภาวะขาดน้ำในยาสูบ

การทดลองที่ 2.4 การโคลนยีน PIS (Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งในพืชทนแล้ง

ทำการโคลนและถ่ายฝากยีน *PIS* ในรูปแบบ over-expression ที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งหรือในสภาวะขาดน้ำในยาสูบ

การทดลองที่ 2.5 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *calreticulin* และ *calmodulin* เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืชต้นแบบ

ทำการโคลนยีน *calreticulin* และ *calmodulin* ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมภาวะสมดุลแคลเซียมไอออนภายในเซลล์พืช ซึ่งช่วยให้พืชสามารถมีชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็ม โดยทำการโคลนยีน *calreticulin* และ *calmodulin* จากพืช และนำยีนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *calreticulin* และ *calmodulin* ในพืชต้นแบบ เพื่อให้ทราบกลไกการทำงานของยีนภายใต้สภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็ม โดยสามารถนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เพื่อเพิ่มศักยภาพในลักษณะการทนทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้

กิจกรรมที่ 3 การศึกษาพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่และการทดสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรม

การทดลองที่ 3.1 การถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) เข้าสู่หน้วว

ทำการถ่ายยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)* ที่โคลนได้จากอัญชันหรือพิทูเนียสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นยีนที่โคลนได้และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกแล้วในยาสูบ เข้าสู่ดอกหน้าวัว

การทดลองที่ 3.2 การโคลนยีนและการถ่ายยีนควบคุมการเกิดสีม่วง-น้ำเงินสู่กุหลาบ

ทำการโคลนยีน *DFR* จากดอกอัญชันที่มีสีน้ำเงิน และโคลนยีน *DFR* จากดอกกุหลาบที่มีสีแดง เพื่อนำยีนทั้งสองไปสร้างเป็นชุดยีน ที่ประกอบด้วยยีน *F3' 5'H* ที่โคลนได้จากอัญชันสีน้ำเงิน โดยชุดยีนประกอบด้วย ชุดยีนที่มียีน *DFR* จากดอกกุหลาบที่ออกแบบให้มีการขัดขวางการทำงานของยีน *DFR* ในดอกกุหลาบพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้เทคนิค RNAi ควบคู่กับการเพิ่มการแสดงออกของยีน *DFR* จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน และยีน *F3'5'H* จากดอก ออัญชันสีน้ำเงิน ในเวลาเดียวกัน จากนั้นนำชุดยีนที่เตรียมได้เข้าสู่ binary vector และนำ binary vector ที่มียีนเป้าหมาย มาฝากถ่ายเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้ถ่ายเข้าสู่กุหลาบ

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ เป็นการใช้กระบวนการและเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงสิ่งมีชีวิตให้ได้ลักษณะต้องการ มีประโยชน์ต่อการพัฒนาทางด้านการเกษตร สามารถช่วยพัฒนาพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะที่ดีตามที่ต้องการได้รวดเร็วขึ้น โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหายีนตรวจสอบยีน ศึกษาหน้าที่ของยีน โคลนยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ศึกษาการแสดงออกยีนในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ และถ่ายยีนเข้าสู่พืช โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ ที่จำเพาะต่อโปรตีนไซโคลฟีน (CyP) และนีโอมาซินฟอสโฟทรานสเฟอเรสทู (NPT II) โดยใช้ชุดไพรเมอร์ตัดแปลงโคลนยีน VH และ VL จาก B-cell ของหนู พบว่า Phage-scFv library ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีน NPT II และ Cry1Ab ส่วนการตรวจสอบการกลายของยีน *CpELF4E* และ *CpRDR6* จากมะละกอที่มีขนาด 711 และ 3,588 คู่เบส สามารถถอดรหัสได้ 236 และ 1,194 อะมิโนเอซิด ตามลำดับ พบยีน *CpRDR6* ในตัวอย่าง HF39 ต้นที่ 1 มีลำดับอะมิโนเอซิดที่แตกต่างจากทุกตัวอย่างถึง 36 อะมิโน และพบความแตกต่างของอะมิโนเอซิดที่สัมพันธ์กับตัวอย่างที่ทนทานต่อไวรัส คือ ลำดับอะมิโน P (proline) ในตัวอย่างที่ทนทานแต่ไม่พบในตัวอย่างต้นที่อ่อนแอต่อไวรัสเลย โครงการวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนจากหลายพืช โดยทำการโคลนยีน *NAGS* ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เชอรี่ พันธุ์ท้อ และพันธุ์สีดา ได้ยีนขนาด 1,812 คู่เบส ถอดรหัสได้ 604 อะมิโนเอซิด เชื่อมต่อเข้ากับ pCAMBIA2300 มีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส สำหรับการโคลนยีน *GmPR1* ในถั่วเหลือง มีขนาด 525 คู่เบส และชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080* ที่มีการแสดงออกสูงในส่วนใบ ดอก และราก มีขนาด 1,000 คู่เบส การออกแบบและสังเคราะห์ยีน *ERD15* ให้มีขนาดเท่ากับ 609 คู่เบส แล้วเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pRNAi-GG ได้ ihpRNAi+GG คอนสตรัคส์ มีประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีน *ERD15* เข้าสู่ต้นพืชยาสูบค่อนข้างต่ำเมื่อใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเติบโตเป็นแคลลัสได้ การสังเคราะห์และการถ่ายยีน *PIS* ที่เชื่อมกับไบนารีเวกเตอร์ pCAMBIA2300 ยังไม่ได้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน ต้องมีการปรับสภาวะการทดลองเพื่อให้ได้ต้นยาสูบที่ประกอบด้วยยีน *PIS* ต่อไป การโคลนยีน *CRT* และ *CaM* ในข้าวโพด ได้ขนาดยีน 1,263 และ 450 คู่เบส สามารถถอดรหัสได้ 421 และ 150 อะมิโนเอซิด ตามลำดับ การถ่ายยีน *F3' 5'H* ที่โคลนได้จากอัญชันสีน้ำเงิน เข้าสู่หน้าวัวโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 สามารถนำไปถ่ายฝากเข้าสู่หน้าวัวพันธุ์ไซเนตและพันธุ์ราปิโด ได้แคลลัสหน้าวัวหน้าที่ได้รับจากการถ่ายยีน และผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin สำหรับนำไปเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไป และการโคลนยีน *DFR* จากดอกอัญชันสีน้ำเงินและกุหลาบสีแดง ได้ยีนขนาด 1,400 และ 1,050 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลยีนและการโคลนยีนที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปสร้างชุดยีน ใช้เป็นข้อมูลและแนวทางสำหรับการพัฒนาพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจ เพื่อเพิ่มศักยภาพการต้านทานโรค ทนต่อสภาวะขาดน้ำ และเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรได้ต่อไปในอนาคต

Abstract

The modern biotechnology is a newer application of biotechnology, such as genetic engineering for breeding some requirement of good agricultural characterization. They are useful for rapidly developing and improving of crop breeding. The aims of this project for gene discovery; gene assay; the study of gene function; gene cloning; gene expression and plant transformation using modern biotechnology. This project was researched the monoclonal antibody for GM plant detection, was produced by phage display technology, which specific to Cyp and NPT II. The Phage libraries were generated from mouse B- cell (VH and VL genes), found that the Phage-scFv could bind with NPTII and Cry1Ab protein. The mutation assay of *Cpelf4E* and *CpRDR6* genes from papaya shown 36 differences amino acids of *CpRDR6* in HF39 No.1 when compared with all samples. The P (proline) amino sequence has found and related to papaya resistance samples (KK80-Florida 67, Khonkhen 80 No.2, Male Florida and Female Florida), but has not been found in the samples that represent to susceptible papaya tree. This project research was cloned several genes from plants. First gene is *NAGS* gene that play a critical role in regulating plant responses in order to survive under drought stress. It was cloned from three tomato varieties, Cherry, Tho and Seeda, the 9,345 bp of ORF were obtained. The *NAGS* genes were inserted to pCAMBIA2300 plant expression vector with a total size of 11.5 kb. Next, 525 bp of *GmPR1* gene were cloned from soybean. And, the promoter of *Glyma04g05080* gene that it regulates genes to be highly expressed in leaves, flowers and roots, while little expressed in seed and not expressed in seed of harvest time, with the length of 1,000 bp was cloned. For the *ERD15* gene has been designed and synthesized by GeneArt. The full-length of synthesized *ERD15* is 609 bp, was constructed into pRNAi-GG plant expression vector. The ihpRNAi+GG construct was successfully transformed for analysis of the growth of transgenic plants into tobacco plants by agrobacterium-mediated transformation. The results showed that the transformants examined could not be grown onto the MS media+cefotaxim+kanamycin using agrobacterium LBA4404 strain. Moreover, 648 bp of *PIS* gene has been synthesized, and constructed to the plant expression vectors, pCAMBIA2300, pRI909 and pRI910, it has been not successful to transformation in tobacco plant also need to further studies. In the other, *CRT* and *CaM* genes were cloned from corn. The gene sequence contains a fragment of 1,263 bp and 450 bp complete ORF, which encoded the 421 and 150 amino acid polypeptide. Consequence, the *F3'5'H* gene was successfully transformed into *Anthurium spp.* cv. Sonate and cv. Rahpido using *A. tumefaciens*. The transformed were selected on media containing hygromycin. Subsequently, they will to be cultured to complete plants and checked by PCR analysis using specific primers. The last study, the *DFR* gene was cloned from *Clitoria ternatea* and *Rosa hybrida*, generating 1,400 bp and 1,050 bp respectively. The *DFR* cloned can be used to construct gene combination with the *F3'5'H* gene from *Clitoria*

ternatea, generating *DFR* - *F3'5'H* gene cassettes for modification of flower colors in economic rose. However, the information about genes and gene cloning cassettes from this project could be benefit for improvement and breeding program in economic crop plants, to potentially increasing of disease resistance, drought tolerance and value added of agriculture production in the future.

กิจกรรมที่ 1

การตรวจสอบยีน และศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

การทดลองที่ 1.1

การตรวจสอบการแสดงออกของไซโคลฟิลินและนีโอไมซินฟอสโฟทรานสเฟอเรสทู ด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ

Verification of Cyclophilin and Neomycin Phosphotransferase II (NPT II) Using Phage Display Technique

อัจฉราพรรณ ใจเจริญ

ภุมรินทร์ วณิชชานันท์

สุภาวดี ง้อเหรียญ

คำสำคัญ

การแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (Phage display), คลังแอนติบอดี (antibody library), ไซโคลฟิลิน (Cyclophilin), Neomycin phosphotransferase II (NPT II)

บทคัดย่อ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (phage display technique) เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม สามารถใช้กับแอนติเจนได้หลากหลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library) จากหนูเมาส์ที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้น เพื่อนำมาคัดเลือก Phage-scFv ที่จำเพาะต่อโปรตีนไซโคลฟิลิน (CyP) และนีโอไมซินฟอสโฟทรานสเฟอเรสทู (NPT II) โดยใช้ชุดไพรเมอร์ดัดแปลงโคลนยีน VH และ VL จาก B cell ของหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c จำนวน 5 ตัว นำยีน VH และ VL เชื่อมต่อกันเพื่อสร้างเป็นชิ้น single chain variable fragment (scFv) ด้วยเทคนิค overlap extension PCR และโคลนเข้ากับเวกเตอร์ pCANTAB 5e (Amersham Pharmacia Biotech, UK) ถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย สามารถคำนวณขนาดของ Phage-scFv library ได้เท่ากับ 1.64×10^{10} นำ Phage-scFv library ที่ได้ทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีนด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR) พบว่า Phage-scFv library ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีน NPT II และ Cry1Ab ได้

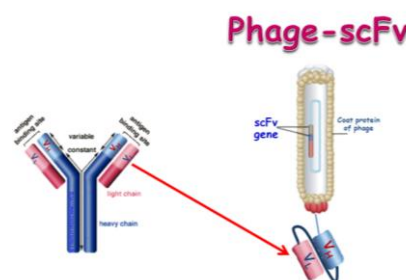
Abstract

Phage display technology has become an established technique used to produce specific antibodies by circumventing immunization and consequently could facilitate the generation of antibodies that are difficult or impossible to gain through conventional methods. This study has been created of the naïve phage scFv library and used for selection of scFv against cyclophilin and neomycin phosphotransferase II. The scFv were generated by recombining heavy chain and light chain variable regions. The full length scFv fragments

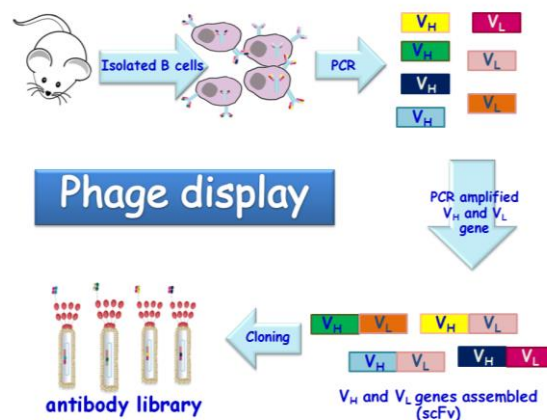
were assembled in a process making use of all possible combinations of heavy and light chains, which was cloned into a plasmid vector from pCANTAB5e (Amersham Pharmacia Biotech, UK). The resulting scFv gene repertoire was cloned to form a sized library composed of 1.64×10^{10} individual clones. Binding affinities of the phage scFv library to proteins were determined using Surface Plasmon Resonance (SPR). A biacore sensorgrams showing phage scFv can bind to NPT II and Cry1Ab protein.

บทนำ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (phage display technique) สามารถทำได้โดยการใช้เทคโนโลยีการตัดต่อยีน ในการเชื่อมต่อกันแอนติบอดีที่มีเฉพาะส่วนของ variable fragment ของ V_L และ V_H ซึ่งมีการเชื่อมต่อกันด้วยสายเปปไทด์สั้นๆ เข้ากับโปรตีนที่เป็นส่วนปกคลุมของผิวฟาจ (capsid) เรียกโมเลกุลแอนติบอดีชนิดนี้ว่า ฟาจแอนติบอดี หรือ Phage scFv โดยทั่วไปมักเชื่อมต่อด้านอะมิโน (N terminal) ของโปรตีนปกคลุม pVIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 2500 ชิ้น หรือ pVIII ซึ่งมีอยู่ประมาณ 5 ชิ้น (ภาพที่ 1 และ 2) ซึ่งคลังแอนติบอดีที่ดีควรมีความหลากหลายของส่วนที่ทำหน้าที่จับกับแอนติเจน (binding site) ของแอนติบอดีที่แตกต่างกัน ประมาณ 10^9-11 ชนิด ซึ่งแอนติบอดีประเภทนี้ ยังคงคุณสมบัติการเกาะจับกับแอนติเจน (affinity) และความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อแอนติเจน สูง เทียบเท่ากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากเทคนิคไฮบริโดมา (Hybridoma)



ภาพที่ 1. แสดงโครงสร้างของฟาจแอนติบอดี (Phage antibody) ที่โคลนจากยีนเฉพาะส่วนของ variable fragment ของ light chain (V_L) และ heavy chain (V_H) ของแอนติบอดี



ภาพที่ 2. แสดงขั้นตอนการผลิตคลังแอนติบอดีด้วยเทคนิคการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (phage display technique) จากหนู

ข้อดีของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยเทคโนโลยี phage display คือ สะดวก และประหยัดกว่าการใช้เทคนิคดั้งเดิม เพราะใช้เวลาน้อยกว่า ใช้เงินน้อยกว่า ใช้แรงงานและความชำนาญน้อยกว่า และข้อสำคัญคือไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง สามารถใช้กับแอนติเจนได้หลากหลายชนิดกว่า เพราะสามารถใช้กับแอนติเจนที่เป็นพิษต่อสัตว์ แอนติเจนที่คล้ายกับโปรตีนในสัตว์ทดลอง หรืออาจใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็นแอนติเจนก็ได้ นอกจากนี้แล้วยังสามารถใช้กับแอนติเจนที่ไม่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ได้ (nonimmunogenic antigen) สามารถใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจำนวนมาก ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในงานด้าน proteomics ในปัจจุบัน สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างแอนติบอดีที่มีคุณสมบัติเหมือนของคน (humanized antibody) เพื่อใช้ในการรักษาโรค (therapeutic antibody) สามารถปรับปรุงให้มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปตามต้องการ เช่นมีความสามารถในการจับ หรือความจำเพาะเจาะจงสูงขึ้น หรือทนต่อสภาวะต่างๆ และสามารถนำไปผลิตเป็นจำนวนมากได้ง่าย ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบที่เรียโดยทั่วไป เพื่อใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (<http://www.sut.ac.th/iat/biotech/montarop/phd>)

จากคุณสมบัติของแอนติบอดีที่มีจำเพาะต่อแอนติเจนสูง จึงนิยมนำแอนติบอดีมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ในทางการแพทย์ใช้แอนติบอดีในการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรค ส่วนทางการแพทย์สามารถใช้อันติบอดีในการตรวจวินิจฉัยโรคพืชได้เช่นกัน และยังใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนสารเคมีในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรได้ด้วย ในงานด้านการวิเคราะห์โปรตีนอื่นๆ สามารถนำแอนติบอดีมาสกัดบริสุทธิ์โปรตีนเป้าหมาย นอกจากนี้งานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมหรือการตัดต่อยีนเข้ามาช่วยในการสร้างพันธุ์พืชใหม่ๆ ที่เรียกว่า พืชดัดแปลงพันธุกรรมหรือพืชจีเอ็ม [Genetically Modified (GM) Plant] โดยการตัดต่อรหัสพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตหนึ่งไปใส่ในอีกสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ประโยชน์ของเทคโนโลยีนี้ทำให้เกิดการพัฒนาสายพันธุ์ชนิดใหม่ สามารถปรับปรุงคุณภาพสายพันธุ์พืชใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพทางโภชนาการ ต้านทานโรค แมลง และสารกำจัดวัชพืช รวมถึงพันธุ์พืชที่มีความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ยีนไซโคลฟิลิน (Cyclophilin, CyPs) เป็นโปรตีนประเภท เปปติดีลโฟรฟิล ซิส-ทรานส์ ไอโซเมอเรส (PPIases) ที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ของออร์แกนเนลล์ที่ศึกษาทั้งในเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอต เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกันและยับยั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช ซึ่งช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้น เช่น การได้รับ ผลกระทบจากโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ

ในการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยตรวจสอบยีนเป้าหมายที่สอดแทรกอยู่ในโครโมโซมพืช ด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา ทำโดยการสกัดสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของพืช แล้วย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis แล้วใช้เทคนิค Southern blotting ย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นเมมเบรน เพื่อตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มียีน เป้าหมายอยู่โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจ (DNA probe) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหา ยีนเป้าหมายบนโครโมโซมพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ได้อีกวิธีหนึ่ง (หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2557) การคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน จำเป็นต้องตรวจสอบผลผลิตของยีนเป้าหมาย นั่นคือ โปรตีน เพื่อเป็นการยืนยันว่า ยีนเป้าหมายมีการแสดงออกของยีนได้ในต้นพืช การตรวจสอบโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีน นิยมใช้เทคนิคทางชีววิทยา โดยอาศัยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายเป็นตัวตรวจ วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ ELISA และ Western blotting นอกจากการคัดเลือกโปรตีนจากยีนเป้าหมายแล้ว ยังสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนเครื่องหมาย ที่ถูกถ่ายยีนเข้าไปในต้นพืชได้ด้วย เช่น ยีนนีโอไมซินฟอสโฟทรานสเฟอเรส II (neomycin phosphotransferase II : NPT II) ซึ่งเป็นยีนที่ทำ

ให้ต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเติบโตได้บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบ นิยมใช้เทคนิคทางซีรั่มวิทยา เช่น ELISA ทำให้การคัดเลือกต้นพืชมีความสะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

ปัจจุบันฟาจแอนติบอดีมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ทางการแพทย์ Pereira และคณะ (1997) ใช้ฟาจแอนติบอดีสำหรับการวินิจฉัยแอนติเจนบนผิวเซลล์ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถแยกออกจากโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ นอกจากนี้ ได้มีผลิตฟาจแอนติบอดีต่อสารพิษจากทะเล ชนิด Palytoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดอาการเป็นพิษในมนุษย์ Garet และคณะ (2010) ได้ใช้ฟาจแอนติบอดีในเทคนิคทางซีรั่มวิทยาพัฒนาการตรวจสอบสารพิษ Palytoxin ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำในหอย

Liu และคณะ (2014) คัดเลือกฟาจแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสโรคของปลา ได้แก่ เชื้อ infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) และ เชื้อ spring viraemia of carp virus (SVCV) (Liu *et al.*, 2013) เพื่อใช้ในการพัฒนาการวินิจฉัยโรค นอกจากนี้จะใช้ฟาจแอนติบอดีในการวินิจฉัยและตรวจสอบโรคแล้ว Hubert และคณะ ในปี 2014 ยังใช้ฟาจแอนติบอดีในการแยกโปรตีนเป้าหมายให้บริสุทธิ์ด้วย ทางด้านการเกษตร มีการใช้ฟาจแอนติบอดีเป็นตัวตรวจสอบสารพิษจากเชื้อรา ชนิด Zearalenone ที่ปนเปื้อนในข้าวฟ่าง (Edupuganti, *et al.*, 2013) และ ในปี 2012 Wang และคณะ ผลิตฟาจแอนติบอดีจากคลังแอนติบอดีที่ได้จากมนุษย์ เพื่อใช้ตรวจสอบโปรตีน Cry1C ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่ผลิตจากพืชตัดแปลงพันธุกรรม นอกจากการตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายที่อยู่พืชตัดแปลงพันธุกรรมแล้ว ยังสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนเครื่องหมาย เช่น McKenzie และคณะ (2000) ได้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ NPTII ตรวจสอบต้นพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน NPTII

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ทำการผลิตคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library) โดยสร้างจาก B cell ของหนูเมาส์ที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้น เพื่อนำมาคัดเลือก Phage-scFv ที่จำเพาะต่อโปรตีน CYP และ NPT II และนำ Phage-scFv ที่ได้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรมต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การเตรียมแอนติเจน

1.1. โปรตีนรีคอมบิแนนท์ไซโคลฟิลิน (rCYP)

นำพลาสมิดลูกผสมที่มียีนไซโคลฟิลินจากงานวิจัยของคุณสุภาวดี จ้อเหรียญ ถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Rosetta) ด้วยวิธีการ heat shock transformation เลี้ยงเชื้อบนอาหาร LB ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16-20 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารตรวจสอบโคลนที่มีขึ้นยืนอยู่โดยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 สาย คือ ไพรเมอร์ T7- primer และ T7 Reverse- primer นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วย วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Rosetta) ที่ผลิตโปรตีนไซโคลฟิลิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2YT ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว 2YT ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญมีค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 เติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.0 mM เลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 6-8 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย purification buffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 8.0) ในอัตราส่วนบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตรต่อตะกอนเซลล์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตร เติม

lysozyme ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มบนน้ำแข็ง นาน 30 นาที ทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze-thaw แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใส (crude extract) ที่มีโปรตีนมาวิเคราะห์ขนาดของโปรตีน rCyP ที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้ 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel ใน Tris-glycine buffer (25 mM Tris pH 8.3, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) ใช้ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เมื่อครบเวลานำมาย้อมสีด้วยสารละลาย Coomassie blue (Fermentas, USA)

นำ crude extract ที่สกัดได้ มาผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 6.3) 10-20 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 4.5) เพื่อปล่อย rCyP ออกจากคอลัมน์ เก็บสารละลายโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ ออกมาเป็นส่วนๆ ส่วนละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 10-20 ส่วน แล้วนำไปหาค่าความเข้มข้นโปรตีนด้วยการวัดค่า OD₂₈₀ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ rCyP ด้วยวิธี SDS-PAGE ใน 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel

1.2. โปรตีนรีคอมบิแนนท์ NPT II

นำพลาสมิดลูกผสมของยีน NPT II จากงานวิจัยของคุณพงศกร สรรค์วิทยากุล ถ่ายฝากเข้าเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (Rosetta) ด้วยวิธีการ heat shock transformation นำเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมของยีน NPT II เลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2YT ที่มี Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 คืน ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายลงในอาหารเหลว 2YT ที่ผสม Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 เติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.0 mM เลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 6-8 ชั่วโมง วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1.1 นำไปหาค่าความเข้มข้นโปรตีนด้วยการวัดค่า OD₂₈₀ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ NPT II ด้วยวิธี SDS-PAGE ใน 8 เปอร์เซ็นต์ acrylamide gel

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (Phage Display Technology)

2.1. การเตรียมคลังของฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library)

2.1.1. ออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีนของส่วนแปรผัน (variable domain) ของทั้ง heavy และ light chain (VH และ VL) ของแอนติบอดีจากหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Zhou et al. (1994) โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ เพิ่มขึ้นส่วนของยีน VH โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 ชุด คือ Mouse VH forward และ Mouse VH reverse และอีกส่วนคือเพิ่มขึ้นส่วนของยีน VL โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 ชุด คือ Mouse VL forward และ Mouse VL reverse โดยมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I สำหรับโคลนเข้าเวกเตอร์ pCANTAB 5e อยู่ที่ปลาย 5' ของ Mouse VH forward และ Mouse VL reverse ตามลำดับ และเพิ่มส่วน linker sequence ที่ปลาย 5' ของ Mouse VH reverse และ Mouse VL forward เพื่อใช้เชื่อมต่อระหว่างยีน VH และ VL ลำดับของกรดอะมิโน ของ linker sequence คือ GSTSGSGKPGSGEGSTKG ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โพรเมอร์สำหรับโคลนยีน VH และ VL จากหนู

Mouse VH forward primers (5'→3')	
MKV-FOR 1	GGCCCAGCCGGCC ATG GCC GATGTGAAGCTTCAGGAGTC
MHV-BACK4	GGCCCAGCCGGCC ATG GCC CAGGTTACTCTGAAAGAGTC
MHV-BACK11	GGCCCAGCCGC ATG GCC CAGGTGCAGCTGAAGSAGTC
MHV-BACK12	GGCCCAGCCGGCC ATG GCC GAGGTCCAGCTGCARCARTC
MHV-BACK13	GGCCCAGCCGGCC ATG GCC GAGGTGAAGCTGGTGGARTC
Mouse VH reverse primers (5'→3')	
MHV-FOR1	ACCAGAGCCGC GCCGCCGCTACCACCACCACCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT
MHV-FOR2	ACCAGAGCCGCCGCCGCCGCTACCACCACCACCTGAGGAGACTGTGAGA GTGGT
Mouse VL forward primers (5'→3')	
MKV-BACK1	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGATGTTTTGATGACCC AAACT
MKV-BACK6	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGATATTGTGCTAACTC AGTCT
MKV-BACK9	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCCAAATTGTTCTCACCC AGTCT
MKV-BACK10	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGATATTGTGATRACSC AG
MKV-BACK11	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGACATTGTGMTGACCC ARTCT
MKV-BACK12	AGCGGCGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGATCCGAYATCCAGMTGACW CAGACT
Mouse VL reverse primers (5'→3')	
MKV-FOR1	GCGGCCGCCCGTTTCAGCTCCAGCTTG
MKV-FOR2	GCGGCCGCCCGTTTTATTTCAGCTTGGT
Primers for generation of scFv genes in SOE-PCR (5'→3')	
SOE-BACK	GGCCCAGCCGGCCATG
SOE-FOR	GCGGCCGCCCGTTT
<p>S = G/C, R = G/A, K = G/T, M = A/C, Y = C/T, W = A/T, H = A/C/T, B = C/G/T, V = A/C/G, D = A/G/T, and N = A/T/G/C.</p>	

2.1.2. สกัด total RNA จากม้ามหนู

สกัด Total RNA จากม้ามโดยใช้ ชุดสกัด FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen, Taiwan) นำม้ามหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c อายุประมาณ 1 เดือน จำนวน 5 ตัว ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาบดกับไนโตรเจนเหลวในโกร่งให้ ละเอียด จากนั้นเติม FARB Buffer 350 ไมโครลิตรและ β -Mercaptoethanol 3.5 ไมโครลิตร.ต่อน้ำหนักม้าม 30 มิลลิกรัม ทำให้เซลล์แตกโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 20G ดูดขึ้นลง จำนวน 10 ครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายใส่ใน Filter Column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายใส่ใส่หลอดทดลองใหม่ จากนั้นเติม 1 เท่าปริมาตรของ 70 % RNase-free ethanol ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารละลายลงใน FARB Mini Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส จากนั้นเติม Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที นำ FARB Mini Column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัด ethanol จากนั้นเติมน้ำ Rnase Dnase free 50 ไมโครลิตรลงใน FARB Mini Column เพื่อชะอาร์เอ็นเอออกจากคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 xg เป็นเวลา 2 นาที เก็บอาร์เอ็นเอไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

2.1.3. การสร้าง cDNA ของ VH และ VL

นำ total RNA จากข้อ 2.1.2 เปลี่ยนให้เป็น cDNA โดยใช้ชุด SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) โดยผสมของปฏิกิริยาดังนี้ total RNA 5 ไมโครกรัม, 50 ไมโครโมลาร์ oligo(dT)₂₀, 10 มิลลิโมลาร์ dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยวางลงบนน้ำแข็งนาน 1 นาที จากนั้นเติม 1X First-Strand Buffer, 0.1 โมลาร์ DTT 1 ไมโครลิตร, RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร และ 200 ยูนิต SuperScript™ III RT ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บ cDNA ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.1.4. โคลนยีน VH และ VL ด้วยเทคนิค PCR

นำ cDNA จากข้อ 2.1.3 ใช้เป็นแม่แบบในการสร้างยีนของแอนติบอดีทั้งส่วน VH และ VL ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ 1X GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, USA) และ ใช้ชุดไพรเมอร์จากตารางที่ 1 (Mouse VH forward, Mouse VH reverse, Mouse VL forward และ Mouse VL reverse) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 35 รอบ ของอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล

2.1.5. การสร้างเป็นชิ้น scFv

นำชิ้นส่วนยีน VH และ VL (จากข้อ 2.1.4) เชื่อมต่อกัน ซึ่งจะเรียกชิ้นส่วนนี้ว่า single chain variable fragment (scFv) ด้วยเทคนิค PCR ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ยีน VH

และ VL ในปริมาณที่เท่ากัน 600-800 ng, 1X PCR buffer, 2 มิลลิโมล $MgCl_2$, 80 ไมโครโมลาร์ dNTPs, 2.5 ยูนิต Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา assemble ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PCR) ยี่ห้อ GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 120 วินาที ตามด้วย 15 รอบ ของอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denature) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที (annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (extension) จากนั้นเติมไพรเมอร์ 0.4 ไมโครโมลาร์ (ประกอบด้วย SOE-BACK 0.2 ไมโครโมลาร์ และ SOE-FOR 0.2 ไมโครโมลาร์) แล้วทำปฏิกิริยา PCR ต่ออีก 30 รอบ นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และ สกัดบริสุทธิ์ด้วยชุด PCR Kit (Fermentas, USA) จากนั้นเก็บ DNA ที่เตรียมได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการเชื่อม scFv เข้ากับ vector (ligation) ต่อไป

2.1.6. เชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pCANTAB 5e และถ่ายฝากเข้าแบคทีเรีย TG1

นำชิ้นส่วนยีน scFv (จากข้อ 2.1.5) ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ยีน scFv 20 นาโนกรัม, 1X Fast Digest buffer, 1 ไมโครลิตร Fast Digest *Sfi* I และ 1 ไมโครลิตร Fast Digest *Not* I บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล และนำเวกเตอร์ pCANTAB 5e (Amersham Pharmacia Biotech, UK) ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I เช่นเดียวกับยีน scFv ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล หลังจากนั้นนำยีน scFv และเวกเตอร์ pCANTAB 5e ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I แล้ว มาเชื่อมต่อกันโดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ในส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ยีน scFv ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I 10 นาโนกรัม, pCANTAB 5e ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sfi* I และ *Not* I 10 นาโนกรัม, 1x Rapid Ligation Buffer, 5 ยูนิต T4 DNA ligase (Thermo Scientific, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำพลาสมิดลูกผสม ถ่ายฝากใน *E. coli* สายพันธุ์ TG1 ด้วยวิธีการ heat shock transformation เลี้ยงเชื้อบนอาหาร SOBAG (20 g Bacto-tryptone, 5g Yeast Bacto extract, 0.5 g NaCl, 0.01 $MgCl_2$, 0.1 M Glucose, 100 ug/ml Ampicillin) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำโคลนนี้เดี่ยวที่เจริญบนอาหารตรวจสอบโคลนที่มีขึ้นยืนอยู่โดยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 2 สาย คือ ไพรเมอร์ SOE-BACK และ SOE-FOR นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 0.8 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล จากนั้นทำการคำนวณขนาดของคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library) โดยการนับจำนวนของ recombinant bacteria ที่โตบนจานเลี้ยง SOBAG ที่ โดยการเจือจางเซลล์ทีละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) ประมาณ 4-5 ครั้งก่อนที่จะนำไปเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนับจำนวนโคลนนี้ คำนวณหาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดในคลัง

2.2. การเตรียม helper phage

เลี้ยงเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ TG1 ในอาหารเหลว 2YT ที่เติม 2 เปอร์เซ็นต์ Glucose และ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2YT-AG) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ย้ายเชื้อลงในอาหารเหลว 2YT-AG เลี้ยงเชื้อต่อจนเซลล์เจริญอยู่ในช่วง log phase เติม helper phage M13K07 ลงในเซลล์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วย

2YT ที่เติม Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Kanamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2YT-AK) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แยกตะกอนเซลล์โดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใส ตกตะกอน helper phage ด้วยสารละลาย PEG/NaCl [200 g PEG (MW 8,000), 146.1 g NaCl] อัตรา 1 ส่วน ต่อน้ำใส 5 ส่วน กวนเบาๆ บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกตะกอนฟาจโดยหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอน helper phage ด้วย PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

2.3. การขยายจำนวนคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library)

นำเซลล์ Recombinant bacteria จากข้อ 2.1.6 เลี้ยงในอาหารเหลว 2YT-AG ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับข้อ 3.2 ละลายตะกอน Phage-scFv library ด้วยสารละลาย blocking (3 % skim milk, 0.01% NaN₃, 0.1 % Triton X-100) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที

2.4. ทดสอบการจับกันของ Phage-scFv library ที่ผลิตได้กับ recombinant NPT II และโปรตีนอื่นๆ ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)

นำโปรตีน NPT II เคลือบลงบน Sensor Chip NTA (*GE Healthcare, Sweden*) จากนั้นนำ Sensor Chip NTA ที่เคลือบด้วยโปรตีนแล้ว เข้าในเครื่อง Biacore X-100 (*GE Healthcare, Sweden*) ฉีด Phage-scFv library จากข้อ 2.3 เข้าในเครื่อง Biacore X-100 ตรวจสอบ sensorgram การจับกันของ Phage-scFv และโปรตีนเป้าหมาย นำโปรตีนชนิดอื่นทดสอบการจับของ Phage-scFv

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการวิจัย

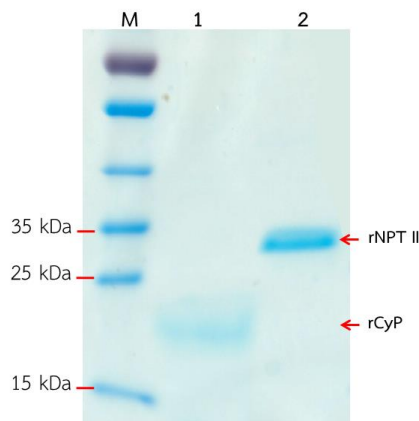
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การเตรียมแอนติเจน

ทำการถ่ายฝากพลาสมิดลูกผสม เข้าในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(Rosetta) คัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสม และทดสอบการแสดงออกของยีน ไชโคฟิลินและ NPT II โดยชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วย SDS-PAGE พบว่า มีการแสดงออกของแถบโปรตีนขนาดประมาณ 18.4 และ 29 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนที่ได้นี้ คือ ไชโคฟิลินและ NPT II ที่เกิดจากการแสดงออกร่วมกันระหว่าง 6x His tag และ ไชโคฟิลินและ NPT II ซึ่งแถบโปรตีนขนาดดังกล่าวไม่ปรากฏในกลุ่มควบคุม (เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(Rosetta) (ภาพที่ 3)

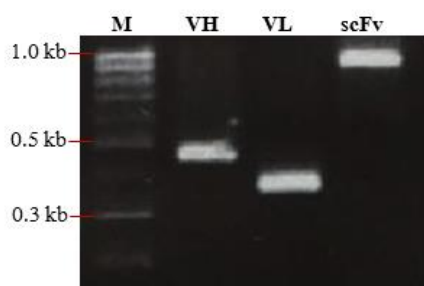
สำหรับการสกัด rCYP และ rNPT II ให้บริสุทธิ์นั้น ทำการสกัดโดยอาศัยคุณสมบัติการเป็น Histidine tagged protein นำไปผ่านคอลัมน์ Ni-NTA ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ความเข้มข้นของ rCYP และ rNPT II ที่วัดด้วยวิธี Bradford assay ได้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 6.12 และ 6.37 มิลลิกรัมจากอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 1 ลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 3. ปริมาณของ rCYP และ rNPT II ที่ผลิตได้จากเซลล์ *E. coli* หลังจากชักนำด้วย IPTG (lane 1 และ 2) แยกขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE

2. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยเทคโนโลยีการแสดงโปรตีนบนผิวฟาจ (Phage Display Technology)

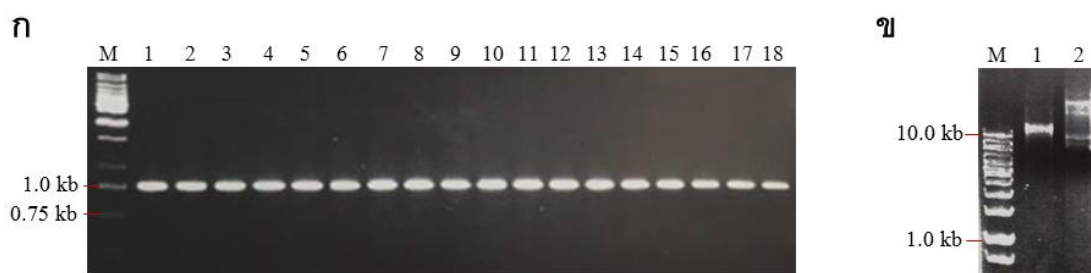
การเตรียมคลังของฟาจที่ผลิต single chain variable fragment (Phage-scFv library) จากการออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการโคลนยีนของ VH และ VL โดยไพรเมอร์นี้ดัดแปลงจากรายงานของ Zhou et al. (1994) ซึ่งเหมาะสำหรับการโคลนยีนของทั้ง VH และ VL ที่ได้จากหนูจากหนูเมาส์สายพันธุ์ BALB/c ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจน จากรายงานมีการใช้ไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน VH (forward primer 10 เส้น และ reverse primer 4 เส้น) และ VL (forward primer 9 เส้น และ reverse primer 4 เส้น) จำนวน 40 และ 36 คู่ ตามลำดับ จึงได้ทำการดัดแปลงไพรเมอร์โดยใช้ รหัส IUPAC nucleotide code แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่มีความแตกต่าง ซึ่งวิธีนี้ ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายจากเดิม โดยลดจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ เพียง 10 และ 12 คู่ สำหรับโคลนยีน VH (forward primer 5 เส้น และ reverse primer 2 เส้น) และยีน VL (forward primer 6 เส้น และ reverse primer 2 เส้น) ตามลำดับ และไพรเมอร์ทั้ง 22 คู่ ยังคงมีประสิทธิภาพในการโคลนยีน VH และ VL โดยเมื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR สามารถเพิ่มปริมาณยีน VH และ VL ได้ โดยยีนมีขนาดประมาณ 400 และ 340 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 4) เช่นเดียวกับรายงานของ Okamoto et al. (2004) และ Wang et al. (2000) ซึ่งทดสอบการใช้ชุดไพรเมอร์โคลนยีน VH และ VL จากเซลล์ไฮบริโดมาของหนู จากนั้นใช้เทคนิค overlap extension PCR เชื่อมต่อยีน VH และ VL เพื่อสร้างเป็นส่วนของยีน scFv โดยอาศัย linker sequence (GSTSGSGKPGSGEGSTKG) ที่อยู่บริเวณปลายของยีน VH และ VL ทำการเพิ่มส่วนของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I ทาง 5' และ *Not* I ทาง 3' ของยีน scFv โดยใช้ไพรเมอร์ SOE-BACK และ SOE-FOR โดยยีน scFv มีขนาดประมาณ 750 เบส (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4. แสดงส่วน variable heavy (VH) และ variable light (VL) และสายแอนติบอดีสายเดี่ยว (scFv)

เมื่อได้ยีน scFv ซึ่งมีส่วนประกอบของ ยีน VH และ VL นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sfi* I และ *Not* I และนำไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pCANTAB 5e ถ่ายฝากเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TG1 ตรวจสอบยีน scFv ในแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ลูกผสม (คลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment :Phage-scFv library) ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SOE-F และ SOE-R พบว่า ใน Phage-scFv library มียีน scFv ขนาดประมาณ 750 bp (ภาพที่ 5ก) และเมื่อนำมาสกัดเวกเตอร์ลูกผสม เทียบกับเวกเตอร์ pCANTAB 5e พบว่า เวกเตอร์ลูกผสมมีขนาดใหญ่กว่า pCANTAB 5e (ภาพที่ 5ข) แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีน scFv ที่สอดแทรกเข้าไปในเวกเตอร์ pCANTAB 5e จากนั้นทำการคำนวณขนาดของ Phage-scFv library ด้วยวิธีการนับจำนวนของ recombinant bacteria ที่โตบนอาหารแข็ง โดยการเจือจางเซลล์ที่ละ 10 เท่า (10 fold dilution) จึงนำไปเกลี่ย (spread) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถคำนวณขนาดของ Phage-scFv library ที่ค่าความเจือจาง 10^{10} มีขนาด 1.64×10^{10} clone/ml

การเพิ่มจำนวน Phage-scFv โดยใช้ฟาจตัวช่วย (helper phage: M13K07) เข้าไปเจริญในแบคทีเรียที่มี Phage-scFv library โดยการส่งผ่านดีเอ็นเอเข้าไป โดย helper phage เหล่านี้จะช่วยในการสร้างโปรตีนที่ใช้ในการประกอบเป็น Phage-scFv ภายในเซลล์แบคทีเรีย หลังจากนั้นสกัดแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย PEG เพื่อสร้างเป็นคลังของเฟจที่สมบูรณ์



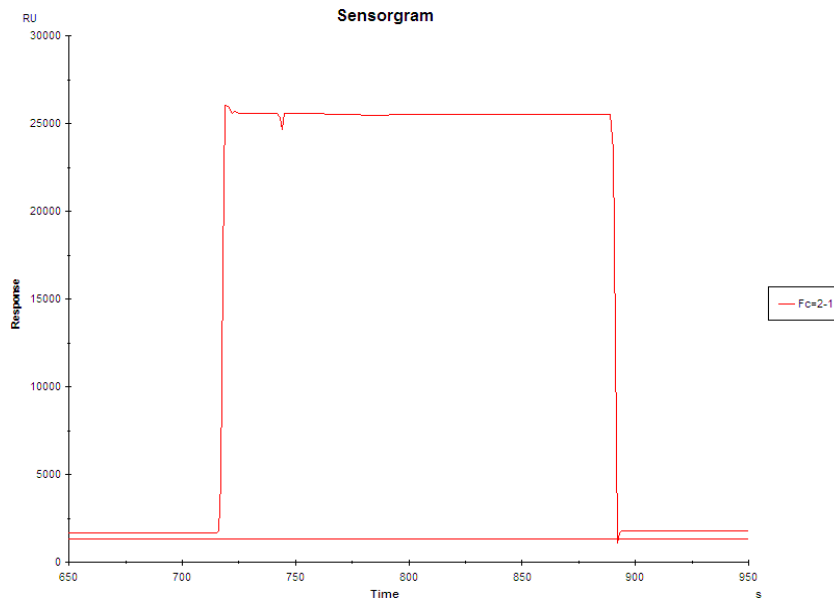
ภาพที่ 5 (ก) ตรวจสอบยีน scFv ในคลังฟาจที่ผลิต single chain variable fragment :Phage-scFv library (lane 1-16) เทียบกับเวกเตอร์ลูกผสมที่มียีน scFv (lane 17) ด้วยเทคนิค PCR

(ข) เวกเตอร์ลูกผสม (Phage-scFv library) (lane 1) เทียบกับ เวกเตอร์ pCANTAB 5e (lane 2)

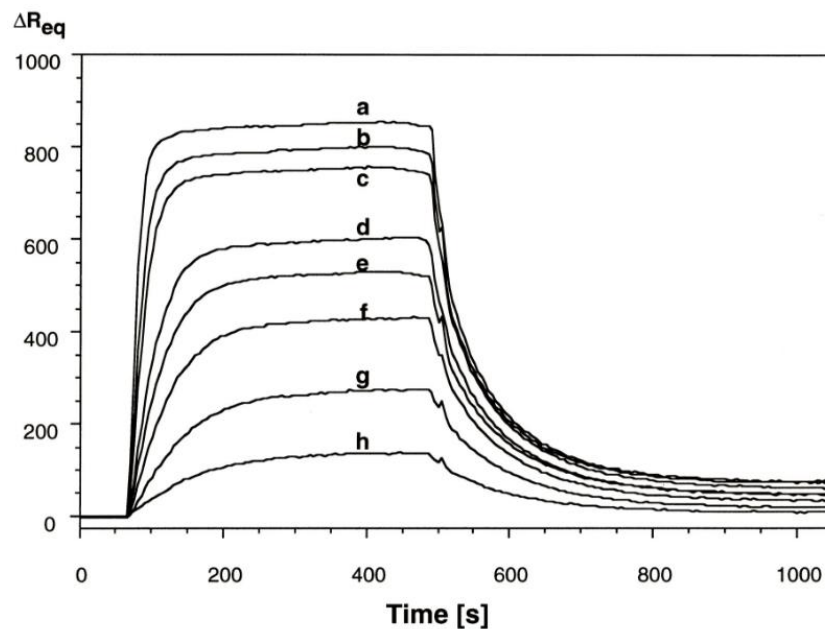
2.2. ทดสอบการจับกันของ Phage-scFv library ที่ผลิตได้กับ recombinant NPT II และโปรตีนอื่นๆ ด้วยเทคนิค Surface Plasmon Resonance (SPR)

ทดสอบการจับกันของ Phage-scFv library ที่ผลิตได้กับ rNPT II ด้วยเทคนิค SPR ด้วยเครื่อง Biacore X-100 ผลจาก sensorgram (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่ามีการจับกันของโปรตีนเกิดขึ้น จากลักษณะของเส้นกราฟที่เกิดขึ้น โดยพบว่าเส้นกราฟสูงขึ้น เมื่อมีการฉีด Phage-scFv library เข้าในระบบ และเส้นกราฟคงที่ จนได้ทำการชะ Phage-scFv library ออก ซึ่งเส้นกราฟลักษณะเช่นนี้ เป็นลักษณะของแอนติบอดีจับกับแอนติเจนแบบจำเพาะเจาะจง ซึ่งเป็นการจับที่แน่นกว่าการจับกันของโปรตีนกับโปรตีนทั่วไป ซึ่งลักษณะ sensorgram สอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้เครื่อง Biacore ในการตรวจสอบการจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน เช่น Schneider *et. al.* (1997) ทำการตรวจสอบ binding kinetics ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี MoAb34 กับฮอร์โมน ERYTHROPOIETIN (EPO) โดยใช้ Biacore (ภาพที่ 7) และ รายงานของ Christine *et. al.* (2012) ใช้เครื่อง Biacore ในการหาค่า Kinetics และ affinity ของการจับกันระหว่าง human Dickkopf protein 1 (DKK1) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี DS4 (ภาพที่ 8)

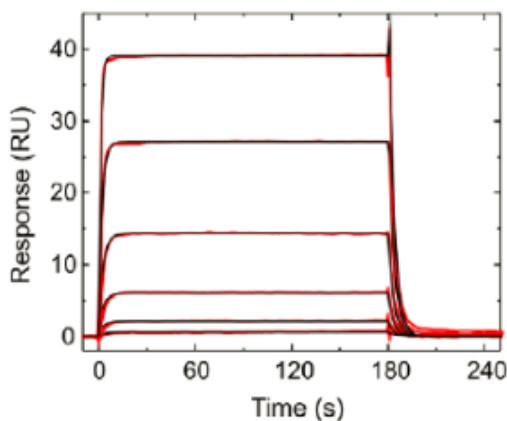
นอกจากนี้ ยังนำ Phage-scFv library ที่ผลิตได้ทดสอบการจับกับโปรตีนอื่นๆ ได้แก่ recombinant Cry1Ab (rCry1Ab) จาก sensorgram พบว่า Phage-scFv สามารถจับกับโปรตีน rCry1Ab ได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 9) นั้นแสดงให้เห็นว่า Phage-scFv library ที่ผลิตได้ มีประสิทธิภาพในการจับกับโปรตีนได้



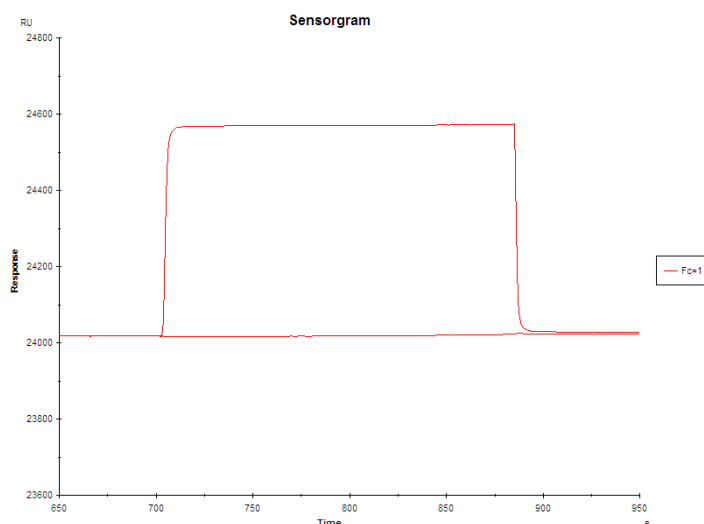
ภาพที่ 6. Biacore sensorgram แสดงการจับกันของ Phage-scFv และ rNPT II



ภาพที่ 7. Biacore sensorgram จากรายงานของ Scheider *et. al.* (1997) แสดงการตรวจสอบ binding kinetics ของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี MoAb34 กับฮอร์โมน ERYTHROPOIETIN (EPO) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ Biacore



ภาพที่ 8. Biacore sensorgram จากรายงานของ Christine *et. al.* (2012) แสดงการหาค่า Kinetics และ affinity ของการจับกันระหว่าง human Dickkopf protein 1 (DKK1) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี DS4



ภาพที่ 9. Biacore sensorgram แสดงการจับกันของ Phage-scFv และ rCry1Ab

สรุปผลการวิจัย

1. ชุดไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน ส่วน variable ของ heavy chain (VH) และส่วน variable ของ light chain (VL) ซึ่งดัดแปลงให้มีจำนวนไพรเมอร์น้อยลง แต่ยังคงประสิทธิภาพในการโคลนยีน VH และ VL จากหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c ได้ ซึ่งทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ ซึ่งแต่เดิมใช้ไพรเมอร์จำนวนมากในการโคลนยีน

2. Phage-scFv library ได้รับการสังเคราะห์เป็นผลสำเร็จ เป็นคลังฟาจชนิด Naïve ซึ่งใช้แหล่งพันธุกรรมจากม้ามของหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c ที่ไม่เคยได้รับการฉีดกระตุ้น จำนวน 10 ตัว ชิ้นส่วน scFv สร้างมาจากส่วน variable ของ VH และส่วน variable ของ VL เชื่อมต่อกันด้วย linker sequence: GSTSGSGKPGSGEGSTKG และ Phage-scFv library ที่ผลิตได้มีขนาด 3.28×10^{12}

3. ทดสอบคุณสมบัติการจับของ Phage-scFv library กับแอนติเจนชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค SPR โดยใช้เครื่อง Biacore X-100 พบว่า Phage-scFv library สามารถจับกับโปรตีน NPT II และ Cry1Ab ได้

การทดลองที่ 1.2

การตรวจสอบการกลายของยีนที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ The Mutation Assay of Genes Involved Resistant to Papaya Ringspot Disease

อรุณทัย ซาววา

ภรณ์ สว่างศรี

อำนาจ อรรถลิ่งรอง

ศรีเมฆ ชาวโพงพาง

คำสำคัญ

มะละกอ (*Carica papaya* L.), Mutation, PRSV (*Papaya Ringspot Virus*), Translation Initiation factors, RNA silencing

บทคัดย่อ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีพื้นที่เพาะปลูกลดลงเรื่อยๆ สาเหตุมาจากการระบาดของโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ ปัจจุบันมีรายงานว่ายีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม และกลุ่มกระบวนการ RNA silencing ได้แก่ยีน *eIF4E* และ *RDR6* เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อไวรัส การทดลองนี้จึงได้ศึกษาการกลายของยีน โดยการโคลนยีน *CpeIF4E* และ *CpRDR6* จากมะละกอ พบว่า ยีน *CpeIF4E* มีขนาด 711 คู่เบส จาก Start codon ถึง Stop codon สามารถถอดรหัสเป็นอะมิโนเอซิดได้ 236 อะมิโน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบมีความเหมือนกับ *Carica papaya eIF4E*, *Vasconcellea monoica eIF4E* และ *Manihot esculenta eIF4E* ที่ identity 99, 93 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับลำดับอะมิโนเอซิดมีความเหมือนกับ *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana* และ *Manihot esculenta* ที่ identity 99, 92 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของยีน *CpRDR6* มีขนาด 3588 คู่เบส มีความเหมือนกับ *Carica papaya RDR6*, *Morus notabilis RDR6* และ *Nicotiana glutinosa RDR6* มีค่า identity 100, 75 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถอดรหัสอะมิโนเอซิด 1194 อะมิโน เหมือนกับ *Carica papaya*, *Manihot esculenta* และ *Herrania umbratica* ที่เปอร์เซ็นต์ identity 100, 71 และ 70 ตามลำดับ การตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E* พบว่ามะละกอตัวอย่าง HF39 ต้น 1 มีลำดับอะมิโนเอซิดที่แตกต่างจากทุกตัวอย่างถึง 36 อะมิโน และพบความแตกต่างของอะมิโนเอซิดที่สัมพันธ์กับตัวอย่างที่ทนทานต่อไวรัส คือ ลำดับอะมิโน P (proline) พบในตัวอย่าง KK80-Florida 67, ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2, Florida ต้นตัวผู้ และ Florida ต้นตัวเมีย ซึ่งเป็นตัวอย่างต้นที่ทนทานแต่ไม่พบในตัวอย่างต้นที่อ่อนแอเลย ส่วนยีน *CpeIF4E* พบความแตกต่างของตัวอย่าง KDTP-Florida 47 เพียง 1 ตำแหน่ง คือ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น A (Adenine) ซึ่งตัวอย่างอื่นทุกตัวอย่างเป็น G (Guanine) ส่งผลให้ลำดับอะมิโนเอซิดเปลี่ยนไปเป็น K (Lycine) จากอะมิโน E (Glutamic acid) อย่างไรก็ตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิดที่พบอาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานของมะละกอ ซึ่งน่าสนใจและจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

Abstract

Papaya (*Carica papaya* L.) is an economically important fruit tree. The production areas have been trending to be decreased, caused by the papaya ringspot disease. Recently, the genes involving initiation translation factor (eIF4E) and RNA silencing mechanism (RDR6) have been reported that related to against virus infection. This study aims to assay mutation of *CpeIF4E* and *CpRDR6* genes from papaya. The *CpeIF4E* gene cloning was obtained 711 base pairs of nucleotide length from start to stop codon which translate to 236 amino acids. The nucleotides blast searching was showed 99%, 93% and 85% sequence identity with *Carica papaya eIF4E*, *Vasconcellea monoica eIF4E* and *Manihot esculenta eIF4E*. The deduced amino acid was showed similarity to *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana* and *Manihot esculenta* with 99%, 92% and 80% identity respectively. The *CpRDR6* sequence result was obtained 3588 base pairs which could translate to 1194 amino acids. The nucleotide was showed similar with *Carica papaya RDR6*, *Morus notabilis RDR6* and *Nicotiana glutinosa RDR6*, 100%, 75% and 71% identity. Moreover, its amino acid was present similarity with *Carica papaya*, *Manihot esculenta* and *Herrania umbratical* with 100%, 71% and 70% identity respectively. The results of *CpRDR6* gene mutation assay shown 36 differences amino acids in HF39 No.1 when compared with all samples. And, the P (proline) has related to papaya resistance samples (KK80-Florida 67, Khonkhen 80 No.2, Male Florida and Female Florida), but has not been found in the samples that represent to susceptible papaya tree. In part of *CpeIF4E* gene has shown 1 position of nucleotide polymorphism in KDTP-Florida 47, is A (Adenine) which the other samples are G (Guanine). The polymorphism of nucleotide has changed the codon usage of amino acid from the E (Glutamic acid) to K (Lycine). Consequently, the found polymorphism of nucleotides and amino acids might be related to virus resistance papaya which needs to be further more study.

บทนำ

มะละกอ (*Carica papaya* L.) อยู่ในวงศ์ *Caricaceae* เป็นไม้ผลเขตร้อน และเขตกึ่งร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบทวีปอเมริกากลาง บริเวณประเทศเม็กซิโกตอนใต้ และประเทศคอสตาริกา พืชในวงศ์ *Caricaceae* มีทั้งหมด 4 สกุล (Genera) ได้แก่ สกุล *Carica* มีทั้งหมด 22 ชนิด (species) สกุล *Jacaratia* มีทั้งหมด 6 ชนิด สกุล *Jarilla* มีทั้งหมด 1 ชนิด และสกุล *Cylicomorpha* มีทั้งหมด 2 ชนิด (Devi, 1952) โดยสกุล *Carica*, *Jacaratia* และ *Jarilla* มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางแถบอเมริกา ส่วนสกุล *Cylicomorpha* มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางแถบเส้นศูนย์สูตรของแอฟริกา สกุลที่เข้ารับประทานมีเพียงสกุลเดียวเท่านั้น คือ *Carica* เช่น *Carica papaya* ใช้รับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก นอกจากนี้ *C. chinensis*, *C. goudotiana* และ *C. monoica* ใช้ส่วนใบมารับประทาน (Storey, 1976) มะละกอเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ประเภทไม้เนื้ออ่อนลำต้นเดี่ยว และมีใบขนาดใหญ่ลักษณะเป็นแบบ palmately lobe เจริญเติบโตได้เร็วในเขตร้อน ให้ผลผลิตประมาณ 4-8

เดือนหลังปลูก (วัฒนา, 2531) มะละกอสามารถนำมารับประทานได้ทั้งผลดิบ และผลสุก เป็นแหล่งสารอาหารที่ดีและมีวิตามินหลากหลาย น้ำยางที่ได้จากผลดิบยังมีเอนไซม์ปาเปน (papain) ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรม เช่น เครื่องสำอาง การฟอกหนัง ยารักษาโรค เป็นต้น (Lines *et.al.*, 2002) สำหรับประเทศไทยสามารถปลูกมะละกอได้ดีทั่วทุกภาค โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญ คือ จังหวัดราชบุรี นครปฐม ชุมพร นครราชสีมา และสระบุรี (สิริกุล, 2542) ปัจจุบันพื้นที่ปลูกมะละกอลดน้อยลงอย่างมาก เนื่องจากมีการระบาดของโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ ทำให้เกษตรกรไม่สามารถปลูกมะละกอได้ ทำให้ผลผลิตมะละกอลดลงอย่างต่อเนื่องทุกปี จากข้อมูลการปลูกมะละกอในปี 2546 มีพื้นที่ปลูก 150,000 ไร่ แต่ปี 2551 พื้นที่ปลูกลดลงเหลือแค่ 45,836 ไร่ ต่อปี (จริงแท้ และคณะ, 2552)

ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยมีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน (PRSV) มาเป็นเวลานาน การแพร่ระบาดดังกล่าวมีผลกระทบต่อปริมาณ และคุณภาพของมะละกอ โดยเฉพาะในแหล่งปลูกมะละกอที่สำคัญของโลก เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกาซึ่งมีการปลูกมากที่สุดในมลรัฐฮาวาย ได้เกิดการระบาดของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนอย่างรุนแรงในปี พ.ศ. 2535 จนต้องทำลายผลผลิตมะละกอไปกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ฮาวายต้องหามาตรการควบคุมโรค ซึ่งได้พยายามวิจัยเพื่อหาวิธีป้องกันกำจัดไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมาอย่างต่อเนื่อง (Sanford and Johnston, 1985) มะละกอที่เป็นโรคใบด่างจุดวงแหวนจะมีอาการใบสีเหลือง โปรงใสในระยะแรก ต่อมาจะมีอาการเขียวต่าง เมื่อโรคระบาดรุนแรงขึ้น พื้นที่ผิวใบจะแคบลง จนในที่สุดจะเหลืองแต่เส้นกลางใบที่มีลักษณะคล้ายด้าย ที่ก้านดอก ก้านใบและลำต้นส่วนบนจะปรากฏรอยช้ำเป็นขีด ๆ หรือวงกลมเล็ก ๆ ผิวของผลจะมีรอยจุดเป็นรูปร่างวงแหวนอยู่ทั่ว ถ้าเชื้อไวรัสเข้าทำลายมะละกอในระยะต้นอ่อนก็จะทำให้ต้นแคระแกรน หรือไม่สามรถเจริญเติบโตต่อไปได้ แต่ถ้าเป็นต้นที่โตแล้วก็พอจะให้ผลผลิตบ้าง แต่ทรงผลจะบิดเบี้ยว มีขนาดเล็ก ผิวผลปรากฏเป็นจุดวงแหวนเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่ว เนื้อภายในผลแข็งกระด้าง เนื้อสุกจะเป็นไตแข็ง รสขม ไม่สามารถรับประทานได้ (Gonsalves *et.al.*, 2008)

ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนอยู่ในกลุ่มโพตีไวรัส (potyvirus) ถ่ายทอดได้ทั้งแบบวิธีกาล และแมลงเป็นพาหะนำโรค ได้แก่ แมลงในกลุ่มเพลี้ยอ่อน เป็นการถ่ายทอดแบบไม่คงอยู่ในตัวแมลง (non-persistent) แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ ไวรัสใบด่างจุดวงแหวนชนิด P (PRSV-P) และชนิด W (PRSV-W) สำหรับชนิด P สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งมะละกอ และพืชตระกูลแตง ส่วนชนิด W จะทำให้เกิดโรคเฉพาะในพืชตระกูลแตงเท่านั้น และไวรัสสามารถเข้าทำลายมะละกอได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต (Purcifull *et.al.*, 1984) จีโนมโพตีไวรัสเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single-stranded, positive sense RNA) ความยาวประมาณ 10,326 นิวคลีโอไทด์ มี open reading frame (ORF) ขนาดยาว 1 ชุด ซึ่งมีลักษณะเป็น polycistronic คือหลังจากแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วจะได้โพลีโปรตีน (polyprotein) ขนาดใหญ่หนึ่งสายซึ่งเมื่อผ่านขบวนการย่อย (polyprotein processing) โดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ของไวรัส จะได้โปรตีนขนาดเล็กหลายชนิดเรียงลำดับจาก N-terminal (amino-terminal) ถึง C-terminal (carboxy-terminal) ของโปรตีน (หรือจากปลาย 5' ถึง 3' ของจีโนม) ได้แก่ viral genome linked protein (VPg), first protein (P1), helper component protein (HC-Pro), third protein (P3), cylindrical inclusion protein (CI), small nuclear inclusion protein (NIa), large nuclear inclusion protein (NIb) และ coat protein (CP) ดังภาพที่ 1 (Riechmann *et al.*, 1992) VPg และ CP เป็นโปรตีนที่ตรวจพบได้จากอนุภาคไวรัส โปรตีนชนิดอื่นคือ HC-Pro, CI, NIa และ NIb เป็นโปรตีนที่แยกได้จากพืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย ส่วน P1 และ P3 เป็นโปรตีนที่ยังไม่มีรายงานพบในพืชที่เป็นโรค (Dougherty and Carrington, 1988) โพตีไวรัสเริ่มแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 86–88 (AUG) และสิ้นสุดการแปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 10,118–10,120 (UAG, UGA, UAA) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 3,344 ตัว (Yeh *et.al.*, 1988)

การแปลรหัส (Translation) คือ ขั้นตอนแรกในการสร้างโปรตีน และเป็นส่วนหนึ่งของการแสดงออกของยีน (gene expression) เป็นการสร้างโปรตีนโดยอ่านรหัสจาก mRNA ที่ได้จากการถอดรหัส (transcription) เกิดในบริเวณไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ซึ่งมีไรโบโซม (Ribosome) อยู่ โดยไรโบโซมนั้นประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดใหญ่และหน่วยย่อยขนาดเล็ก โดยทั้ง 2 หน่วยย่อยจะมาประกบกันเมื่อมีการแปลรหัสจาก mRNA โดยจะทำการสร้างสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) จากการที่อ่านรหัสพันธุกรรมที่เป็นลำดับเบสบนสายของ mRNA ซึ่งรหัสพันธุกรรมนี้จะเป็นตัวกำหนดลำดับของกรดอะมิโน (amino acid) ในโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นมาจากการแปลรหัส มีอยู่ 4 ขั้นตอนคือ การเริ่มต้น (Initiation) การต่อสาย (Elongation) การย้ายตำแหน่ง (Translocation) และการสิ้นสุด (Termination) โดยขั้นตอนการเริ่มต้น จะเริ่มจากหน่วยเล็กของไรโบโซมจับกับปลาย 5' ของ mRNA โดยมี Initiation Factors (IF) เป็นตัวช่วย การสิ้นสุดของการสร้างสายโพลีเปปไทด์เกิดขึ้นเมื่อด้าน A ของไรโบโซมเป็นรหัสพันธุกรรมหยุด (UAA, UAG, UGA) ซึ่งจะไม่มีการเข้ามา แต่มี Releasing Factor จะเข้ามาทำให้ปล่อยสายโพลีเปปไทด์ออกไป ปลาย 5' ของ mRNA ไปเป็นปลาย N ของโพลีเปปไทด์ และขั้นตอนการแปลรหัสจะเริ่มสายโพลีเปปไทด์จากปลาย N ไปยังปลาย C

การเริ่มแปลรหัสพันธุกรรมของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) มีกลไกที่ขึ้นอยู่กับเกิดการปฏิสัมพันธ์โปรตีนทางด้าน 5'-7^mGpppN-cap และ 3'-poly(A) กับโปรตีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation initiation factors) โดย จะปฏิสัมพันธ์โปรตีนและจดจำกับ eukaryotic initiation factor 4F หรือ iso4E (Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002) การปฏิสัมพันธ์ด้าน 5' เรียกว่ากลไก cap-independent mechanism ซึ่งไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอในกลุ่ม Potyviridae, Luteoviridae, Tombusviridae และ *Tobamovirus* ไม่มีกลไกอื่นนี้ จึงต้องใช้ปลาย 5' ของจีโนมเป็นตัวทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนของปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรมของพืชในการจำลองตัวเอง (replication) (Kneller *et al.*, 2006) การแปลรหัสโปรตีนของพืชจะเริ่มที่ Translation initiation factor 4E (eIF4E) จับกับโครงสร้าง 7-methylguanosine cap ของเอ็มอาร์เอ็นเอ (McKendrick *et al.*, 1999) สำหรับไวรัสจุดดวงแหวนมะละกอที่อยู่ในกลุ่มโพทิวรัส มีโปรตีนทางด้าน 5' เรียกว่า virus-encoded protein (VPg) ที่ทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน eIF4E ได้ (Grzela *et al.*, 2006)

กระบวนการ RNA silencing คือ กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างหนึ่ง ซึ่งมีการยับยั้งการแสดงออกของยีนหลังการถอดรหัสพันธุกรรม (Post-Transcriptional Gene Silencing : PTGS) ไม่ให้เกิดการแปลรหัส (Translation) ไปเป็นโปรตีนต่อไปได้ สามารถเกิดขึ้นได้ในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตทุกชนิด รวมถึงเชื้อราด้วย ซึ่งกระบวนการเกิด RNA silencing เป็นการทำงานของ Dicer ที่จดจำตำแหน่งของ siRNA, hpRNA หรือ dsRNA เป็นต้น สามารถส่งถ่ายสัญญาณแบบ cell- to-cell และทางท่ออาหารได้ด้วย (Mlotshwa *et al.*, 2002)

การทำงานของกระบวนการ RNA silencing เริ่มจาก DCLs มี dsRNA-specific endonuclease ที่สามารถจดจำและจับ dsRNA ที่มีความคล้ายคลึง (homologue) กับ mRNA เป้าหมาย จะตัดสาย dsRNA ออกเป็นสายสั้นๆ ที่เรียกว่า small interference RNA (siRNA) ที่มีความยาวประมาณ 21-25 คู่ จากนั้น AGO2 จะเข้ามาจับ siRNA ดังกล่าวเกิดเป็น ribonucleoprotein complex (RNP) และเหนี่ยวนำให้โปรตีนชนิดอื่นเข้ามารวมกันเพื่อสร้างเป็น RISC complex จะทำการแยก siRNA สายคู่ออกเป็นสายเดี่ยว โดยสายเดี่ยวที่เป็น antisense ของ siRNA จะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย จึงเป็นตัวกำหนดความจำเพาะ และการจดจำให้ RISC complex เข้าจับ และทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ ซึ่ง RISC ที่มี siRNA สายเดี่ยวรวมอยู่ด้วย (RISC complex) เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอ เป้าหมายโดยอาศัยลำดับเบสคู่สมระหว่าง siRNA และเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นเอ็มอาร์เอ็นเอจะถูกย่อยโดย slicer ใน RISC

complex เป็นผลให้ไม่มีเอ็มอาร์เอ็นเอผ่านเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนจากยีนนั้นเกิดขึ้น การทำงานของ RNAi จึงเป็น post-transcriptional regulation of gene expression หรือ post-transcriptional gene silencing กระบวนการเกิด RNA silencing ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการสังเคราะห์ short interference RNA (siRNA) และ ขั้นตอนทำลาย mRNA เป้าหมาย (Qu *et.al*, 2008)

Xie และคณะ (2001) รายงานการสร้างต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม โดยยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA silencing ในส่วนของยีน *NtRDR1* เมื่อนำทดสอบปลูกถ่ายเชื้อ ไวรัสใบด่างยาสูบ (tobacco mosaic virus: TMV) พบว่า ต้นที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *NtRDR1* จะแสดงอาการอ่อนแอต่อโรคมากกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นต้นปกติ

Mallory และคณะ (2001) ได้ศึกษาการส่งถ่ายสัญญาณ RNA silencing ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1.) ต้นยาสูบยับยั้งการแสดงออกของยีน *GUS* (6b5) 2.) ต้นยาสูบที่มีการแสดงออกของ *GUS* (T19) และ 3.) ต้นยาสูบที่มีการแสดงออกของยีน *GUS* และยีน *Hcpro* (T19HC-Pro) เมื่อต้นนำ 6b5 มาทำเป็นต้นต่อ แล้วเสียบยอดด้วยต้น T19 และต้น T19HC-Pro พบว่า ยอด T19 จะไม่มีการแสดงออกของยีน *GUS* เนื่องจากต้นต่อมีการส่งสัญญาณ silencing ขึ้นไปหายอดได้ จึงทำให้ยอดที่มีการแสดงออกของยีน *GUS* ถูกยับยั้ง แต่ยอด T19HC-Pro มีการแสดงออกของยีน *GUS* แสดงว่ายีน *HcPro* สามารถยับยั้งการทำงานของกระบวนการ RNA silencing ได้ จึงทำให้ยีน *GUS* ถึงแสดงออกในต้น T19HC-Pro

การกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ปัจจุบันได้มีรายงานแล้ว ได้แก่ ยีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation initiation factors) จะเกิดปฏิสัมพันธ์โปรตีน (protein interaction) กับโปรตีนของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ทำให้มะละกอเกิดโรค แต่เมื่อมีการกลายของยีน *eIF4E* พบมะละกอสามารถต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอได้ สำหรับยีนในกลุ่มกระบวนการ RNA silencing เป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันของพืชให้ต้านทานต่อไวรัสได้ ดังนั้น หากพบว่ามะละกอมีการกลายของยีนในกลุ่มยีนนี้ อาจส่งผลให้โปรตีนจากไวรัสไม่สามารถเกิดการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนมะละกอได้ และอาจส่งผลให้ต้นมะละกอมีความต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ การทดลองนี้จึงได้ศึกษาการกลายของยีนในมะละกอ เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกต้นมะละกอทนทานต่อโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

1.1 การค้นหายีนและการออกแบบไพรเมอร์

ทำการค้นหายีนในกลุ่มปัจจัยเริ่มต้นการแปลรหัสพันธุกรรม (translation initiation factors) ได้แก่ ยีน *eIF4E* และยีนในกลุ่มกระบวนการ RNA silencing ได้แก่ *RDR6* จากฐานข้อมูล นานิวคลีโอไทด์ของยีน *eIF4E* หมายเลข accession FJ644949.1 และ ยีน *RDR6* หมายเลข accession KF668595.1 มาออกแบบและตรวจสอบด้วยโปรแกรม OligoClac (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) แล้วทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์

1.2 การสกัดดีเอ็นเอรวมจากใบมะละกอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบมะละกอพันธุ์แขกดำศรีสะเกษ โดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen นำใบปริมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และ β -mercaptoethanol ผสมอยู่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าสารละลายโดยการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นดูดสารละลายลงใน QIAshredder spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองด้วย QIAshredder spin column (ปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร) มาเติมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม absolute ethanol 0.5 เท่าของส่วนใส ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีดูดขึ้นและลง แล้วดูดสารละลายดังกล่าวลงใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ RW₁ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ล้าง column อีกสองครั้งโดยการเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยง column ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่เหลือค้างอยู่บน column ให้หมดไป ย้ายเฉพาะในส่วนของ column ไปวางลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เซอาร์เอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติม RNase free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มี RiboLock™ RNase Inhibitor ของบริษัท Fermentas ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.04 ยูนิต์ต่อไมโครลิตร

1.3 การสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวม

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสมด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ยี่ห้อ Thermo โดยนำอาร์เอ็นเอรวมความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร เติมไพรเมอร์ oligo(dT)₁₈ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัฟเฟอร์ 5X reaction 4.5 ไมโครลิตร RiboLock™ RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร และ RevertAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

1.4 การเพิ่มปริมาณยีน *CpRDR6* และ *CpelF4E* ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

นำ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ มาเพิ่มปริมาณยีน *CpRDR6* และ *CpelF4E* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ดังนี้

ไพรเมอร์สำหรับยีน *CpRDR6*

RDR6F: 5'-ATG GGG TCT GAA GGT AAT ATG AAG A-3'

RDR6R: 5'-TCA TAT TCT ATC AGC AAG ATA CCT T-3'

ไพรเมอร์สำหรับยีน *CpelF4E*

eIF4EF: 5'-ATG GTA GTA GAA GGA ACC CCC AAA C-3'

eIF4ER: 5'-TCA TAC CGG AGA GCG ATT CTT AGC A-3'

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

cDNA template	1	ไมโครลิตร
5x Buffer	5	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	2	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (25mM)	2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Forward (10 μM)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 μM)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	12.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ดูสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1.5 การโคลนยีนเข้าสู่พีซีอาร์เวกเตอร์

นำชิ้นยีนที่ได้จากพีซีอาร์มาทำปฏิกิริยา ligation ด้วยวิธีโคลนปลายทู่ (blunt-End Cloning) โดยใช้ชุด CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) ประกอบด้วย 2X reaction buffer 10 ไมโครลิตร ผลผลิตพีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร DNA blunting enzyme 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย Water nuclease-free ให้ได้ 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 3-5 วินาที บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็ง จากนั้นเติม pJET 1.2/blunt cloning vector (50 ng/ul) 1 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (5U/ul) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่น 3-5 วินาที บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที (สามารถบ่มได้นานถึง 30 นาที) นำปฏิกิริยา ligation ที่ได้ไปฝากถ่ายเข้าเก็บเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5α

1.6 การสกัดพลาสมิด

นำโคลนีของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดโดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook และ Russell (2001) ดูดเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้งไป เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl; (pH 8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ด้วยการ vortex เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นเติม lysis buffer (0.2 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ เติม precipitation buffer (5 M potassium acetate, 96 เปอร์เซ็นต์ acetic acid) ปริมาตร 225 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ แช่น้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสให้หมดใหม่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติม isopropanol ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใส (500 ไมโครลิตร) พลิกหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป

ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นและลง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนของพลาสมิดด้วยน้ำที่เติม RNase A ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบส

2. การตรวจสอบการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

2.1 ตัวอย่างมะละกอที่นำมาตรวจสอบการกลายของยีน

แบ่งตัวอย่างมะละกอออกเป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 มะละกอพันธุ์อ่อนแอต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

กลุ่มที่ 2 มะละกอพันธุ์ทนทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอที่มีการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ

กลุ่มที่ 3 มะละกอที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาที่ผ่านการคัดเลือกจากสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

สวน กรมวิชาการเกษตร

2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอจากใบมะละกอ

การตรวจสอบการกลายของยีน *CpeIF4E* จะทำการเพิ่มปริมาณจากอาร์เอ็นเอตามวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอในข้อที่ 1.2 สำหรับยีน *CpRDR6* ทำการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจากอรุณทัย และคณะ (2552) ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2% (W/V) CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)] เติมน้ำ 0.2% β -mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งใบมะละกอ 3 กรัม บดในโถรงด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำ Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติมน้ำ Chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำ 3M NaOAc 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติมน้ำ RNaseA(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *CpeIF4E* จาก cDNA ที่สังเคราะห์ได้ และยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ดังนี้

ไพรเมอร์สำหรับยีน *CpeIF4E*

eIF4EF: 5'-ATG GTA GTA GAA GGA ACC CCC AAA C-3'

eIF4ER: 5'-TCA TAC CGG AGA GCG ATT CTT AGC A-3'

ไพรเมอร์สำหรับยีน *CpRDR6* ในส่วนของ active site

atRDR6F: 5'-ACA AAA GCA TAT CGT CTG CCA CCG G -3'

atRDR6R: 5'-ATT GGA AGT ATC ATC ATT ATA GAC-3'

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

cDNA template	1	ไมโครลิตร
5x Buffer	5	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	2	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (25mM)	2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Forward (10 μM)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 μM)	1	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase, Pomega	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	12.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ดูสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.4 การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 100 ไมโครลิตร มาเติม PureLink® Binding Buffer (B2) จำนวน 1 เท่า คือ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน PureLink® Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนแอซิดของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E* มาถอดรหัสเป็นอะมิโนแอซิดด้วยโปรแกรม ExPASy translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>) แล้วทำ alignment ด้วยโปรแกรม Cluster Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) และเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนแอซิด

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี

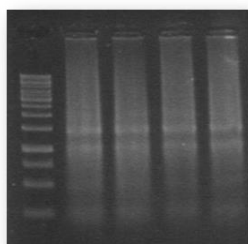
สถานที่ดำเนินการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

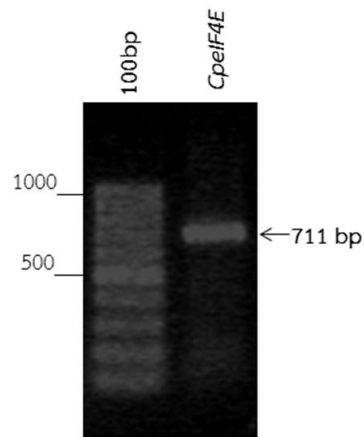
1. การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

การออกแบบไพรเมอร์จากนิวคลีโอไทด์ของยีน *eIF4E* หมายเลข accession FJ644949.1 และยีน *RDR6* หมายเลข accession KF668595.1 เฉพาะส่วน coding sequence ทั้งทางด้านหัวและท้ายยีน เมื่อตรวจสอบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoCalc ไม่พบการการม้วนพับ (hairpin) และการจับกันเองของไพรเมอร์ (Complementarity) ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีต่อการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบมะละกอด้วยชุด RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen พบว่า ที่ปริมาณใบ 0.5 กรัม เหมาะสมที่สุดทำให้ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณมาก (ภาพที่ 1) ปริมาณใบเริ่มต้นหากมากกว่า 0.5 กรัม มีผลต่อการสกัดทำให้ได้ปริมาณอาร์เอ็นเอ น้อยหรือไม่ได้เลย เนื่องจากปริมาณใบที่มากขึ้นส่งผลให้ปริมาณน้ำยาตามคำแนะนำของชุดสกัดไม่เพียงพอต่อการกำจัดสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ส่งผลให้เอ็นไซม์หลายชนิดยังคงทำงานได้ ทำให้ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอลดลง แต่ปริมาณใบที่น้อยกว่า 0.5 กรัม ไม่มีผลต่อการสกัดและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ



ภาพที่ 1. อาร์เอ็นเอรวมจากใบมะละกอที่สกัดด้วยชุด RNeasy Plant Mini Kit บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การโคลนยีนจากไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ พบว่ายีน *CpEIF4E* ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *eIF4EF* กับ *eIF4ER* เปรียบกับเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder จะมีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 2) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีส่วนของ coding sequence ทั้งหมดขนาด 711 คู่เบส จาก start codon ถึง stop codon (ภาพที่ 3) สามารถถอดรหัสเป็นอะมิโนแอซิดได้ 236 อะมิโน (ภาพที่ 4) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpEIF4E* กับฐานข้อมูล NCBI พบมีความเหมือนกับ *Carica papaya eIF4E*, *Vasconcellea monoica eIF4E* และ *Manihot esculenta eIF4E* ที่ identity 99, 93 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับลำดับอะมิโนแอซิดมีความเหมือนกับ *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana* และ *Manihot esculenta* ที่ identity 99, 92 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของยีน *CpRDR6* ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *RDR6F* กับ *RDR6R* เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส มีขนาดประมาณ 3500 คู่เบส (ภาพที่ 5) เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ยีนขนาด 3588 คู่เบส (ภาพที่ 6) มีความเหมือนกับ *Carica papaya RDR6*, *Morus notabilis RDR6* และ *Nicotiana glutinosa RDR6* มีค่า identity 100, 75 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อะมิโนแอซิดเหมือนกับ *Carica papaya*, *Manihot esculenta* และ *Herrania umbratica* ที่เปอร์เซ็นต์ identity 100 71 และ 70 ตามลำดับ จากข้อมูลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทำให้ทราบว่า ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนแอซิดของยีน *CpRDR6* และ *CpEIF4E* จากมะละกอ มีความเหมือนกับมันสำปะหลังมากที่สุด



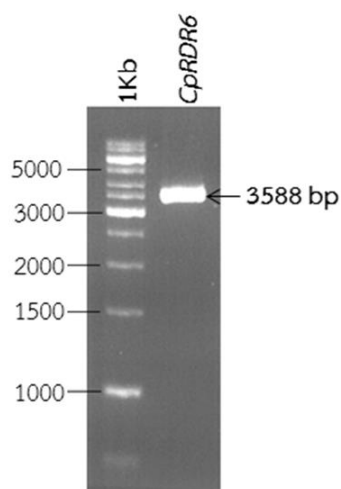
ภาพที่ 2. ชิ้นส่วนยีน *CpelF4E* ของมะละกอขนาดความยาว 711 คู่เบส ที่ได้จากอาร์เอ็นเอ บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCAATCCCAATACCGCGAACCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGCCGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTTTTGCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTCTGGTTTGATAACTTCTCTGCCAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTGTATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATGCTTCAAACATAAAATG
 AACCAAAATGGGAGGACCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCGTGAATGTCAGAGGCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTTC
 ACGAGGATGCAAAGAAGCTTGAGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCGGTATGA

ภาพที่ 3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *eIF4E* ในส่วนของ coding sequence ทั้งหมด ความยาว 711 คู่เบส

MVVEGTPKLSSTSV AEDKPNPNTANPNRSRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQPHPLEHPWTFWFDNFS
 AKSKQATWGSMSRVSYTFRTV EEFWSLYNNIHHSKLA VGADFYCFKHKIEPKWEDPVCANGGKWTMNFQRGKSD
 TCWLYTLLAMIGE QFDHGDEICGVVVNVRGRQEKIALWTKNAANEAAQMSIGKQWKEFLDYNDTMGFI FHEDAKK
 LERA AKNRSPV

ภาพที่ 4. ลำดับอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* ขนาดความยาว 236 อะมิโน



ภาพที่ 5. ชิ้นส่วนยีน *CpRDR6* ของมะละกอขนาดความยาว 3588 คู่เบส ที่ได้จากอาร์เอ็นเอ บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

ATGGGGTCTGAAGGTAATATGAAGAATACTGTGGTACTCAAGTTAGTTTTGGTGGTTTTGGTCGGAATGTTACGGCCAAAGAACTAACGGAGT
TTTTGGAAGAAGAGTTGGACTTGTATGGAGACGTAGATTGAAGACTTCTTGACCCCTCCAGACTCCTTCCAGATTTTTGGATAACTGATAT
GGCAGGTGTCTGGAGGTCGGATAACTACAAGAAGTGGAGCCACATGCATTTGTTTCATTTTGCCTTGCCTAAATCGGCAACTAGAGCCATGGAG
GCTTCCGGTCGTGGTGGATTATTTTTAAAAATCAACTATTGAAGCCAGTCTGGGTCCAGAGATTCAATTCACATGAATCAGAGGAGGAGGA
CCATGATCCCCTTCAAGTTAGTTGATGTGGTCTTGGAGATTGGAACCTTGGTTAGTCCAGGTGAGTTTATTGTTGGTGGAGAGGACCTTCTC
TGGGATTGAATTTCTAGTGGATCCTTTTACAGGACATGCAAGTTTGTCTCAAGAGATATGGCTTCTCTTTCAGAGGCAGTGTAGAGCAT
GCAGTGATAAAATGTAATTTAAGATGGAGTCTTGGTGGAGAAATTAAGTGGATTCTAACTACAAAGATTATCAGGTTTGTAAATTTATGT
TGCAGCTGGCTTCCACCCTGGCTTGGTATAGAAGTGGTGGTATGATGATATGAAACAGTTGCTTTTGGATGTTTGGATGATGATGATCC
TTGGATAAGAACCCTGATTTTACTCCTAGTGGAGCTTTCGGTGGATGTAATTCCTACAGGGTTTTCTATTCTCCCGCTATGAGGAAAAATG
AAAAATATCTGGGAATATCTCAGAATCAGAGGGTGGCTGTTACAGCCCTAAGTGGCCACCGAGTGTGAGGGATGAACCTGATTTTGGGATTC
CCATGTCAGACATATCTCTTCTATCCATTACAGAAAAGTATTGAATTTGAGATACTTTTTTTTGTGAAATGCGGTAATGCACAAAGGCATCTT
TAACCAGTATAGGATGACTGGAAGTTTCTTTGATCTACTAAGAAGCCACCCAGGAGGTAATTTGGCTGCACGAAGCAGCATCTGGTCTCT
AAATGCCAGTGTGTGACGCTACAAGAGGTTGAAACTTGTCCAAGAATGGATTTTGAAGAATCCCAAGGTAATTCAGAGACCCAGCAGATGA
TCGATATTGTTGAGATCAGACGGCTGGTATTACTCCACAAAAGCATATCGTCTGCCACCGGAAGTTGAACTTTCCAATAGGGTCTTAGAAG
ATATAATGATGTCTGTAGATTTTTAAGGGTCACTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAAATGTTCTGAACTATATGTTGCC
TAACCAGTAAAGGACTTAACATAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTGACTACTTAAAGGTTTAAATTTGT
GTGGGCGAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCTATCCAACCAATTTGAGGACCGTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACACATCCGTTCA
TAATATCACAATGGAAGGGGGAAGTTCAGTACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTACA
ATAGAAGTTCCATCACTAGAGGTCATTTTGGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATG
ATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTTGT
GGCTTTGGCCATCAAAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCTACTGAGCCAGCTGAACAATACTACGTTAACCATGCTATCTGGAGATTTGT
TCTTGGACAAGATTTGAGCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTGTTACTTACTTTGAGCCTAATTTGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGACATGA
TGGAGTCTATGATTTTCAAATTACACAAGATGGTAGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAG
TGGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGC
CTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTCTTCTGGAAGGTGGTGTGATGGCTGCTTGGATGAACCTGGCAGTATAGAACAAGGCCAGTGTTC
TCCAGGTTCTCCGGTCCATCACTACAAAATGCTTTTCAAACATGGTCTTAGGTTTTCTGAGATCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATT
TGTGGTGTAGCGAAGATCCTTCTTCTATCCAGGGGATATAAGAATTTCTGAAAGCTGTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATGTC
CTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCAGCTTGTGATGGGGATCTTATTTTGTACCTGGGATGAAA
ATCTTTTCCACCAGCAAAAGGAGTGGACTCCTATGATGATGCAACCTGAGATACCAAAACTTTGACACACCCCTGACAGCATCAGGACAT
AATAGGATTTTTTCCAAGAACATGGTACATGAAAATTTGGGAGCAATTTGCAATGCCCATGTTGGTTCATGCTGACAGGAGTGTGATGGAGCT
TTGGACGAGAAGTGCATCTCTTGGCAGATTTGGCAGCTATAGCTGTGATTTTCCCAAGACTGGGAAACTTGTGACAATGCCTTCTCATTTAA
AACCAAAAATCTACCAGATTTTATGGGAAAAGAGGATTATCGATCATATAAATCAAATAAAATTTCTGGGAAGGTTGTATCGACGCATAAAA
TGCTATAATGATGACTTCCAATGCAGATTTTGTACCGGAGATATCCCTTATGATGACTGATTGGATAAAACCCGATCTGCCGTTTTCTT
CTTGTGCTGGGCCAGAGTGTTTATACGATTTGGCAGCTTACCAGTCTTCTTGGCAGTATAAAGTAAAAGGGAAGAAGAGATTGTAACAG
GCCATGTTGGTCTATGCCTAGATACACAGTAGGAAGGAAGGGGAGCTGAAGGAGAGGCTGAAACATTTTACAGTGTCTTGAAGAAAGAAT
CCGACAGATTTTTGAGAACATGCACCCAGAATTTGAGCAACTCACTGAGGATGAGAAGATATTTGTATGAACAGAAGGCATCAGCTTGGTAC
CAGTTTTGTACCACCCCAAGTGGTGGATAAAATCTCGGAAATGCAAGAGCTGTTTGTGCTGAAAATCCCTTAATGTTGAGTTTTGATGGA
TTGCGGTTGATTACCTTGTCTGAATCAAGATCAAATCTCGTCAAATGGGAGATATTGATTTCTACCAAGCCAGTCAACTCTTAGCAAGGTATCT
TGCTGATAGAATATGA

ภาพที่ 6. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CpRDR6 ในส่วนของ coding sequence ความยาว 3588 คู่เบส

MGSEGNMKNVTVVTVQVSFGGFGRNVTAKELETFLEEEVGLVWRRRLKTSCTPPDSFPDFRITDMAGVWRSDNYKKV
EPHAFVHFALPKSATRAMEASGRGGLFFKNQLLKASLGPESSEFHMNQRRRTMIPFKLVDVGLIEIGTLVSPGEFIV
GWRGPSSGIEFLVDPFDRCTCKFCFSRDMASFVRGSVEHAVIKCNFKMEFLVREITEISNYKDSSGFVIMLQLASP
PWLWYRTAGDDVYETVAFDVLDLDDDPWIRTTDFTPSGAFGRCNYSYRVSISPRYEGKLNKIWEYLQNRVVRVHSLK
WPPSVRDELDFGIPMSDIFSSIHYRKGIEFEILFLVNAVMMHKGIFNQYRMTGSSFFDLRSQPKEVNLAALKHIWS
SKCPVFDAYKRLKLVQEWILKNPKVLQRPKQIMIDIVEIRRLVITPTKAYRLPPEVELSNRVLRRYNDVSDRFLRV
TFMDEGMQITINLNLVNYVVASIVKDLTSNSAPQKTTFVFKRVKTI LTNGFNLCGRKYSFLAFSSNQLRDRSAWFFA
EDKNTSVHNI TNRGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEVN FELKEIKRNGYVFS DGI G T I SHDLTME
VVEKLLKLDMMNPPSFAQIRYAGCKGVVACWPSKGDGIRLSLRPSMNKFTSNHAIL EICSWTRFQPGFLNRQIVTL
LSALIVPDEVFVWDMMESMI FKLHKMVEDPDVAFEVLLASCSEQNSAAIMLSAGFNPLTEPHLRGMLASIRAAQL
WGLREKARIFVPSGRWLMGCLDELAVLEQQGCFIQVSGPSLQNCFSKHGSRFSEIQRNLEVVKGFVVI AKNPCLH
PGDIRILEAVDAPDLHHLCDCLVFPQKGRPHTNEASGSDLDGDLYFVTW DENLVPPSKRSWTPMDYEPADTKTL
THPVSHQDIIGFFAKNMVHENLGAICNAHVHADRSEYGALDENCILLAE LAAI AVDFPKTGKLV TMP SHLKP KI
YPDFMGKEDYRSYKSNKILGRLYRRIKDVYND DTSNADFVTGDI PYD TDLDKPGSAGFLLDAWAQKCLYDWQLTS
LLGQYKVKREEEIVTGHVWSPRYTSRKEGELKERLKHYSVLKKEFRQIFENMHPEFEQLTEDEKNILYEQKAS
AWYQVCYHPKWVDSRELQEPVCAENPLMLSFAWIAVDYLARIKIKSRQMGDIDSTKPVNSLARYLADRI

ภาพที่ 7. ลำดับอะมิโนเอซิดของยีน CpRDR6 ขนาดความยาว 1194 อะมิโน

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* และ *CpelF4E* ที่โคลนได้จากอาร์เอ็นเอกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอจากมะละกอ พบว่า ยีน *CpRDR6* มีส่วนของ coding sequence บนโครโมโซมยาว 1773 คู่เบส (ภาพที่ 8) และเป็นส่วน active site ของโปรตีน ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จากดีเอ็นเอ การทดลองนี้จึงได้ทำการตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* ตรงส่วนของ active site โดยการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ atRDR6F และ atRDR6R แต่ยีน *CpelF4E* มีส่วน coding sequence เพียงแค่ 200 คู่เบส และขนาดยีนในส่วนของ coding sequence ทั้งหมดยาวเพียง 711 คู่เบส จึงเพิ่มปริมาณจากอาร์เอ็นเอในการตรวจสอบการกลายของยีน

```
ACAAAAGCATATCGTCTGCCACCGAAGTTGAACCTTCCAATAGGGTTCTTAGAAGATATAATGATGTGTCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCT
TTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACATATTGTTGCCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCA
AAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAATATCTTTTTCTAGCCTTTTCATCCAAC
CAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACACATCCGTCATAATATCACAAATGGAAGGGGGAAGTTCACTGACCGAA
ACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCCATCACTAGAGGTCAATTTGAGCTTAA
AGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGAC
ATGAACAACCCCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGGCAAGGGGTTGTGGCTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGT
CACTGAGGGCCAGCATGAACAAATTCACGTTAACCATGTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGCCTGGTTTCTTGAACAGGCA
GATTGTTACCTTACTTTTCAGCGTAATTTGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTACACAAGATGGTAGAG
GACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGACAAGGGAATAGTGGCGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTAA
CAGAACCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAG
GTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCGGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTCG
AAACATGGTTCTAGGTTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAATCCTTGTCTTCCATCCAGGG
ATATAAGAATTTTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCTTGTTCCTTCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAA
TGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAAAGAGCTGGACTCCTATG
GATTATGAACCTGCAGATACCAAAAATTTGACACACCCCTGTAGCCATCAGGACATAATAGGATTTTTTGCCAAGAACATGGTACATGAAAAT
TGGGAGCAATTTGCAATGCCATGTGGTTCATGCTGACAGGAGTGAATGAGCTTTGGACGAGAATGCACTACTTGGCAGAATTGGCAGC
TATAGCTGTCGATTTTCCAAAGACTGGGAACTTGTGACAATGCCTTCTCATTTAAAACCAAAAATCTACCCAGATTTTATGGGAAAAGAGGAT
TATCGATCATATAAATCAAATAAATTTCTGGGAAGGTTGTATCGACGCATAAAAGATGTCTATAATGATGATACTTCCAAT
```

ภาพที่ 8. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpRDR6* ในส่วนของ active site ความยาว 1773 คู่เบส

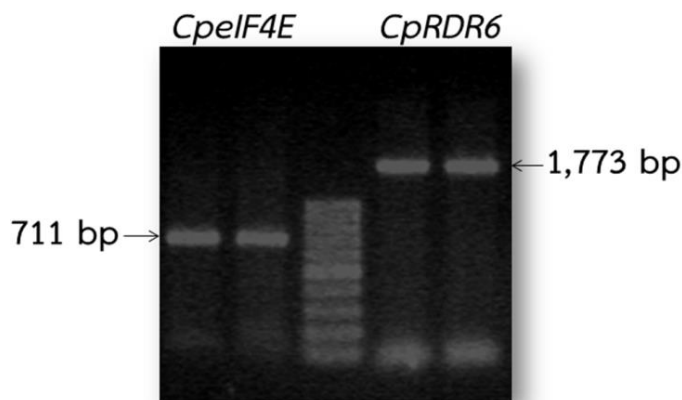
2. การตรวจสอบการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

การตรวจสอบการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอได้ทำการตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอ และ *CpelF4E* จากอาร์เอ็นเอ ที่สกัดจากใบมะละกอ โดยแบ่งตัวอย่างมะละกอเป็น 3 กลุ่ม จากตัวอย่างมะละกอทั้งหมด 24 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 1 เป็นตัวแทนมะละกอพันธุ์อ่อนแอต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ มข.(ธ3) แยกคำศรีสะเกษ (R1T1) และแยกคำศรีสะเกษ (R3T1) กลุ่มที่ 2 มะละกอพันธุ์ทนทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอที่มีการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ จำนวน 14 ได้แก่ Florida ต้นตัวผู้, Florida ต้นตัวเมียม ขอนแก่น 80 ต้นที่ 1, ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2, KK80-Florida 67, KK80-Florida 19, KDTP-Florida 4, KDTP-Florida 12, KDTP-Florida 76, KDTP-Florida 41, KDTP-Florida 47, KDTP-Florida 27, KDTP-Florida 34 และ KDTP-Florida 74 กลุ่มที่ 3 มะละกอที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาที่ผ่านการคัดเลือกจากสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร 4 ตัวอย่าง ได้แก่ M13-12 ต้น 1, M13-12 ต้น 2, M13-15 และ M13-6 21 นอกจากนี้สถาบันวิจัยพืชสวนศรีสะเกษได้ทำการทดสอบต้นมะละกอที่ทนทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอในแปลงปลูก พบมีต้นมะละกอที่ทนทานต่อโรคไม่แสดงอาการของโรคทั้งที่ต้นบริเวณรอบด้านเป็นโรคหมด จึงได้นำมาตรวจสอบการกลายของยีนด้วย จำนวน 3 ต้น ได้แก่ HF33 1/1, HF39 ต้น 1 และ HF39 ต้น 2 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ตัวอย่างมะละกอที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E*

No.	ตัวอย่างมะละกอ	สถานที่ปลูก	กลุ่มตัวอย่างมะละกอ
01	พันธุ์ มข.(๕3)	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	อ่อนแอ
02	Florida ต้นตัวผู้	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
03	Florida ต้นตัวเมีย	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
04	ขอนแก่น 80 ต้นที่ 1	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
05	ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
06	แขกดำศรีสะเกษ (R1T1)	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	อ่อนแอ
07	แขกดำศรีสะเกษ (R3T1)	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	อ่อนแอ
08	KK80-Florida 67	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
09	KK80-Florida 19	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
10	KDTP-Florida 4	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
11	KDTP-Florida 12	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
12	KDTP-Florida 76	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
13	KDTP-Florida 41	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
14	KDTP-Florida 47	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
15	KDTP-Florida 27	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
16	KDTP-Florida 34	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
17	KDTP-Florida 74	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น	ทนทาน (ตามธรรมชาติ)
18	M13-12 ต้น 1	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	ทนทาน (จากการฉายรังสี)
19	M13-12 ต้น 2	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	ทนทาน (จากการฉายรังสี)
20	M13-15	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	ทนทาน (จากการฉายรังสี)
21	M13-6 21	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	ทนทาน (จากการฉายรังสี)
22	HF33 1/1	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	อยู่ในระหว่างการเก็บข้อมูล
23	HF39 ต้น 1	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	อยู่ในระหว่างการเก็บข้อมูล
24	HF39 ต้น 2	ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ	อยู่ในระหว่างการเก็บข้อมูล

การตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ atRDR6F กับ atRDR6R และ ยีน *CpeIF4E* ด้วยไพรเมอร์ eIF4EF กับ eIF4ER จะได้ชิ้นส่วนยีนขนาด 1773 คู่เบส และ 711 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 9) การเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ทั้งสองไพรเมอร์พบว่ายังมีการปนเปื้อนการจับกันของไพรเมอร์ (primer dimer) การส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้ผลผลิตพีซีอาร์โดยตรง ไม่ได้ทำการโคลนเข้าสู่พีซีอาร์เวคเตอร์ก่อน จึงจำเป็นต้องทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ก่อนนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบส หากไม่บริสุทธิ์จะมีผลต่อการวิเคราะห์ อาจทำให้ได้สายนิวคลีโอไทด์สั้นลงหรือไม่ได้เลย



ภาพที่ 9. ชิ้นส่วนยีน *CpRDR6* จากทีเอ็นเอ และ *CpeIF4E* จากอาร์เอ็นเอ ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์การกลายของยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E* จะนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองด้าน (ด้าน Forward และ Reverse) มารวมเข้าด้วยกัน (assembly) ตัดส่วนที่คาดว่าวิเคราะห์ไม่สมบูรณ์ทางด้านปลายทั้งสองด้าน นำลำดับนิวคลีโอไทด์แปลรหัสเป็นลำดับอะมิโนเอซิดด้วยโปรแกรม ExPASy translate tool แล้ววิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิดด้วยโปรแกรม Clustal Omega พบว่า ยีน *CpRDR6* ในตัวอย่าง HF39 ต้น 1 มีลำดับอะมิโนเอซิดที่แตกต่างจากทุกตัวอย่างถึง 36 อะมิโน (ภาพที่ 11) ซึ่งน่าสนใจในการนำไปพัฒนาและศึกษาความทนทานต่อโรคไวรัสจุดวงแหวนต่อไป เนื่องจากต้นดังกล่าวไม่ถูกทำลายด้วยไวรัสจุดวงแหวน ในขณะที่ต้นรอบข้างทุกต้นถูกทำลายด้วยไวรัสรอบด้าน การวิเคราะห์ลำดับอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* ยังพบความแตกต่างของอะมิโนเอซิดที่สัมพันธ์กับตัวอย่างที่ทนทานต่อไวรัส คือ ลำดับอะมิโน P (proline) ในตัวอย่าง KK80-Florida 67, ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2, Florida ต้นตัวผู้ และ Florida ต้นตัวเมีย (ภาพที่ 12) ซึ่งเป็นตัวอย่างต้นที่ทนทานแต่ไม่พบในตัวอย่างต้นที่อ่อนแอเลย สำหรับตัวอย่างอื่นพบเป็นลำดับอะมิโน T (Threonine) ความแตกต่างในจุดนี้อาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานของมะละกอ ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต สำหรับยีน *CpeIF4E* พบความแตกต่างของตัวอย่าง KDTP-Florida 47 เพียง 1 ตำแหน่ง คือ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น A (Adenine) ซึ่งตัวอย่างอื่นทุกตัวอย่างเป็น G (Guanine) (ภาพที่ 13) ส่งผลให้ลำดับอะมิโนเอซิดเปลี่ยนไปเป็น K (Lycine) จากอะมิโน E (Glutamic acid) (ภาพที่ 14) การเปลี่ยนแปลงอะมิโนดังกล่าวอยู่ทางด้าน N-terminal ของโปรตีน อาจไม่มีผลต่อความต้านทานต่อไวรัส เนื่องจากมีรายงานของ Nieto และคณะ (2006) รายงานไว้ว่า eIF4E เป็นปัจจัยที่ทำให้พืชอ่อนแอและไม่ต้านทานต่อไวรัส ปัจจุบันมีรายงานว่าพืชตระกูลแตงเกิดความต้านทานต่อไวรัส เมื่อ eIF4E มีการกลายของยีนส่งผลให้ลำดับอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป เมื่อถูกเชื้อไวรัส *Melon necrotic spot virus* (MNSV) ที่อยู่ในกลุ่มโพที่ไวรัสเข้าทำลาย พืชเกิดความต้านทานต่อไวรัสเมื่ออะมิโนเอซิดตำแหน่งที่ 228 ซึ่งอยู่ทางด้าน C-terminal เปลี่ยนไป จากผลการทดลองดังกล่าว Nieto ได้ทำการทดลองต่อไป พบว่า Translation initiation factor 4E และ 4G สามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อไวรัสได้หลายชนิดในธรรมชาติ จากการเกิดการกลายของยีนที่เปลี่ยนอะมิโนเอซิดเพียงจุดเดียว โดยทดสอบกับไวรัสดังต่อไปนี้ *Melon necrotic spot virus* (MNSV) strains MA5, MNSV strains 264, *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus strain W* (PRSV-W), *Watermelon mosaic virus* (WMV) และ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) ด้วยเทคนิค EcoTILLING พบว่า หากอะมิโน

ตำแหน่ง 228 เปลี่ยนไปเป็น His จะเกิดความต้านทานต่อ CVYV, PRSV, WMV และ ZYMV สำหรับ CMV และ MNSV- MA5 อะมิโนตำแหน่ง 228 เปลี่ยนไปเป็น Leu จึงเกิดความต้านทาน (Nieto et al., 2007) อย่างไรก็ตามการยีน *CpeIF4E* ในต้นที่ทนทานหรือต้นที่อ่อนแอไม่มีความแตกต่างกันทางด้าน C-terminal นั้นหมายความว่าไวรัสสามารถจำลองตัวเองได้อย่างปกติเมื่อเข้าสู่มะละกอ ซึ่งการยับยั้งการสร้างโปรตีน eIF4E ในมะละกอจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการสร้างมะละกอต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอได้

```

HF39_1          EPGERQCF LFLLESGLMG LGMNVAVLE TRASCFTQQLQSTIYKIAFSKHGSRFSEIQRN
FloridaW       LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDSK_R1T2      LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KK80_1         LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPF1o41     LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPF1o47     LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPF1o27     LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPF1o74     LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
M13_12_1      LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
HF33_1_1      LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
HF39_2        LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KK80F1o19     LREKARIFVP-SGRGLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KKU_T3        LREKARIFVP-SGRWLKGLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPF1o04     LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPF1o76     LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPF1o734   LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
M13_12_2      LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KK80F1o67    LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
FloridaM      LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KK80_2        LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDSK_T3R1     LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
KDTPF1o12    LREKARIFVP-SGRWLMGCLDE-LAVLE-QGQCF-IQVSSPSLQNCFSKHGSRFSEIQRN
: : * :      * * *      * * * * : . . *      : . * : : . * : * * * * * * * * *

```

ภาพที่ 11. การเปรียบเทียบอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ที่มีความแตกต่างกันของลำดับอะมิโนเอซิดเฉพาะตัวอย่าง HF39 ต้น 1 (ในแถบสีแดง)

```

KK80F1o67      SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDSK_R1T2      SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KK80_2         SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
FloridaW       SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
FloridaM      SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
HF39_2        SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
HF33_1_1      SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
M13_12_2      SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
M13_12_1      SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPF1o74     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPF1o734   SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPF1o27     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPF1o47     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPF1o41     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPF1o76     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPF1o12     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDTPF1o04     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KK80F1o19     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KDSK_T3R1     SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KK80_1        SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
KKU_T3        SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
M13_6         SNQLRDRSAWFFAEDKNI SVHNI TNWMGKFTDRNVAKCAARMGQCFSSSTYATIEVPSLEV
*****

```

ภาพที่ 12. การเปรียบเทียบอะมิโนเอซิดของยีน *CpRDR6* ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ที่มีความแตกต่างกันของลำดับอะมิโนเอซิด (ในแถบสีแดง)

```
eIF14      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF01      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF02      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF03      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF07      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF11      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF12      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF15      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF16      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF17      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF05      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF08      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF09      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF18      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF24      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF06      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF10      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF23      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF19      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF13      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF04      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF20      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF21      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
eIF22      ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCAAT
*****
```

ภาพที่ 13. การเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ยีน *CpelF4E* ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ที่มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ในแถบสีแดง)

```
eIF23      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF22      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF21      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF20      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF19      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF13      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF10      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF06      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF01      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF02      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF03      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF04      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF05      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF07      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF08      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF09      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF11      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF12      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF14      MVV GTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF15      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF16      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF17      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF18      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
eIF24      MVVEGTPKLSSTVAEDKPNPNTANPNRPRGDEEDEGP EEGEIVDEDESKRSSAVLLQP
***
```

ภาพที่ 14. การเปรียบเทียบอะมิโนเอซิดของยีน *CpelF4E* ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ที่มีความแตกต่างกันของลำดับอะมิโนเอซิด (ในแถบสีแดง)

สรุปผลการวิจัย

การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจาก นิวคลีโอไทด์ของยีน *eIF4E* หมายเลข accession FJ644949.1 และยีน *RDR6* หมายเลข accession KF668595.1 พบว่ายีน *CpelF4E* มีขนาด 711 คู่เบส จาก start codon ถึง stop codon สามารถแปลรหัส

เป็นอะมิโนแอซิดได้ 236 อะมิโน การเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบมีความเหมือนกับ *Carica papaya eIF4E*, *Vasconcellea monoica eIF4E* และ *Manihot esculenta eIF4E* ที่ identity 99, 93 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับลำดับอะมิโนเอซิดมีความเหมือนกับ *Carica papaya*, *Vasconcellea goudotiana* และ *Manihot esculenta* ที่ identity 99, 92 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของยีน *CpRDR6* มีขนาด 3588 คู่เบส มีความเหมือนกับ *Carica papaya RDR6*, *Morus notabilis RDR6* และ *Nicotiana glutinosa RDR6* มีค่า identity 100, 75 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อะมิโนเอซิดเหมือนกับ *Carica papaya*, *Manihot esculenta* และ *Herrania umbratica* ที่เปอร์เซ็นต์ identity 100, 71 และ 70 ตามลำดับ

การตรวจสอบการกลายของยีน *CpRDR6* จากดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ atRDR6F กับ atRDR6R และยีน *CpeIF4E* จากอาร์เอ็นเอด้วยไพรเมอร์ eIF4EF กับ eIF4ER จะได้ชิ้นส่วนยีนขนาด 1773 คู่เบส และ 711 คู่เบส ตามลำดับ การวิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิด พบว่ายีน *CpRDR6* ในตัวอย่าง HF39 ต้น 1 มีลำดับอะมิโนเอซิดที่แตกต่างจากทุกตัวอย่างถึง 36 อะมิโน และพบความแตกต่างของอะมิโนเอซิดที่สัมพันธ์กับตัวอย่างที่ทนทานต่อไวรัส คือ ลำดับอะมิโน P (proline) พบในตัวอย่าง KK80-Florida 67, ขอนแก่น 80 ต้นที่ 2, Florida ต้นตัวผู้ และ Florida ต้นตัวเมีย ซึ่งเป็นตัวอย่างต้นที่ทนทานแต่ไม่พบในตัวอย่างต้นที่อ่อนแอเลย สำหรับยีน *CpeIF4E* พบความแตกต่างของตัวอย่าง KDTP-Florida 47 เพียง 1 ตำแหน่ง คือ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น A (Adenine) ซึ่งตัวอย่างอื่นทุกตัวอย่างเป็น G (Guanine) ส่งผลให้ลำดับอะมิโนเอซิดเปลี่ยนไปเป็น K (Lycine) จากอะมิโน E (Glutamic acid) แต่การเปลี่ยนแปลงอะมิโนดังกล่าวอยู่ทางด้าน N-terminal ของโปรตีน อาจไม่มีผลต่อความต้านทานต่อไวรัส สำหรับตัวอย่างอื่นพบเป็นลำดับอะมิโน T (Threonine) อย่างไรก็ตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนเอซิดที่พบอาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานของมะละกอ ซึ่งน่าสนใจและจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

กิจกรรมที่ 2

การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ

การทดลองที่ 2.1

การโคลนยีนและการแสดงออกของยีน *N-acetylglutamate synthase*

เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ

Gene Cloning and Gene Expression of *N-acetylglutamate synthase* for Drought Stress in Model Plant

สุภาวดี จ้อเหรียญ ภรณ์ สว่างศรี ภูมรินทร์ วณิชชานันท์
อัจฉราพรรณ ใจเจริญ สมชาย หลวงสนาม

คำสำคัญ

การโคลนยีน (gene cloning), การแสดงออกของยีน (gene expression), สภาวะขาดน้ำ (drought stress), การถ่ายยีน (gene transfer), ยาสูบ (*Nicotianum tabaccum*), NAGS (*N-acetylglutamate synthase*), อาร์จินีน (arginine), ออร์นิทีน (ornithine), โพรลีน (proline), วัฏจักรยูเรีย (urea cycle)

บทคัดย่อ

การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในมะเขือเทศ มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืชสำหรับนำไปใช้ ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืชได้ โดยยีน NAGS เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์สารออร์นิทีน (ornithine) อาร์จินีน (arginine) และโพรลีน (proline) ซึ่ง ornithine และ arginine เป็นสารสำคัญในวัฏจักรยูเรีย (urea cycle) เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดแอมโมเนียส่วนเกินออกจากเซลล์ ส่วน proline ทำหน้าที่เป็นสารออสโมไลต์ช่วยป้องกันการเสียหายของโปรตีน และโครงสร้างของเซลล์ ทำให้พืชสามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะเครียดอันเนื่องมาจากสภาวะขาดน้ำ งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน NAGS จากมะเขือเทศ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) จากยีน NAGS ในพืชชนิดต่างๆ ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล NCBI นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ได้แก่ เซอร์รี่ ท้อ และสีกา ได้ยีนขนาด 9,345 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม Software GenScan Version 1.0 พบว่า ยีน NAGS ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 10 exon, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง TATA signal (TATAAA) อยู่ในส่วนของ 5'UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 112–117, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง PolyA signal (AATAAA) อยู่ในส่วนของ 3'UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 9111–9116 จากนั้นทำการโคลนยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน โดยการทำปฏิกิริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ซึ่งได้เติมตำแหน่งจดจำ

ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส สามารถโคลนยีน *NAGS* มีขนาดเท่ากับ 1,812 คู่เบส และถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *NAGS* ได้เท่ากับ 604 amino acids เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ที่โคลนได้จากมะเขือเทศมีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *NAGS* ที่พบในมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) (FJ543466.1) และ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (XM_006350559.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อยีน *SINAGS* เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน *NPTII* เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก ได้พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *SINAGS* มีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส สามารถนำชุดยีนดังกล่าวไปศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชต้นแบบ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปพัฒนาพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สนใจ เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง อ้อย ฯลฯ เพื่อเพิ่มศักยภาพการทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไปในอนาคต

Abstract

N-acetylglutamate synthase (NAGS) genes is a major enzyme in ornithine, arginine and proline biosynthesis. Ornithine and arginine are important amino acid in urea cycle that involved the process of removing excess ammonia from the cells. Proline acts as an osmolite preventing against protein degradation and maintaining cell structure. These enzymes play a critical role in regulating plant responses in order to survive under abiotic stress conditions such as drought and high salinity. In this study, a full-length genomic DNA sequences of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) encoding *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* have been isolated from tree tomato variety names cherry, tho and seeda via PCR – based method. The gene sequence contains a fragment of 9,345 bp, including with 10 exons, a 1,812 bp complete ORF, plus a TATA signal (TATTTATT) and a polyA signal AATAAA motif. *SINAGS* gene encoding the 604 amino acid polypeptide. The highly conserved region of the gene is probable amino-acid acetyltransferase *NAGS1* which are also found in dicots *Solanum lycopersicum* (L.) (FJ543466.1) and *Solanum tuberosum* (L.) (XM_006350559.2) with 99% and 98% of homology respectively. A 1,812 bp fragment of the *SINAGS* gene was amplified by RT – PCR method with the addition of *Bam*HI and *Kpn*I restriction sites for protein translation purpose and then inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator, *nptII* as selectable marker with total size of 11.5 kb for pCAMBIA2300 – *SINAGS* over – expression cassette.

บทนำ

สภาวะเครียด (abiotic stress) ได้แก่ สภาวะแห้งแล้ง ดินเค็ม อุณหภูมิต่ำทำให้อากาศหนาวเย็น หรืออุณหภูมิสูงทำให้อากาศร้อน ที่เกิดจากภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) หรือ ภาวะโลกร้อน (Global Warming) ซึ่งปัจจุบันมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น และเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการดำรง

อยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ทำให้ไม่สามารถคาดการณ์ปริมาณน้ำฝนที่ตกในแต่ละปีได้ อาจเกิดสภาวะน้ำท่วมฉับพลัน หรือเกิดความแห้งแล้งอย่างรุนแรง ส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ โดยอาศัยวิธีการแบบปกติ (conventional breeding) ที่ผ่านมามีไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร และต้องอาศัยระยะเวลาอันยาวนานในการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะตรงตามต้องการ ปัจจุบันนักวิจัยได้พยายามหาแนวทางการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาพันธุ์พืชกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการค้นหา ยีน การศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนหรือกลุ่มยีน และการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียด โดยการนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้มาใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะเครียด ซึ่งนับว่าเป็นพืชทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหาอันเกิดจากภาวะโลกร้อน อีกทั้งยังเป็นการช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกทางหนึ่งด้วย

N-acetylglutamate synthase (NAGS) เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์สารออร์นิติน (ornithine) อาร์จินิน (arginine) และโพรลีน (proline) พบได้ทั้งในเซลล์โพรคาริโอต (prokaryotes) และยูคาริโอต (eukaryotes) โดยเป็นเอนไซม์ที่ช่วยกระตุ้นในปฏิกิริยาการผลิตสาร *N-acetylglutamate (NAG)* จาก *glutamate* และ *acetyl-CoA* (Meijer *et al.*, 1985) ซึ่ง ornithine และ arginine เป็นสารที่มีความสำคัญในวัฏจักรยูเรีย (urea cycle) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดแอมโมเนีย (McCudden and Powers-Lee, 1996; Caldovic *et al.*, 2004) และพบว่าเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดจะทำให้มีปริมาณแอมโมเนียในเซลล์สูง จึงจำเป็นต้องมีการกำจัดแอมโมเนีย โดยการสังเคราะห์ arginine ให้เป็นยูเรีย และขับออกนอกเซลล์ ในส่วนของ proline เป็นกรดอะมิโนที่ได้จากวัฏจักรการสังเคราะห์ proline โดยมี ornithine เป็นสารตั้งต้น ซึ่ง proline เป็นสารประกอบไนโตรเจนทำหน้าที่เป็นสารออสโมไลต์ช่วยป้องกันการเสียหายของโปรตีน และโครงสร้างของเซลล์ (Slocum, 2005) L-arginine มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโต และการงอกของเมล็ด รวมทั้งการขนส่งสารอาหารผ่านท่อลำเลียงต่างๆ ซึ่งสารชนิดนี้จะพบมากในพืชที่อยู่ในสภาวะเครียด โดย ornithine และ citrulline ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์ arginine สำหรับในพืช ornithine เป็นสารที่มีความจำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์ polyamines และ alkaloids (Shargool *et al.*, 1988) ส่วน citrulline เป็นหนึ่งในกรดอะมิโนอิสระที่มีความสำคัญ พบสะสมในใบของแตงโมที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำ กรดอะมิโนชนิดนี้จะช่วยให้พืชสามารถทนต่อสภาวะเครียดเนื่องจากการขาดน้ำอย่างรุนแรงได้ (Akashi *et al.*, 2001; Yokota *et al.*, 2002) ในปัจจุบันเราสามารถทราบลำดับเบส expressed sequence tags (ESTs) ของ NAGS จากพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว ถั่วเหลือง และมะเขือเทศ (Slocum, 2005) สำหรับยีน *SINAGS1* ที่แยกได้จากมะเขือเทศ (tomato) นับเป็นยีนที่แยกได้จากพืชเป็นครั้งแรก และทำการถ่ายฝากยีน *NAGS* ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน open reading frame (ORF) เข้าสู่ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในการนำยีน *SINAGS1* เข้าสู่เซลล์พืช ส่งผลทำให้พืชที่ได้รับการถ่ายฝากยีนนี้มีความสามารถทนต่อสภาวะเครียด เช่น สภาวะความเค็มสูง และสภาวะขาดน้ำได้ดี โดยพบว่ายีน *SINAGS1* มีการแสดงออกในระดับสูงในอวัยวะส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน ส่วนในเมล็ดมีการแสดงออกในระดับปกติ แต่ไม่พบในส่วนของราก นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนในผลมะเขือเทศระยะที่ผลมีสีแดง และในสภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำพบว่ามีการแสดงออกของยีน *SINAGS1* เพิ่มขึ้นในระยะที่ผลของมะเขือเทศมีสีเขียวและเจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ช่วงแรกที่มะเขือเทศอยู่ในสภาวะดังกล่าว สำหรับพืชที่ได้รับการถ่ายฝากยีน *SINAGS1* จะพบการสะสมของ ornithine ระดับสูงในส่วนของใบ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชป่า (WT) และการทดสอบความสามารถในการงอกของเมล็ดเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 250 mM พบว่า

ความสามารถในการงอกของเมล็ดสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับพืชป่า โดยพืชที่เจริญเติบโตเต็มที่จะสามารถทนต่อสภาวะเครียด (สภาวะดินเค็มสูง และสภาวะขาดน้ำ) ได้ดีกว่าพืชป่า (Kalamaki *et al.*, 2009)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการโคลนยีน และศึกษาการแสดงออกของยีนเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำ หากสามารถโคลนยีน NAGS ได้ และยีนที่ได้มีการแสดงออกในลักษณะทนทานต่อสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ จะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจเพื่อให้ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการปลูกมะเขือเทศ จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เซอรี, พันธุ์ท้อ และพันธุ์สีดา (บริษัทเจียไต๋) โดยนำเมล็ดพันธุ์มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำทุกวัน เมื่ออายุประมาณ 30 วัน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนทั้งจีโนม และเมื่อมะเขือเทศอายุประมาณ 45 วัน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *N-acetylglutamate synthase*

ทำการศึกษาและค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในมะเขือเทศ ได้แก่ ยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserved region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนคือ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนคือ CNAGS (forward) CNAGS (reverse) NAGSBamHI (forward) และ NAGSKpnI (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อกันของยีน *S/NAGS* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) (ตารางที่ 1)

3. การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างมะเขือเทศที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เซอรี ท้อ และสีดา เมื่ออายุได้ 1 เดือน นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตัดใบอ่อนของอ้อยประมาณ 50–100 กรัม บดในโถงพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP1 buffer หรือ GPX1 buffer 400 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที เติม GP2 buffer 100 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 นาที วาง Filter column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน Filter column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ทิ้ง Filter column และย้ายน้ำใสลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP3 buffer 750 ไมโครลิตร (1.5 เท่าของสารละลาย DNA ที่ได้) เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 5 วินาที วาง GD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000

รอบ/นาที นาน 2 นาที ที่ตั้งน้ำใสใน Collection tube และเก็บ GD column ไว้ (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 2 นาที ที่ตั้งน้ำใสใน Collection tube เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง เติม Wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 3 นาที เพื่อให้ Column แห้ง) ย้าย GD column ที่แห้งแล้วลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Preheat Elution buffer 100 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ Column matrix ที่ตั้งไว้ นาน 3 – 5 นาที จนกระทั่ง Elution buffer ถูกดูดซับโดย matrix ได้มากที่สุด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ เก็บสารละลาย DNA (original) ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปวัดค่าความเข้มข้น (Optical Density : OD) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอของมะเขือเทศที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *NAGS* ที่ออกแบบไว้จำนวน 1 คู่ ได้แก่ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ LongRange PCR Using Q-Solution (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมอเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 1X LongRange PCR Enzyme Mix with Mg^{2+} , 2U LongRange PCR Enzyme Mix, dNTP mix (500 μM of each dNTP), 1X Q-Solution, 0.4 μM Gene Specific Primer (forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (reverse) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 93°C 3 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 93°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 8 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 7 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การโคลนยีน *NAGS* เข้าสู่เวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติม EB Buffer (อุณหภูมิ 50 - 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 - 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified long PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR®-XL-TOPO® vector 1 ไมโครลิตร ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 25°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 6X TOPO Cloning Stop Solution 1 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปปั่นเป็นเวลา 3 - 5 วินาที นำไปวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้ One Shot® TOP10 chemically competent cells นำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat - shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไป spread บนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH₂O) เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มี insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12-16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้งละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 - 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 - 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 - 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน NAGS โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApaI* และ *KpnI* ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 - 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไป

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *NAGS* มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3' และ M13 (reverse) 5' –GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3' ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye[™] 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมลไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH₂O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยา ดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extension 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Solution A (ddH₂O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใสหลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

4. การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างมะเขือเทศที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เซอร์รี่ ท้อ และสีดา เมื่ออายุได้ 45 วัน งดให้น้ำ นำมาสกัด อาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure[™] Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของข้าวโพดประมาณ 5 มิลลิกรัม บดในโถงพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 – 5 นาที เติมน้ำ MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ย้ายส่วนใสในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 – 30 นาที เติมน้ำ MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง

Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปตละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติม Script Guard RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้อาร์เอ็นเอถูกย่อย วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80 °C จนกว่าจะใช้งาน

4.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT-PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ โดยใช้ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One-Step RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน NAGS คือ CNAGS (forward) และ CNAGS (reverse) ในปริมาณของปฏิกิริยาพอลิเมอเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย total RNA 10 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม, 10 μ M Gene Specific Primer (forward), 10 μ M Gene Specific Primer (reverse), 2X Reaction Mix, 2U SuperScript™ III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 55 °C 30 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 °C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94 °C 15 วินาที, Anneal 60 °C 30 วินาที, Extend 68 °C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 68 °C 5 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 °C และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

4.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีน NAGS เข้ากับเวกเตอร์ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

4.3.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน NAGS เข้ากับเวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุณหภูมิ 50 – 60 °C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) ในปริมาณของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR®2.1 vector 2 ไมโครลิตร, 5X ExpressLink™ T4 DNA Ligase Buffer 2 ไมโครลิตร, ExpressLink™ T4 DNA Ligase 1

ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH₂O) เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

4.3.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน NAGS ในเวกเตอร์

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นส่วนของยีนสอดแทรกอยู่ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อ นาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อ นาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน NAGS โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *NotI* ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน NAGS มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3' และ M13 (reverse) 5' –GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3' ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมลไพรเมอร์ Forward /

Reverse และ ddH₂O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extension 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH₂O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง นาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

5. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS*

5.1 การสร้างชุด cassette ยีน

5.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน *SINAGS* จากพลาสมิดดีเอ็นเอของข้าวโพด โดยวิธี PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *SINAGS* ไปเพิ่มปริมาณส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนคือ NAGSBamHI (forward) และ NAGSKpnl (reverse) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการเชื่อมต่อขึ้นยีน โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมอเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μ M Gene Specific Primer (forward), 0.4 μ M Gene Specific Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดขึ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

5.1.2 การเชื่อมต่อขึ้นยีน *SINAGS* เข้ากับ Plant Expression Vector

นำพลาสมิด pCAMBIA2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) ซึ่งมีขนาด 9,648 คู่เบส มาใช้เป็น Plant Expression Vector มียีน nptII (kanamycin) เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก และขึ้นดีเอ็นเอของยีน *SINAGS* ขนาด 1,812 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I โดยในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของยีน *SINAGS*/พลาสมิดดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ความเข้มข้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม, 1X FastDigest Buffer, 1U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำมาแยกด้วย 0.8% low

melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators และแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 3.3.1) จะได้ชิ้นพลาสมิด pCAMBIA2300 และชิ้นยีน SINA3/SINAT3 โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจำจาดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *Kpn*I นำชิ้นยีน SINA3S เชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) เพื่อสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของยีน SINA3S 200 นาโนกรัม, pCAMBIA2300 400 นาโนกรัม, 1X Ligation Buffer, T4 DNA ligase, ปรับปริมาณด้วยน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH₂O) เติมน้ำสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

5.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3S ใน Plant Expression Vector

5.2.1 การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3S ด้วยเทคนิค PCR

คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) (ข้อ 3.3.2) นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) (ตารางที่ 1) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, 2U HotStart Taq Master Mix, 0.5 μ M Primer (forward), 0.5 μ M Primer (reverse) ปรับปริมาณให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 95°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 72°C 3 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

5.2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3S ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3S ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร, 1X FastDigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme, ปรับปริมาณให้ครบด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 80°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA)

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

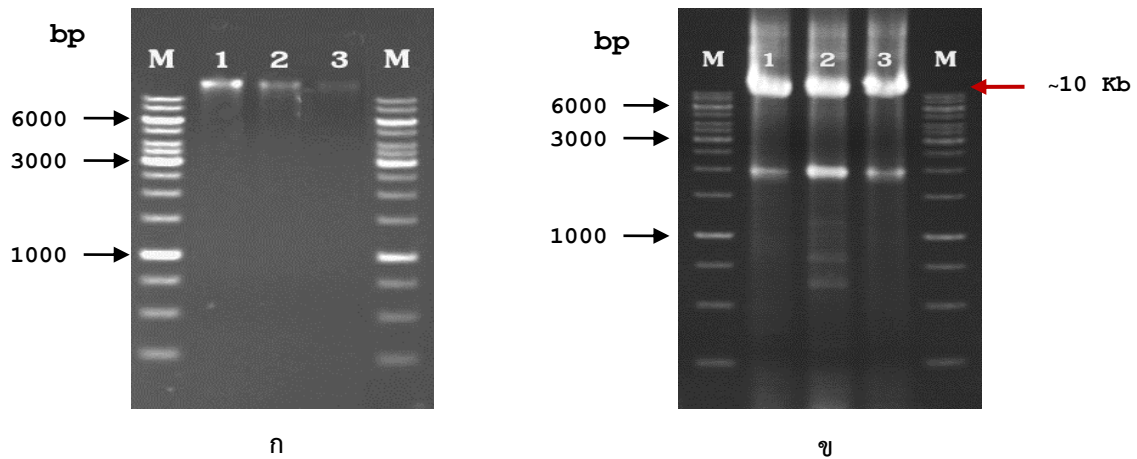
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์

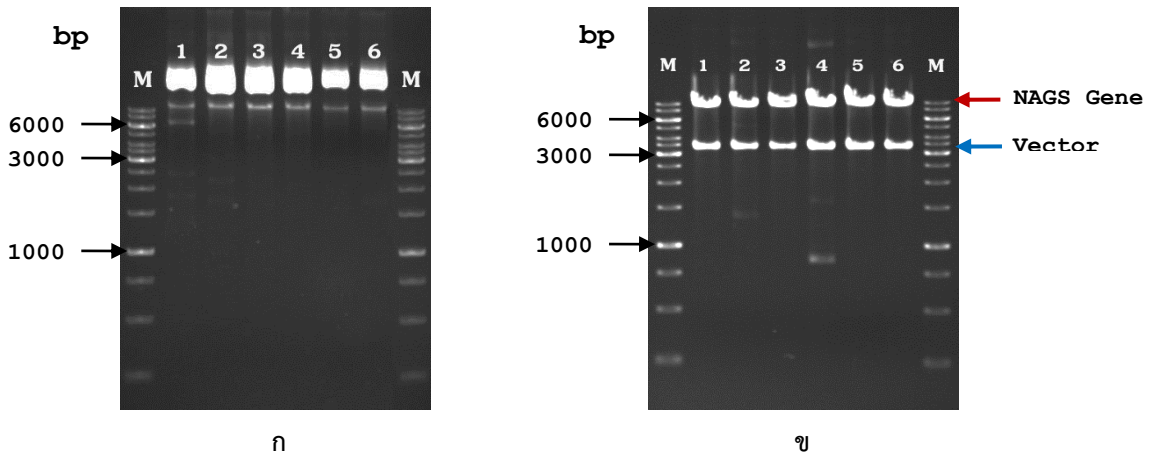
จากการโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์บริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NAGS* ได้จำนวน 1 คู่ คือ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) (ตารางที่ 1) โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ (ภาพที่ 1ก) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10 กิโลเบส (ภาพที่ 1ข) นำดีเอ็นเอของยีน *NAGS* ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ TOPO[®] XL PCR Cloning Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot[®] TOP10 chemically competent cells คัดเลือกโคลนที่คาดว่ามียีน *NAGS* นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ จำนวน 6 โคลน (ภาพที่ 2ก) และตรวจสอบโคลนที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apal* และ *KpnI* พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *NAGS* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ คือ ขนาดประมาณ 3.5 กิโลเบส (vector) และขนาดประมาณ 10 กิโลเบส (ยีน) (ภาพที่ 2ข) นำพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่มียีน *NAGS* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน *NAGS* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 9,345 คู่เบส (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1. แสดงลำดับเบส, Melting temperature (T_m) และ % GC content ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR และ RT-PCR กับยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)*

Primer name	Base sequence (5' → 3')	Size (bp)	T _m (°C)	GC content (%)
GNAGS_F	GTC GAC AGT TAA CCA GTG GCA CTA CCG GTT CAT G	34	65.3 (60)	52.9
GNAGS_R	CTA TGG AGC ACA AGA AGG AAC CTT AGC TCC AGC	33	64.0 (60)	51.5
CNAGS_F	ATG TCA GCT TCA CCG GCA ACG CCT TGT GCT CC	32	73.6 (60)	59.4
CNAGS_R	TTA TGA AAA GGG GTT GTC AAA GCG TAT ACC	30	64.6 (60)	40.0
NAGSBamHI_F	CAC GGA TCC ATG TCA GCT TCA CCG GCA ACG CCT TGT GC	38	71.1 (60)	60.5
NAGSKpnI_R	CAC GGT ACC TTA TGA AAA GGG GTT GTC AAA GCG TAT ACC	39	64.3 (60)	46.2
35sPromotor_F	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30	63.9 (60)	53.3
NOS_R	GCC AAA TGT TTG AAC GAT CGG GGA AAT TCG	30	61.9 (60)	46.7



- ภาพที่ 1 ก. แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมะเขือเทศ, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = มะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 2 = มะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = มะเขือเทศพันธุ์สีดา
- ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ที่เพิ่มปริมาณได้จากมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ด้วยเทคนิค PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = มะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 2 = มะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = มะเขือเทศพันธุ์สีดา



- ภาพที่ 2 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามียีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 3-4 = พลาสมิดดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา
- ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Apa*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 3-4 = รูปแบบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 5-6 = รูปแบบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา

```

1   gtcgacagtt  aaccagtggc  actaccgggt  catgtccatt  cccgttgccg  gcgaacattt
61  cttattcaaa  attctccgat  tccgactccg  actctgactt  cagcaactcc  cTATAtt
121 ccaatgtcag  cttcaccggc  aacgccttgt  gctccagtta  ttaaacaatg  taagctacca
181 attttcgctc  gcagcgatgt  ttggacaact  ccagttgaaa  atagttcca  agggaggcga
241 aagttgttat  cattaagggt  taatTTTTcg  aagagattgt  caattagggtg  cgggtgttat
301 ggggaaacgg  aaagtgcagc  tggTTTTtcc  gacgtgagca  gtgcaataaa  agatgactta
361 ttcattgggt  TTTTtcgaga  agcttggcct  tTTTTcttg  cgcatagagg  aagcactttt
421 gttgttttaa  tctcagctga  aattgttgat  agtcctcatt  tggatcatct  tcttatggca
481 tgttcctatt  ttaactttgt  cttccagtta  tctcgtttgg  ccatacattt  tgaagctaaa
541 acttgaaaat  atgagtttgc  gaagttgtga  ttttgggaac  ttcaagtttt  gtttggacat
601 ggattttaat  tgaattgttt  tgtcaagttt  cgcgattgaa  agtgaaattd  cttcaaaac
661 ggcgagtttt  tggaaacttg  taaatgttcg  aagatcagat  ttcattggcca  aatagatatt
721 tgaagataaa  ttttcagaaa  ctactggcaa  gatctatggc  caaacgtag  ctcaatgtgt
781 ttgttttctt  tttccttttc  tagtagtgac  attccaagtt  tggatttttt  taaataagat
841 ttggttggag  attttgtaac  tctgctgttt  aatgtgtgat  ttagggaagt  tataaattdt
901 aagagaactt  taactgataa  aaaattdtaag  aagattcacg  tagttgaact  gggttagtdt
961 gggattgagt  agtgattgat  tgatttdttgg  taattgtaag  ttcattagtt  tgttgattta
1021 tcccacttdt  agtaatgcat  gacggttdtgt  tttacgcaca  aacttdtcag  gatactcgc
1081 tccttcatgg  cctgggaatc  aagtdttgtt  ttgtaccgg  aactcatgtc  caaattgata
1141 ggtttctggc  tgaaagaggt  cagcaaaatg  ttgttgttdt  ctttcttgt  tcagtdtgat
1201 agtgctagtt  tctagcagct  cgtgtgttdt  cttcactatt  tctgatgctg  atagcaata
1261 attgttattd  tcttaattdt  attattdctg  atgatagaca  aaaaattdca  gcttaggctc
1321 cacttaaat  aggtcaatat  ttaccaggag  tcttcgtact  tagtgaaaga  cttgatgtc
1381 catgttdctt  gagattdagt  taacctctt  ttttagagaa  ctcgtaatat  aattdtaaaa
1441 aactctgga  gtacttagta  ttggaacgaa  atggagctga  atgtgaattd  agttgattcg
1501 tatagctgg  gttggctagt  ttgtgattga  tacagagtta  atcaattaat  agttatatca
1561 gacggagtdt  tgatgacttd  tgtcttagct  aaaatattaa  tttcctcgt  cttgatgtdt
1621 tcatcgtcta  gaaagtgtcc  ctgctgtgg  acatgcatca  tcctattaga  ttaacagaaa
1681 caatctaagc  atgttdtact  gacaaactct  gaagatatta  agctaataaa  gactcagtaa
1741 agtctaaaag  gtattctgcc  tctaatttdc  ctcgacaatt  gcttgggtct  gctctaaaca
1801 gtgaaaactt  caggttaaa  cttgatcaac  ttgctaata  tgagctggag  ctcataacct
1861 agtaaatagt  ttagatgcaa  gatccttdt  cctattatat  tgattgtaat  gcatttcaa
1921 aaattgctaa  aattaacatg  gagaaacca  aagcttcggc  atccattdt  attcatagaa
1981 agaggaatca  atagcattaa  tggcttgatg  attatgcatt  ttagaataac  caaatttdt
2041 atggaaagga  gtttaacagt  ctttactatt  caaactcctg  gatttdtcc  ttttaatta
2101 gcaccattat  attattdt  tttctctaaa  ctacaacttd  atctctatct  taagaagaat
2161 attctcagaa  gcaagtgtat  tgaaactct  tcttacagga  agtgagcca  agtatgtagg
2221 ccgctacaga  gtaacagacc  ctgattcact  gatggctgca  atggatgcag  ctggaagaat
2281 tctcttatg  atagaggcaa  agttgtctcc  ggggccatca  ttgactggtg  tccgccggca
2341 tggagaaaat  agtcgctggc  atgatggtgt  tagtgttgct  agcggtaatt  ttctagcaat
2401 gaaggtgaga  atataatgtc  attgcacaat  gtaaataata  tgaataatat  ttcattcttd
2461 taaggttdt  aattdttdt  atcaaatgtc  atttcaatga  caatgaggt  gacttgggat
2521 tttcattata  aattdcggca  gagaagagga  gttgtagaag  gaactgatta  tgcagcgact
2581 ggtgaagtaa  agaagataga  cgttdtctgc  attcgtgaga  gacttgatcg  ggatagcatt
2641 gtgttattaa  gcaatcttdg  atattccagc  tctggagaag  tttgaaactg  caagtatgct
2701 ttatggttdt  tgataggtat  cttgttdt  gttgagcatc  attagtcctg  catcttdt
2761 taagaaaatc  gtcaaaatca  gcgagcaaac  agaattdcag  gaagctatat  actagagtat
2821 agtgatacat  aagacttdc  ctttagtagt  atcaattdt  cgttdtacc  ctctgttdt
2881 ataaaactgg  taagcttdt  ttatcaagtt  tcttdt  tatgggacat  tctcttdt
2941 ttcttcaact  gcttgacagg  cattaagtgc  tcttdt  ttcttdt  cctgcttdt
3001 cttcttcatc  ttdttdt  ttgtgaaaac  tctgtcactt  ggaagattgc  aatacttaa

```

ภาพที่ 3. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในมะเขือเทศ

3061	tctcagtgat	aggatcaaaa	ctcataagct	aatcaaaaag	gaagtcttct	agtgaattc
3121	ttaaaacgaa	aaaaggggaa	ataactaaca	agaatgtgat	ttatgcctag	ggtgcatgtc
3181	aactattatc	agaagtgtaa	aattaattat	tgtaaaagaa	atatttcttc	aggttgatct
3241	catttttggtc	acacttttgg	gtttatgttt	acttgattga	ataggttaca	ctcaatttgg
3301	gtggtttctt	atggtaacat	tacctatcaa	ttattgtctt	cacgattcat	gtagttttag
3361	atataattca	gacactatca	acacggtgat	aaggaagtac	actaacattc	tctgctcttc
3421	tttcattaca	agatagtact	aataaaaaaa	tattgtgctc	gtgcagacac	acacacatat
3481	ttgacattat	gactcccatc	tattgggggc	gatatagatg	gacttgtgga	gttgaagtta
3541	gcttaacatc	gaactttgaa	catatctcta	tccctcacca	tgagtagaag	ccaataattt
3601	catgatttta	tgtgtgtcag	tgccctctgc	gggaatgcta	tttttttaat	atcaatctgc
3661	ttttcttggg	aacttagctt	gttttaatca	gtggtcatgt	gtttgcagat	attacttcat
3721	ttcttaatgt	gtactagttt	ttcatgtttt	tacaaaacta	tttctagagg	ctctagagga
3781	aaaagtcttt	ctacttacia	aaggtagggt	aaggctgcgt	aacaaaacc	tccccagacc
3841	ccacttgtag	gattacactg	gttatgtttg	tgtacaaaac	tatatcta	taactgggct
3901	agatgttcag	tacaccacat	ttttctgaaa	ctaccattgt	aagtcagctt	tttgtgaata
3961	tgtttaagtg	tgtcacagcc	ctcgatgtga	atgcttatct	tttaaatcaa	tctactatct
4021	tgggaactca	acttgtatta	cacagtcgtc	atctgttcat	gateccatgt	tgacttatgt
4081	tagaatagga	ataagtattt	cttactta	atagggatta	gaataggaac	aagaatagga
4141	attctagttg	gaaaagggtt	ccaatgtagt	gtctataaat	agggtcttca	tgtaacaata
4201	gatacgcaat	tcaaaagtat	tttctccaat	atcttctcaca	agttatgttg	agttaattca
4261	ttttacaatt	cctaattgtg	aacatgtttt	actttttcct	ataagcattt	tccgattgat
4321	taagctatag	atgctcagca	cacgacattc	ccgactcttc	aatcatgagt	cggtgtttcg
4381	tggatatggt	ttttctttcc	gtctttat	tgcttggagt	ttaagattga	tagtgtgttt
4441	tattttattg	aagcacatat	gaagttgcta	cagcttgtgc	cttggctcta	ggagcagaga
4501	aactgatttg	tattatagat	ggtccaattc	tggatgagtc	tggccgtctt	attcgtttct
4561	tgactcttca	agatgctgac	atgctggttc	gcaaacgagc	agaacaaagt	gaggcagcag
4621	ctaattatgt	aaaagctgtc	agtcaagagg	acttcaattg	tttaggtcac	aatggttcta
4681	atggatcaat	ctcttcctac	aatatgaatg	ggtttagcca	aaaatacagt	gtttttcaga
4741	atgggtgttg	ttttgacaat	gggaatgggc	tttggctag	tgagcagggg	tttgccattg
4801	gaggacaaga	gagggttaagt	cgactaaatg	gttatctttc	agagttagct	gcagctgctt
4861	tcgtgtgcag	agtaagatcc	tggctgtcta	atcactatat	ctgcagattt	ttcgaagtgt
4921	ccaaactaga	gaataattgt	ctatgttatt	taccgaacc	ctaaacatac	aacagaaaat
4981	tgcatgtttt	ctaaacttga	ccgttgatgg	ctaaaggggt	agaatttggg	agttgtcact
5041	ctttgctggt	aaaacttctt	ttataatagc	ttgtgcatta	gagatatgta	tatttacaga
5101	atagtaacta	gtttcatggt	ctcactacat	attatggcta	tatatgggtt	gctgtgtcta
5161	gtaactatca	acttttacag	tgatctatca	tctgatcaaa	ttttcatgtc	tctactaaat
5221	tgactcctca	tttatcaata	tgatatctct	attggcttat	tggttaaaaa	ttttgccaat
5281	tctgtactcc	atttgccatc	agggaggtgt	tcaacgagtt	cacctgctgg	atggtactat
5341	tgggtggagtt	ttactaaagg	aattgttcca	aagagatgga	gttgggacaa	tggtagctag
5401	gtatgcaaat	cttgatgaaa	tattgcttgt	aatttagtca	agacatgttg	atattcattt
5461	ctccacattt	acatcatttc	ctctttaagt	tgatcaatga	tattcacttt	tccttgtggt
5521	tttgaaccgt	caaatccatg	gtacaaatag	ttcactgtca	aagcaagtca	tgaatgagac
5581	gacaaaaata	taatctacaa	ttaacgagct	cagttgggta	agagtaacaa	actgggctaa
5641	tgtgagccac	ctttcaccat	tatgattaaa	acaccaccaa	tgtggagaag	aacagctgaa
5701	attactgtgc	tattatttca	ttccaaattt	gacattttgt	ttctttgtgg	agaaatccat
5761	ggcgcaactt	acaagattca	atcccctagg	acacaatttg	gtatatgact	aattgaagta
5821	atatccagaa	tttcctaaga	tgttaaacga	gctacttaca	ttgccaaaat	aaacttagct
5881	ttactttttac	aatattgata	tatagaactc	cctgagcagt	gagaatctac	atgtctctgg
5941	ttgtctgatc	gtctccctat	atgacattat	gtttctcacc	acaaaagttc	atggtttcgc
6001	ggtctctagg	attaacagtt	gtactctcag	tcgtataatt	acgttaggac	atggctaatt
6061	gatattttgct	atctttttta	tgactatctt	tcgactaaga	tgtgcatgaa	tctctttttc
6121	tcagtgatct	ttatgaagga	acacgaatgg	ctcggctgtc	agatattccc	gagatcaaac
6181	aattattaca	acctctagaa	gagctctggaa	cattgatcag	aaggagcag	gaagaggtta

ภาพที่ 3. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในมะเขือเทศ (ต่อ)

6241	atcttgatgc	tttttattat	ggaaaaatac	ttgctaaatc	agcttctatt	tggttaatgt
6301	ttgtatcact	tttctttttt	cataattatg	tgttttttac	ttattctagc	ttgtggaggc
6361	actgcattca	ttcattgttg	tggagagaga	aggccatggt	atagcttggt	ctgctctctt
6421	tccttacttt	gaagaaaaat	gtggagaggt	tgctgctatt	gccgtttctc	ctgattgtcg
6481	tggccaagga	caaggagaca	aattactagg	taactctttc	tcatagtaaa	actaattact
6541	tcttcgatta	taatgcatgt	aagcagtttc	aggatgttgt	gattatttgc	atttgcgga
6601	tgaagttgca	aacacgttaa	caaaggaaca	accttagggt	taaaatattt	cgtaaagcct
6661	ttaatcactt	ggattagcaa	acagtgcaaa	gcataaaata	aagacatgat	gaatctactt
6721	accatgaatg	acatgttata	tatcagaaca	ttgtcacaaa	tgataaatag	ccaccaacat
6781	aagttgtaag	actaagttca	gtacctccag	taatacctta	agatttttta	ggaagctcaa
6841	gcattaaaaat	gagccaatta	tacatactgt	atatagcaat	ggaatgtgat	catttagtat
6901	ttccccatgt	gattatccat	tcctccaaac	tttcttgta	cgtgtggaag	aaatttttga
6961	aagcaaacac	ttagatataa	aagctcctca	actacaccct	tacgtgcttt	ccctctaaga
7021	tgtccctcaa	cttttggtt	tctctcatta	caacctctac	tctctcta	aatcagacac
7081	agtctagcct	ttttccgttc	tatgaaaatc	catagttcga	aatcaactca	ccgaaatcat
7141	tgacatttgt	tgaatttctt	gaggttat	tctagaatgg	aattgatgtg	aagagtaagg
7201	gatgataaaa	gctaacaggc	taaaatcaac	gaaataaatg	agaaagcaca	aatgaaatat
7261	tggatcaata	ttaagaacat	tttactgcaa	actagcacta	gattgttctc	aaccagaatc
7321	caattttttg	cccaccaatg	gattttgtct	agccataaaa	tcaaagaaaa	ttctttctcc
7381	tgtttttttc	cccctaatat	tcttctgaa	tataaacaat	aacaacaatg	aaaacaaccg
7441	tcgttttttac	tttttattaa	taaacaagaa	ctaagacata	aaggtttata	ggaataagtc
7501	caagccaaag	ctgtgat	agatcattgt	ttttttttt	ttttgaggaa	gtaacttgta
7561	ttaccaatag	aggagtactc	cagaagtagt	ccagtaatac	ttgcaaaaca	aagatcacag
7621	atttggaaata	cctttaaacc	agaacttgac	aattagatgt	tacttgggta	gcaaatgcaa
7681	cttattgact	cgtattttgt	aacaatgttc	tcttcaactt	gtttgtaaaa	attcccaagc
7741	tccaaacgag	gtattccttg	aacgccttgg	tcttgacacg	agttaacggg	ccactaaaca
7801	tctcagaatt	gtacacaata	ggctgcttag	tgtctgtcta	tccaggatcg	tatcaactta
7861	tttctcatag	ttatgctttg	ttggctttac	actttattaa	agaatgttgt	gtccttaaaa
7921	gttgagacaa	attgttatgt	gtttacttct	tttctatcta	cctaaacaca	gttgggtctc
7981	ttgaacattt	tggtctgatc	aaaattctgc	acttattatt	gcaatagcca	ataactttct
8041	attccaaaaa	tgaattgtag	attacatcga	gaagaaggca	tcatcccttg	gattgcaa
8101	gttgtttctg	cttacaactc	gcacagctga	ttggtagcgt	ctttccactt	tctgtctccc
8161	tggctaataat	atacattggt	cttccaattg	gcaaacgaac	attgattgcc	aaactaaagt
8221	gcaatggaca	atggcagatt	actgagtgtc	atataattta	ttgcaatatt	tatactgaat
8281	ttgagaatac	aagtccttta	gtcatttcaa	cggggagata	aagctaagat	gctatgtcaa
8341	ggtacagaga	atcataaagg	aaaagaagaa	aagagttcct	cttgattatt	attactactt
8401	gtttttttggg	tatgcatggt	gcacgtgtaa	ttcatatcaa	tgagtataaa	attttaaaaa
8461	tagcataaat	atttaaaact	gcgtttgagt	tataaaatta	attcaaaagt	ataagctctt
8521	tgagaagatg	gatgttgatc	ctatttaact	aaccaataaa	aaaaagctgt	cccgtaaaag
8581	tattcagatg	ctttgttata	attttgacat	gttagttctg	catttgcttt	acagcacaga
8641	cagtagcaca	atgtgcttac	ttgtacatca	ttaa	atcatg	gattactttt
8701	gttaaaactca	aaatggagca	cta	atgaatc	taacattttc	tcttaagata
8761	gcaagagtat	tcagacacaa	gaaacctcat	aatcaagcat	ttttgtcata	gttgattca
8821	tataatgttc	aaagttgaga	ctggattttg	tccttgaaca	agaaaaatat	cattaacaga
8881	tggtttcttg	at	ttgatatt	catgtatgca	tttctctcct	gtgaggcgcg
8941	gtttttctga	atgttctatc	gaccgtatac	cagctcaaaa	aaggaaaaag	atcaatctct
9001	ctcgtaggtc	aaagtactac	atgaagaagc	tgctacctga	tagaagtggt	atagcctttg
					PolyA signal	
9061	acaaccctt	ttca taag aa	caaaaacggg	tttctgcgta	gtgtctctgc	aataaa gctt
9121	ggattaaatg	gttaatcctt	gttaatctgt	gtccattagg	tgtaatcata	gcaaagaatg
9181	tataaagcta	tgcacctgta	aaatctcagg	catggtacat	tgctctgctc	ataatgtagc
9241	ttatgcttga	tttggctgct	aacattcatc	tgtcttttac	cttttgggt	caaattttta
9301	gagtttaagaa	aagctggagc	taaggttctt	tcttgtgctc	catag	

ภาพที่ 3. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในมะเขือเทศ (ต่อ)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม Software GenScan บน อินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *N-acetylglutamate synthase* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 10 exons (ตารางที่ 2) และ พบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง TATA signal (TATAAA) อยู่ในส่วนของ 5'UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 112–117, ลำดับ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง PolyA signal (AATAAA) อยู่ในส่วนของ 3'UTR ระหว่าง ตำแหน่งของลำดับเบสที่ 9111–9116 (ภาพที่ 3)

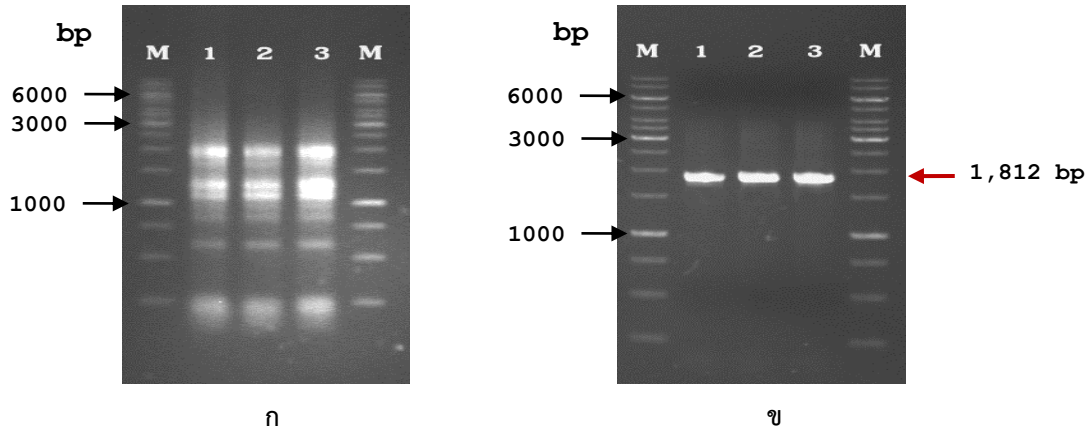
ตารางที่ 2. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก (exon) บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.genes.mit.edu/GENSCAN.html

ลำดับที่	ชนิดของยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ เริ่มต้น (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ สิ้นสุด (bp)	ความยาว exon (bp)
1.01	Initial exon (ATG to 5' splice site)	124	169	46
1.02	Internal exon (3' to 5' splice site)	1033	1158	126
1.03	Internal exon (3' to 5' splice site)	2199	2404	206
1.04	Internal exon (3' to 5' splice site)	2542	2693	152
1.05	Internal exon (3' to 5' splice site)	4454	4871	418
1.06	Internal exon (3' to 5' splice site)	5303	5400	98
1.07	Internal exon (3' to 5' splice site)	6125	6236	112
1.08	Internal exon (3' to 5' splice site)	6350	6509	160
1.09	Internal exon (3' to 5' splice site)	8061	8133	73
1.10	Terminal exon (3' to stop codon)	8927	9077	151
1.11	PolyA signal	9111	9116	6

2. การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ในส่วนที่มีการแสดงออก

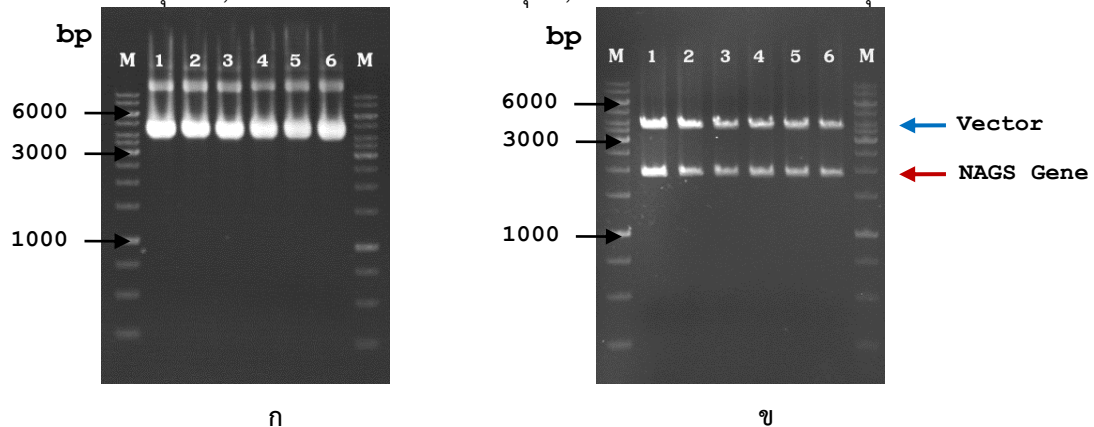
ทำการโคลนยีน NAGS ในส่วนที่มีการแสดงออก โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NAGS ทั้ง จีโนมที่วิเคราะห์ได้ มาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก ซึ่งได้เพิ่ม ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส คือ NAGSBamHI (forward) และ NAGSKpnI (reverse) (ตารางที่ 1) โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้มาทำ ปฏิกริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ (ภาพที่ 4ก) พบว่า สามารถทำปฏิกริยาได้แถบ ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส (ภาพที่ 4ข) นำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ T&A Cloning Vector และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5 α ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวนำมาสกัดพลาสมิดดี เอ็นเอ (ภาพที่ 5ก) และตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของยีน NAGS โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Not*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส เป็น ขนาดของเวกเตอร์ (Vector) และ 1.8 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน (NAGS Gene) ตามลำดับ (ภาพที่ 5ข) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับ พันธุกรรม ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน NAGS ลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,812 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) โดยใช้โปรแกรม

ExPASy Bioinformatics Resource Portal บนอินเทอร์เนต จำนวน 604 amino acid และอยู่ภายใน Open reading frame ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 1 – 1,812 (ภาพที่ 6) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับ ยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่ พบ ใน มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) (FJ543466.1) และ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (XM_006350559.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 4 ก. แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากมะเขือเทศ, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = มะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 2 = มะเขือเทศพันธุ์ห้อย, Lane 3 = มะเขือเทศพันธุ์สีดา

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่เพิ่มปริมาณได้จากมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ร่วมกับคูไพรเมอร์ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = มะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 2 = มะเขือเทศพันธุ์ห้อย, Lane 3 = มะเขือเทศพันธุ์สีดา



ภาพที่ 5 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดโคโลนีสีขาวที่มียีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิด ดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 3-4 = พลาสมิดดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์ห้อย, Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์สีดา

ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *KpnI* และ *NotI*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 3-4 = รูปแบบดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์ห้อย, Lane 5-6 = รูปแบบดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์สีดา

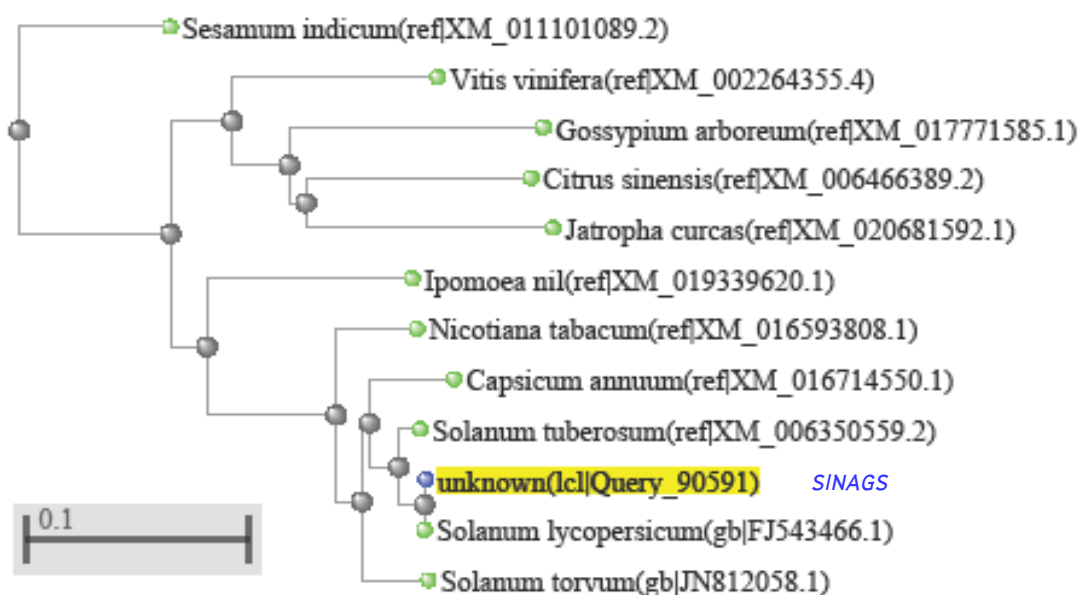
1 **atg**tcagcttcaccggcaacgccttgctccagttattaacaatgtaagctaccaatt
 M S A S P A T P C A P V I K Q C K L P I
 61 ttcgctcgcagcgaatggttggacaactccagttgaaaatagtttccaagggaggcgaag
 F A R S D V W T T P V E N S F Q G R R K
 121 ttgttatcattaagggtaatttttcgaagagattgtcaattaggtgagggttttatggg
 L L S L R V N F S K R L S I R C G V Y G
 181 gaaacggaaagtgcagctgggtttttccgacgtgagcagtgcaataaaagatgacttattc
 E T E S A A G F S D V S S A I K D D L F
 241 attgggttttttcgagaagccttgcccttattttctgcgcatagaggaagcacttttggt
 I G F F R E A W P Y F L A H R G S T F V
 301 gttttaatctcagctgaaattgttgatagtcctcatttggtatcatcttcttatggacatc
 V L I S A E I V D S P H L D H L L M D I
 361 tcgctccttcattggcctgggaatcaagtttgttctgtaccggaaactcatgtccaaatt
 S L L H G L G I K F V L V P G T H V Q I
 421 gatagtttctgctgaaagaggaagtggagcccaagtatgtaggccgctacagagtaaca
 D R F L A E R G S E P K Y V G R Y R V T
 481 gaccctgattcactgatggctgcaatggatgcagctggaagaattcgtcttatgatagag
 D P D S L M A A M D A A G R I R L M I E
 541 gcaaagttgtctccggggccatcattgactgggtgctccggcggcatggagaaaatagctgc
 A K L S P G P S L T G V R R H G E N S R
 601 tggcatgatgggtttagtggctgacggtaattttctagcaatgaagagaagaggagtt
 W H D G V S V A S G N F L A M K R R G V
 661 gtagaaggaactgattatgcagcactgggtgaagtaagaagatagacgtttctcgcatt
 V E G T D Y A A T G E V K K I D V S R I
 721 cgtgagagacttgatcaggatagcattgtgttattaagcaatcttgatattccagctct
 R E R L D Q D S I V L L S N L G Y S S S
 781 ggagaagttttgaaactgcaacacatatgaagttgctacagcttgtgccttggtcttagga
 G E V L N C N T Y E V A T A C A L A L G
 841 gcagagaaactgatttgatattatagatgggtccaattctggatgagctcggcgtcttatt
 A E K L I C I I D G P I L D E S G R L I
 901 cgtttctgactcttcaagatgctgacatgctgggttcgcaaacgagcagaacaaagtgag
 R F L T L Q D A D M L V R K R A E Q S E
 961 gcagcagctaattatgtaaaagctgtcagtcagagagacttcaattggttaggtcacaat
 A A A N Y V K A V S Q E D F N C L G H N
 1021 ggttctaatggatcaatctcttccataaatatgaaatgggttttagccaaaatacagtggt
 G S N G S I S S Y N M N G F S Q K Y S V
 1081 tttcagaatgggttgggttttgacaatgggaatgggcttttggtctagtgcagcaggtttt
 F Q N G V G F D N G N G L W S S E Q G F
 1141 gccattggaggacaagagaggttaagtcgactaaatgggttatctttcagagttagctgca
 A I G G Q E R L S R L N G Y L S E L A A
 1201 gctgctttcgtgtgcagaggggttcaacgagttcacctgctggatgggtactattgggt
 A A F V C R G V Q R V H L L D G T I G
 1261 ggagttttactaaaggaattgttccaaagagatggagttgggacaatggtagctagtgat
 G V L L K E L F Q R D G V G T M V A S D
 1321 ctttatgaaggaacacgaatggctcggctgtcagatattcccagatcaacaattatta
 L Y E G T R M A R L S D I P E I K Q L L
 1381 caacctctagaagagtctggaacattgatcagaaggagcagggaagagcttggaggcga
 Q P L E E S G T L I R R S E E E L V E A
 1441 ctgcattcattcattgttggagagagaaggccatggttatagcttggctgctctctt
 L H S F I V V E R E G H V I A C A A L F
 1501 ccttactttgaagaaaaatgtggagaggttgctgctattgccgtttctcctgatgtgctg
 P Y F E E K C G E V A A I A V S P D C R
 1561 ggccaaggacaaggagacaattactagattacatcgagaagaaggcatcatccctggga
 G Q G Q G D K L L D Y I E K K A S S L G
 1621 ttgcaaatgttgtttctgcttacaactcgcacagctgattgggttggtagggcgggtttt
 L Q M L F L L T T R T A D W F V R R G F
 1681 tctgaatgttctatcgaccgtataccagctcaaaaaaggaaaaagatcaatctctctcgt
 S E C S I D R I P A Q K R K K I N L S R
 1741 aggtcaagctactacatgaagaagctgctacctgatagaagtggtatagctttgacaac
 R S K Y Y M K K L L P D R S G I R F D N
 1801 cccttttca**taa**
 P F S *

ภาพที่ 6. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในส่วนที่มีการแสดงออก

ตารางที่ 3. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ที่โคลนได้จากมะเขือเทศพันธุ์สีดากับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ต โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
<i>Solanum lycopersicum</i> N-acetylglutamate synthase mRNA, complete cds	3263	3263	100%	0.0	99%	FJ543466.1
<i>Solanum tuberosum</i> probable amino-acid acetyltransferase NAGS1, chloroplastic (LOC102598178), transcript variant X2, mRNA	3092	3092	100%	0.0	98%	XM006350559.2
<i>Solanum torvum</i> N-acetylglutamate synthase (NAGS) mRNA, complete cds	2771	2771	100%	0.0	94%	JN812058.1
<i>Nicotiana tabacum</i> probable amino-acid acetyltransferase NAGS1, chloroplastic (LOC107774310), transcript variant X3, mRNA	2486	2486	94%	0.0	92%	XM016593808.1
<i>Nicotiana sylvestris</i> probable amino-acid acetyltransferase NAGS1, chloroplastic (LOC104246911), transcript variant X2, mRNA	2486	2486	94%	0.0	92%	XM009802820.1
<i>Capsicum annuum</i> probable amino-acid acetyltransferase NAGS1, chloroplastic (LOC107868013), transcript variant X1, mRNA	2360	2360	85%	0.0	94%	XM016714550.1

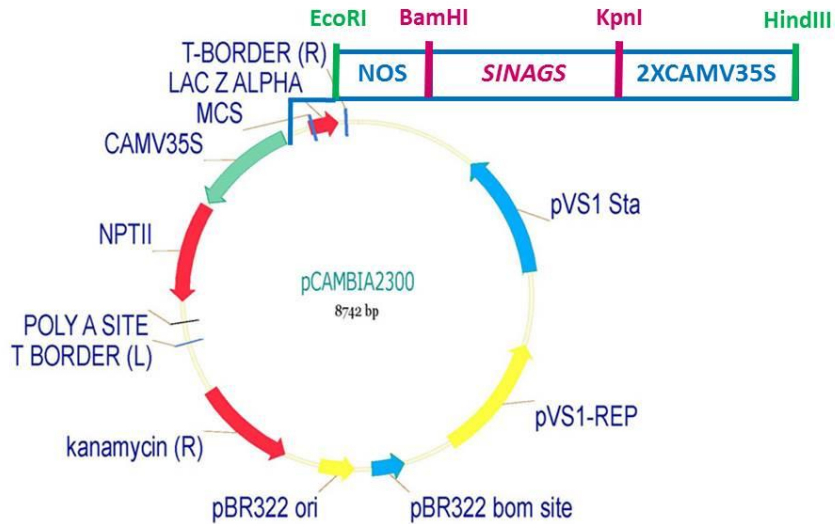
เมื่อนำข้อมูลยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) จากมะเขือเทศมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน NAGS ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi) พบว่า ยีน NAGS ที่สังเคราะห์ได้จากมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชกลุ่มไบเลียงคู่ ได้แก่ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) และ มะเขือพวง (*Solanum torvum* L.) มากกว่าพืชกลุ่มไบเลียงคู่ ได้แก่ งา (*Sesamum indicum* L.) และ องุ่น (*Vitis vinifera* L.) (ภาพที่ 7)



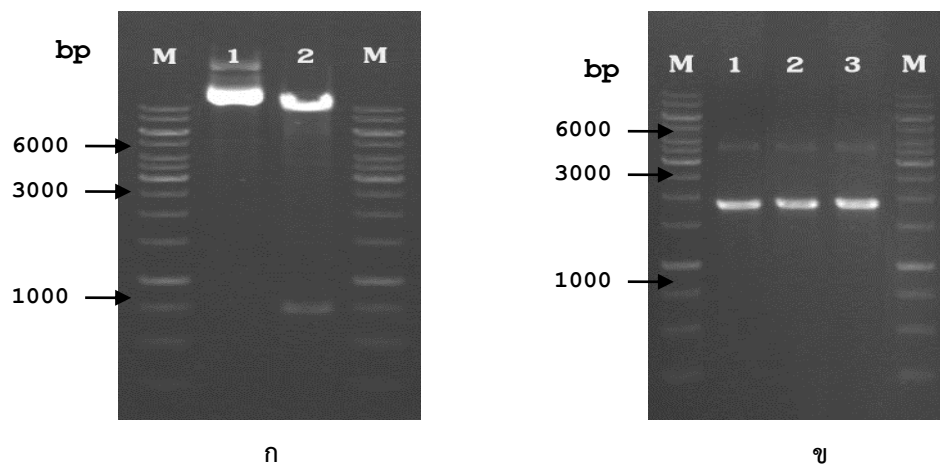
ภาพที่ 7. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่โคลนได้จากมะเขือเทศเปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

3. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS* ใน Plant Expression Vector

นำชิ้นยีน *SINAGS* ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 1,812 คู่เบส มาเชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) (ภาพที่ 8) ขนาดประมาณ 9,640 คู่เบส ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I (ภาพที่ 9ก และ 9ข) โดยที่ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน และมียีน NPTII (kanamycin) เป็นยีนคัดเลือก จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS* ซึ่งมีด้วยกัน 2 วิธี วิธีแรกคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน *SINAGS* ขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส (ภาพที่ 10ก) และวิธีที่สองคือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาด 1.8 และ 9.6 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 10ข) โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์สามารถเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINAGS* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300 – *SINAGS*) จะมีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส (ภาพที่ 11)

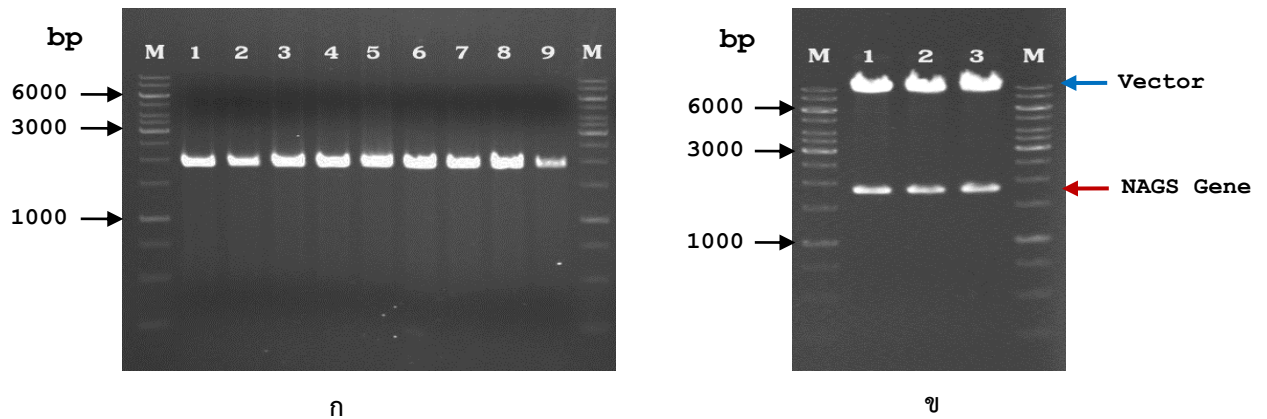


ภาพที่ 8. แผนที่ของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) และตำแหน่งในการเชื่อมต่อชิ้นยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)*

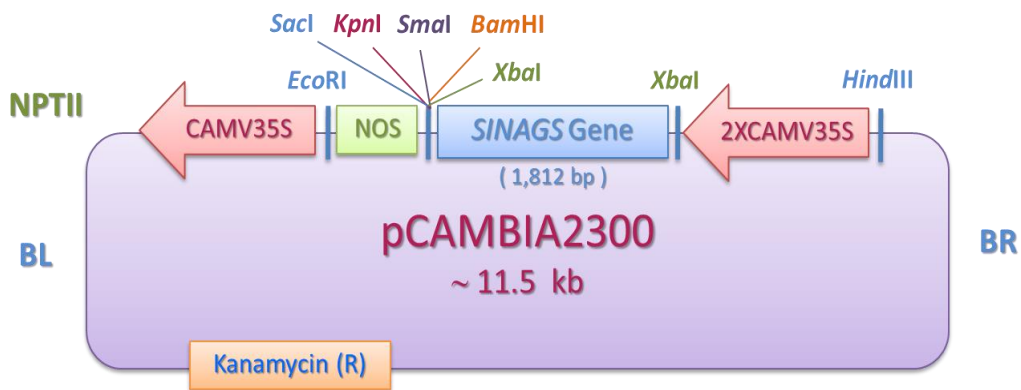


ภาพที่ 9 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300, Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *NAGS* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี่, Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา



- ภาพที่ 10 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับโคลนที่คาดว่ามียาสยผสม pCAMBIA2300 – *SINAGS* โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-3 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เชอร์รี่, Lane 4-6 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 7-9 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา
- ข. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดยาสยผสม pCAMBIA2300 – *SINAGS* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = รูปแบบแถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เชอร์รี่, Lane 2 = รูปแบบแถบ ดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = รูปแบบแถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา



ภาพที่ 11. แสดงโครงสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *SINAGS*

สรุปผลการวิจัย

การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ในส่วนของยีนทั้งจีโนมจากจีโนมมิกดีเอ็นเอของมะเขือเทศ จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ เซอร์รี่ ท้อ และสีดา พบว่า ยีนที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 9,345 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *SINAGS* มีส่วน ประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 10 exons

การโคลนยีน *NAGS* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำข้อมูลยีนที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกทางปลาย 5' และ 3' พบว่า ยีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,812 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน (ORF) ของยีน *NAGS* จำนวน 604 amino acid เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่พบในมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) (FJ543466.1) และ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (XM_006350559.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ

การสร้างพลาสมิดสายผสม โดยการเชื่อมต่อยีน *SINAGS* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300-*SINAGS* มีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส ตรวจสอบผลการปรากฏของยีน *SINAGS* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิค PCR พบว่า สามารถสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีความสมบูรณ์ ได้จำนวน 9 โคลน ซึ่งยีนชุดยีน pCAMBIA2300 - *SINAGS* ที่โคลนได้สามารถนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้

การทดลองที่ 2.2

การโคลน ถ่ายฝากและศึกษา ยีน *GmPR1* เพื่อความต้านทานโรคในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* สำหรับเตรียมการถ่ายฝากสู่ถั่วเหลือง

Cloning, Expressing and Studying of *GmPR1* Gene in *Arabidopsis thaliana*

จิราพร แก่นทรัพย์ ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง

คำสำคัญ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill), พืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* (Model plant *Arabidopsis thaliana*), การต้านทานโรค (Disease resistance), การโคลนและถ่ายฝากยีน (Cloning and expressing of gene)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและถ่ายฝากยีนต้านทานโรค *GmPR1* ในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* ทดสอบประสิทธิภาพก่อนการถ่ายฝากสู่ถั่วเหลือง โดยส่วน promoter หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกของยีนจะใช้ promoter ของยีน *Glyma04g05080* ที่มีรายงานว่ามีการแสดงออกสูงในส่วนใบ ดอก และราก แต่มีการแสดงออกต่ำในเมล็ดและไม่แสดงออกในเมล็ดระยะใกล้เก็บเกี่ยว การถ่ายฝากยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter ดังกล่าวจะทำให้ยีน *GmPR1* แสดงออกในระดับที่สูงกว่าถั่วเหลืองปกติโดยแสดงออกเฉพาะส่วนใบ ดอกและราก ส่งผลให้สามารถผลิตถั่วเหลืองที่มีความต้านทานต่อโรคได้ โดยไม่เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคเมล็ดถั่วเหลือง ในงานวิจัยทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคราสนิม โรคราน้ำค้างและโรคใบจุดนูน สำหรับนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในการโคลนยีน *GmPR1* และชิ้นส่วน promoter เนื่องจากยีน *GmPR1* ประกอบด้วยส่วน Exon เพียงชนิดเดียว ไม่มีส่วน Intron ในตัวยีน กล่าวคือ มีลำดับเบสเหมือนกับจีโนมดีเอ็นเอ และชิ้นส่วน promoter เป็นจีโนมดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน

ผลการโคลนยีน *GmPR1* ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *GmPR1* ภายใน cloning vector ชื่อพลาสมิด pBS 35S MCS *GmPR1* โดยชิ้นส่วนยีน *GmPR1* ที่ทำการโคลนมีขนาดถูกต้อง (525 bp) และมีลำดับ ดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล SoyBase และ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยมีความเหมือน (Identities) กับ CDS ของยีน *GmPR1* (*Glyma13g251600*) 100% สามารถนำไปต่อยอดในการสร้างชุดยีนอื่นๆ เพื่อผลิตพันธุ์พืชที่ต้านทานโรคสูงในอนาคต

สำหรับผลการโคลนชิ้นส่วน promoter ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของ promoter ขนาด 1,000 bp ภายใน cloning vector ชื่อพลาสมิด pBS 35S MCS A1000 โดยชิ้นส่วน promoter ที่ทำการโคลนมีขนาดถูกต้อง (1,000 bp) และมีลำดับดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล Soybean Upstream Regulatory Element (SURE) โดยมีความเหมือน (Identities) กับลำดับดีเอ็นเอของ A1000 ที่รายงานในฐานข้อมูล SURE คิดเป็น 98.9% สามารถนำไปต่อยอดในการสร้างชุดยีนอื่นๆ โดยใช้เป็นส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน

Abstract

The objective of this research was to clone *GmPR1* gene from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and transform it to *Arabidopsis thaliana* for testing gene function before transformation to soybean. A promoter is a region of DNA that initiates transcription of a particular gene. In this research, the promoter of *Glyma04g05080* gene was used because it was reported that it regulates genes to be highly expressed in leaves, flowers and roots, while little expressed in seed and not expressed in seed of harvest time. By transformation of a gene cassette containing the promoter of *Glyma04g05080* gene and *GmPR1* gene, the transformed soybean is expected to have expression of *GmPR1* gene with high level in leaves, flowers and roots, and with low level or none in seed. Consequently, the transformed soybean is supposed to be resistant to diseases and safe for consumers. A Thai soybean variety, namely Chiangmai 5, is reported to be resistant to soybean rust, downy mildew and leaf spot disease. DNA from young leaves of Chiangmai 5 soybean was extracted and used as a template DNA in cloning *GmPR1* gene, because *GmPR1* has only one exon and no intron in gene structure. DNA of Chiangmai 5 soybean was used as a template DNA in cloning the promoter as well.

GmPR1 gene was cloned into a cloning vector and a recombinant plasmid, namely pBS 35S MCS *GmPR1*, was generated. The full length of *GmPR1* coding sequences (CDS) was 525 bp. From sequence analysis, the cloned *GmPR1* CDS showed identity with *GmPR1* (*Glyma13g 251600*) CDS reported in Soybase and NCBI with the identities of 100%. The cloned *GmPR1* can be used in gene cassette construction aimed to improve crop disease resistance in the future.

The promoter of *Glyma04g05080* gene with the length of 1,000 bp was cloned into a cloning vector and a recombinant plasmid, namely pBS 35S MCS A1000, was generated. The fragment of the cloned A1000 was sequenced and analysed. The result showed that the cloned promoter A1000 showed identity with sequence of A1000 reported in Soybean Upstream Regulatory Element database (SURE) with the identities of 98.9%. The cloned promoter A1000 will be useful for gene cassette construction with ability of gene expression regulation.

บทนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เป็นแหล่งอาหารสำคัญทั้งโปรตีนและไขมัน รวมถึงมีสารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น สารละลายคอเลสเตอรอล lecithin และสารช่วยเพิ่มมวลกระดูกและรักษาผิว isoflavone นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังมีประโยชน์ทางการเกษตร เป็นพืชหมุนเวียนอีกด้วย ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองประมาณ 212,000 ไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 55,979 ตันต่อปี การผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทยไม่พอเพียงกับความต้องการใช้ภายในประเทศ ทำให้ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ในปี 2560 ความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองมีปริมาณ 2.7 ล้านตัน ซึ่งมีสัดส่วนการใช้ผลผลิตภายในประเทศร้อยละ 2.05 และนำเข้าร้อยละ 97.95 ของปริมาณความต้องการใช้

ทั้งหมด (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ดังนั้นการวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตถั่วเหลืองให้ผลิตได้มากขึ้นและมีคุณภาพสูงขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตวิธีการหนึ่ง ได้แก่ การพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีความต้านทานโรคสูงขึ้น เนื่องจากการติดโรคของถั่วเหลืองจะส่งผลให้ผลผลิตลดลง โรคที่เป็นปัญหาสำคัญ ได้แก่ โรคราสนิม โรคราน้ำค้าง โรคใบจุดนูน และโรคแอนแทรกคโนส เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

การพัฒนาพันธุ์พืชให้มีความต้านทานโรคสูงหรือมีลักษณะทางการเกษตรที่ดีด้วยการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีมาตรฐาน (conventional breeding) ใช้ระยะเวลา พื้นที่ แร่งงาน และค่าใช้จ่ายมาก ในปัจจุบันเทคนิคการโคลนยีนและถ่ายฝากยีนที่พัฒนาลักษณะทางการเกษตรของพืช ได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาพันธุ์พืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถเลือกยีนที่ส่งผลต่อลักษณะทางการเกษตรที่ต้องการได้อย่างเจาะจง กระบวนการปฏิบัติรวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีมาตรฐาน ลดภาระการทำงาน และค่าใช้จ่ายในการดูแลพืช ตัวอย่างของยีนที่ถ่ายฝากเพื่อพัฒนาลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ ยีน *1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase* เพื่อชะลอการสุกในมะเขือเทศ (Klee *et al.*, 1991) ยีน *Coat Protein (CP)* จาก papaya ringspot virus (PRSV) เพื่อสร้างความต้านทานต่อโรคจุดวงแหวนในมะละกอ (Lius *et al.*, 1997) และยีน *Crystal (Cry)* เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชในข้าว ข้าวโพด ฝ้าย ยาสูบ มะเขือเทศและถั่วเหลือง (Castagnola and Jurat-Fuentes, 2012)

ยีน *Pathogenesis-related (PR)* เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในระบบต้านทานการรุกรานจากเชื้อโรคของพืช (Plant's defense response) ยีน *PR* ถูกชักนำให้แสดงออกเมื่อเกิดการรุกรานจากเชื้อโรคหรือถูกกัดกินจากแมลง โดยโปรตีนของกลุ่มยีน *PR* นี้ทำหน้าที่เป็นสารต้านทานเชื้อโรค เป็นเอนไซม์ในการทำลายโปรตีนโครงสร้างของเชื้อโรค รวมถึงเป็นสารที่ขัดขวางการทำงานของ RNase ที่ผลิตมาจากเชื้อโรค (Singha *et al.*, 2014) เนื่องจากยีน *PR* มีคุณสมบัติในการต้านทานการรุกรานจากเชื้อโรคของพืช จึงมีการค้นคว้าวิจัยและผลิตพืชที่มีการแสดงออกของยีน *PR* สูงเพื่อสร้างพืชที่มีความต้านทานโรคและแมลง เช่น การถ่ายฝากยีน *PR1* ในยาสูบเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวส่งผลให้ยาสูบมีความต้านทานต่อเชื้อรา Oomycete เพิ่มขึ้น (Alexander *et al.*, 1993) นอกจากนี้การถ่ายฝากยีน *PR5* หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *Osmotin* ในมันฝรั่งเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวส่งผลให้มันฝรั่งมีความต้านทานต่อเชื้อโรคเพิ่มขึ้น (Liu *et al.*, 1994)

การโคลนยีน *GmPR1* จากถั่วเหลือง จากนั้นทำการถ่ายฝากและศึกษายีนดังกล่าวในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* ก่อนทำการถ่ายฝากสู่ถั่วเหลือง จะทำให้ทราบว่ายีน *GmPR1* ที่โคลนมาจากถั่วเหลืองนั้นมีประสิทธิภาพในการแสดงออกหรือไม่ ส่งผลให้การสร้างถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทานโรคในอนาคตมีประสิทธิภาพ โดยส่วน promoter หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกของยีนจะใช้ promoter ของยีน *Glyma04g05080* ที่มีรายงานว่ามีการแสดงออกสูงในส่วนใบ ดอก และราก แต่แสดงออกต่ำในเมล็ดและไม่แสดงออกในเมล็ดระยะใกล้เก็บเกี่ยว (SoyBase) การใช้ promoter นี้มีจุดประสงค์คือ เมื่อผลิตถั่วเหลืองด้วยการถ่ายฝากยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter ดังกล่าวแล้ว ยีน *GmPR1* จะแสดงออกในระดับที่สูงกว่าถั่วเหลืองปกติโดยแสดงออกเฉพาะส่วนใบ ดอกและราก ส่งผลให้สามารถผลิตถั่วเหลืองที่มีความต้านทานต่อโรคได้โดยไม่เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคเมล็ดถั่วเหลือง ซึ่งงานวิจัยนี้มีแผนดำเนินการเป็นระยะเวลา 4 ปี (ปีงบประมาณ 2559-2562) โดยในปีงบประมาณ 2559-2560 ดำเนินการโคลนยีน *GmPR1* และ promoter จากถั่วเหลืองจากนั้นทำการสร้างชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter ดังกล่าว สำหรับในปีงบประมาณ 2561-2562 มีแผนดำเนินการถ่ายฝากชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter เข้าสู่พืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย วิธีการ floral dip และทดสอบการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตามแผนงานปีงบประมาณ 2561-2562 ถูกระงับจึงไม่ได้ดำเนินการต่อ

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การโคลนยีน *GmPR1*

1.1 ศึกษาข้อมูลลำดับดีเอ็นเอและโครงสร้างของยีน *GmPR1* จากฐานข้อมูล SoyBase และ NCBI นำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน *GmPR1* ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อวางแผนการตัดต่อชุดยีนว่าจะเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใด จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *GmPR1*

1.2 จัดหาหัวเชื้อของพันธุ์เชียงใหม่ 5 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคราสนิม โรคราน้ำค้างและโรคใบจุดนูน โดยขอความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในการโคลนยีน *GmPR1* การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของหัวเชื้อใช้วิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) โดยดัดแปลงจาก Keim *et al.* (1988) ซึ่งมีวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยละเอียดดังนี้

- เก็บใบหัวเชื้อมาใส่ในโถงจากนั้นเติม Extraction buffer (2% CTAB, 1.4 mM NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 20 mM EDTA) 1,000 ไมโครลิตร ทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดซึ่ง Extraction buffer 1,000 ไมโครลิตรเหมาะกับการบดตัวอย่างใบหัวเชื้อที่มีน้ำหนักประมาณ 0.25 กรัม
- ดูดสารที่ได้จากการบดตัวอย่าง 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml microtube
- แช่ใน water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยผสมเบาๆ ทุก 10 นาที
- วางไว้ในอุณหภูมิต้องประมาณ 3 นาทีเพื่อปล่อยให้เย็น จากนั้นใส่ 24:1 chloroform/isoamyl alcohol 500 ไมโครลิตรและผสมเบาๆ
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 15 นาที
- ดูดน้ำใสส่วนบน supernatant 300 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml microtube อันใหม่
- ใส่ isopropanol ที่แช่เย็น 180 ไมโครลิตร และผสมเบาๆ
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 15 นาที
- เทน้ำใสส่วนบน supernatant ทิ้ง
- ใส่ 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 10 นาที
- เทน้ำใสส่วนบน supernatant ทิ้งด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอหล่นออกไป
- ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 5 นาที และดูดน้ำส่วนที่เหลือออกให้หมด รอให้แห้ง จากนั้นใส่ TE (2 M Tris-Cl pH 8.0 1 ml, 0.5 M EDTA 0.4 ml ในน้ำ 200 ml) 30 ไมโครลิตร เพื่อละลาย ดีเอ็นเอ
- นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer
- คำนวณปรับความเข้มข้นให้เป็น 50 ng/ μ l ก่อนทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่เตรียมไว้

1.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *GmPR1* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GmPR1* ได้ แก่ SmalPR1 Fw (5'-CCGAcccgggATGGGTACATGTGCATTAAGATTCGTTT-3') และ SacI PR1 Rvpri (5'-TGCCgagctcCTACAGTTTGTAGGGTCTTTCACCAAC-3') ใช้ เอนไซม์ Phusion Hot

Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

<u>ขั้นที่ 1</u>	98 องศาเซลเซียส	30 วินาที
<u>ขั้นที่ 2</u>	98 องศาเซลเซียส	10 วินาที
	72 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ	
<u>ขั้นที่ 3</u>	72 องศาเซลเซียส	10 นาที

1.4 ตัดต่อชิ้นส่วนยีน *GmPR1* เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (cloning vector) ได้แก่ pBS 35S MCS GFP (ที่ได้ตัดชิ้นส่วนของยีน *GFP* ออก) ซึ่ง pBS 35S MCS GFP (Ampicillin resistance) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr.Daisuke Tsugama และ Prof.Dr.Tetsuo Takano จาก The University of Tokyo ถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับนำไปตรวจสอบวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอจากนั้นเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล NCBI และ SoyBase ก่อนการนำไปใช้ในการสร้างชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter

2. การโคลนชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080*

2.1 ศึกษาข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080* จากฐานข้อมูล SoyBase และ Soybean Upstream Regulatory Element (SURE) โดยยีน *Glyma04g05080* มีความคล้ายคลึงกับยีน *At5g10510* ของพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งเป็น AP2-domain transcription factor นำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อวางแผนการตัดต่อชุดยีนว่าจะเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดใด จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ promoter

2.2 นำดีเอ็นเอของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5 ที่สกัดได้ในข้อ 1.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในการโคลนชิ้นส่วน promoter

2.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ promoter ของยีน *Glyma04g05080* ได้แก่ SmHiA1000Fw (5'-atatCCCGGgaagcttCCAAGGCACATA GACACAGACACCTC-3') และ SaXbAP2pRvpri (5'-ggccGAGCTCtctagaCTTCAATGCAACCAAGTTCAC AATGTAATG-3') ใช้ เอนไซม์ Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

<u>ขั้นที่ 1</u>	98 องศาเซลเซียส	30 วินาที
<u>ขั้นที่ 2</u>	98 องศาเซลเซียส	10 วินาที
	72 องศาเซลเซียส	40 วินาที
	ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ	
<u>ขั้นที่ 3</u>	72 องศาเซลเซียส	10 นาที

2.4 ตัดต่อชิ้นส่วน promoter เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (cloning vector) ได้แก่ pBS 35S MCS GFP (ที่ได้ตัดชิ้นส่วนของยีน *GFP* ออก) ถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับนำไปตรวจสอบวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอจากนั้นเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล SoyBase และ SURE ก่อนการนำไปใช้ในการสร้างชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter

3. การสร้างชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter

ในการสร้างชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter ของยีน *Glyma04g05080* ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้สำหรับการถ่ายฝากยีนในพืช (plant vector) ได้แก่ pBI121 35S MCS GFP (Kanamycin resistance) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr.Daisuke Tsugama และ Prof.Dr.Tetsuo Takano จาก The University of Tokyo ดำเนินการตัดต่อชิ้นส่วนของยีน *GmPR1* และชิ้นส่วนของ promoter จาก cloning vector เข้าสู่ plant vector

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการวิจัย

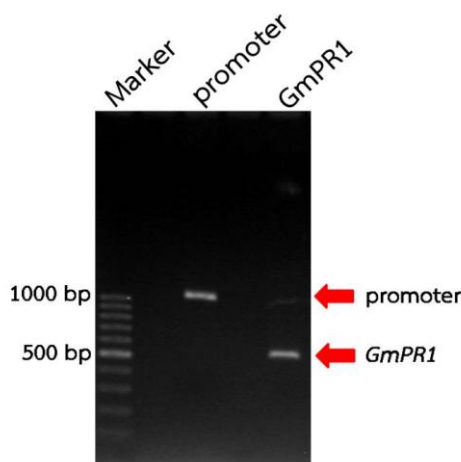
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การโคลนยีน *GmPR1*

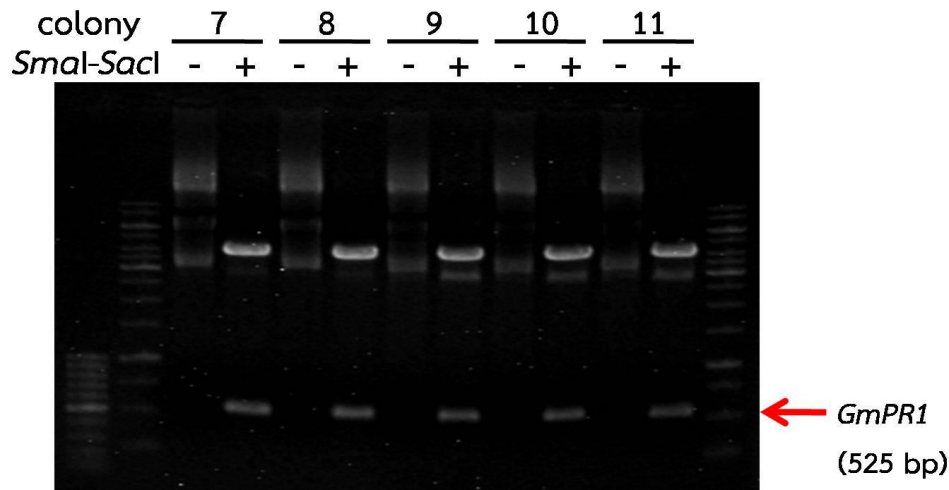
จากการศึกษาข้อมูลลำดับดีเอ็นเอและโครงสร้างของยีน *GmPR1* (*Glyma13g251600*) จากฐานข้อมูล SoyBase และ NCBI พบว่ายีน *GmPR1* ประกอบด้วยส่วน Exon เพียงอย่างเดียว ไม่มีส่วน Intron ซึ่งส่วน Exon มีขนาด 525 bp เมื่อนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของยีน *GmPR1* ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อวางแผนการตัดต่อชุดยีน พบว่ายีน *GmPR1* ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bam*HI, *Hind*III, *Sac*I, *Sma*I, *Spe*I, *Xba*I และในส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080* ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bam*HI, *Hind*III, *Sac*I, *Sma*I, *Spe*I, *Xba*I เช่นกัน ดังนั้นจึงตัดสินใจใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Hind*III, *Sac*I, *Sma*I และ *Xba*I ในการตัดต่อชุดยีน จากนั้นจัดเตรียมไพรเมอร์ที่จะใช้ในการโคลนยีน

ทำการปลุกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคราสนิม โรคราน้ำค้างและโรคใบจุดนูน สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของถั่วเหลืองด้วยวิธี CTAB จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *GmPR1* เนื่องจากยีน *GmPR1* นั้นประกอบด้วยส่วน Exon เพียงชนิดเดียว ไม่มีส่วน Intron ในตัวยีน กล่าวคือ เป็นชิ้นส่วนเดียวกับจีโนมดีเอ็นเอ (ลำดับเบสเดียวกัน) จึงสามารถใช้ดีเอ็นเอที่สกัดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ผลการทดลองปรากฏแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการและตรงตามขนาดประมาณ 525 bp (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1. ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) และชิ้นส่วนยีน *GmPR1*

ตัดต่อชิ้นส่วนยีน *GmPR1* เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (cloning vector) ได้แก่ pBS 35S MCS GFP (ที่ได้ตัดชิ้นส่วนของยีน *GFP* ออก) ได้เป็น pBS 35S MCS *GmPR1* ถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เมื่อตรวจสอบด้วยการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GmPR1* พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตามกำหนด (525 bp) จึงสกัดพลาสมิดของดีเอ็นเอสายผสมของแต่ละโคลนนี้ไว้ จากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *SmaI-SacI* เพื่อทดสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการโคลนดังภาพที่ 2 ก่อนการนำไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ (sequencing)

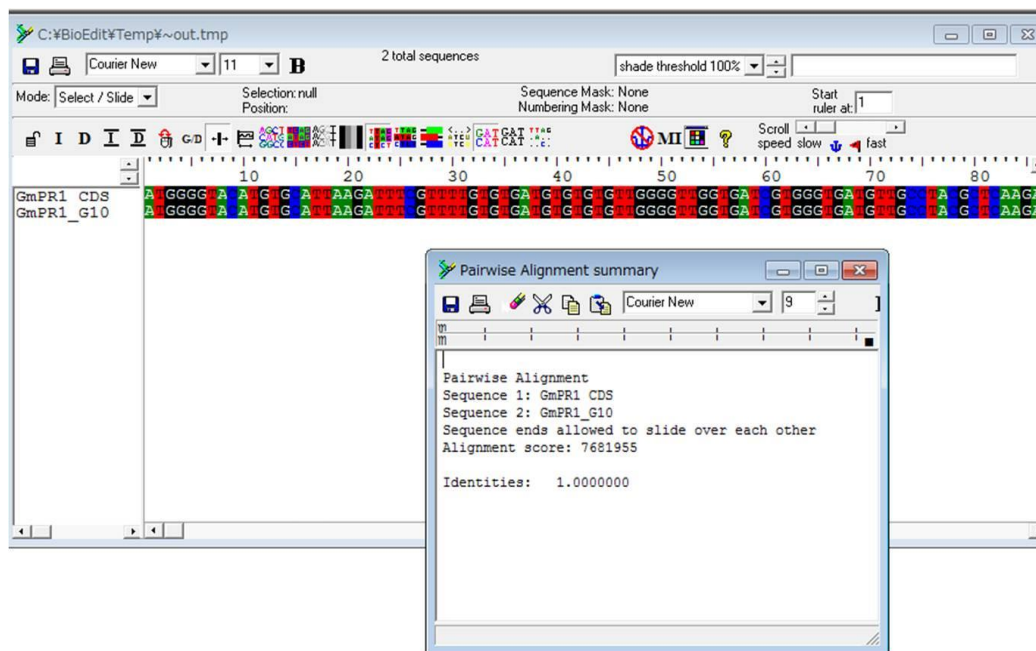


ภาพที่ 2. การตรวจสอบความถูกต้องของโคลนนิ่ง pBS 35S MCS *GmPR1* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *SmaI-SacI*

การตรวจสอบวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *GmPR1* ภายใน cloning vector และเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล SoyBase และ NCBI รวมถึงการ pairwise alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit พบว่า ชิ้นส่วนที่ทำการโคลนมีลำดับดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล (ภาพที่ 3) มีความเหมือน (Identities) กับ CDS หรือ coding sequences ของยีน *GmPR1* (*Glyma13g251600*) 100% (ภาพที่ 4) ซึ่งได้นำชิ้นส่วนยีน *GmPR1* ดังกล่าวไปสร้างชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter ของยีน *Glyma04g05080* โดยตัดต่อเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้สำหรับการถ่ายฝากยีนในพืช (plant vector) ในลำดับต่อไป

```
GmPR1_G10 - メモ帳
ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)
ATGGGGTACATGTGCATTAAGATTTTCGTTTTGTGTGATGTGTGTGTTGGG
GTTGGTGCATCGTGGGTGATGTTGCCTACGCTCAAGATTCAGCAGAAGACT
ACGTGAATGCACACAATGCAGCACGAGCAGAGGTGGGTTCTCAATCACC
AGACAAACAGTGATTGTTCCAAGTTTGGCTTGGGATGATACGGTTGCTGC
TTATGCAGAGAGCTATGCTAATCAACGCAAAGGTGACTGCCAACTGATCC
ACTCTGGTGGTGAATACGGAGAGAATATTGCAATGAGCACTGGTGAAC
AGTGGCACAGATGCAGTGAAAATGTGGGTTGATGAGAAATCCAATATGA
CTATGATTCTAACTCTTGTGTTGGAGGAGAGTGCCTGCACTACACACAGG
TCGTTTGGGCTAACTCGGTGCGTCTTGGATGTGCCAAAGTGACATGTGAT
AACGGAGGCACTTTCATCACTTGCAACTATGATCCCCCTGGCAACTTTGT
TGGTGAAAGACCCTACAACTGTAG
```

ภาพที่ 3. ลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *GmPR1* ที่ตรวจวิเคราะห์จากโคลนที่ 10



ภาพที่ 4. การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน *GmPR1* จากโคลนที่ 10 กับ CDS ของยีน *GmPR1* (*Glyma13g251600*) โดยใช้โปรแกรม BioEdit

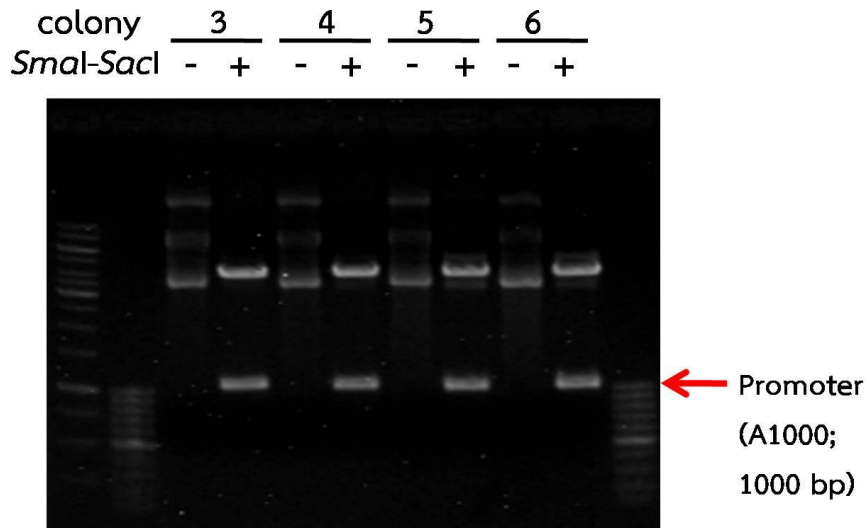
2. การโคลนชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080*

จากการศึกษาข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080* จากฐานข้อมูล SoyBase และ SURE พบว่า promoter ของยีน *Glyma04g05080* มีความยาวมากที่สุดที่ 1,767 bp อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าชิ้นส่วน promoter โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 100 - 1,000 bp นับจากจุดเริ่มต้นของยีนที่ควบคุม (https://en.wikiversity.org/wiki/Gene_transcriptions/Distal_promoters) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการโคลนชิ้นส่วน promoter ขนาด 1,000 bp ใช้รหัสว่า A1000 เมื่อนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อวางแผนการตัดต่อชุดยีนพบว่า promoter (A1000) ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bam*HI, *Hind*III, *Sac*I, *Sma*I, *Spe*I, *Xba*I จากนั้นจัดเตรียมไพรเมอร์ที่จะใช้ในการโคลนชิ้นส่วน promoter (A1000)

นำดีเอ็นเอของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5 ที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) เนื่องจากชิ้นส่วน promoter นั้นเป็นจีโนมดีเอ็นเอ จึงสามารถใช้ดีเอ็นเอที่สกัดเป็น ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ผลการทดลองปรากฏแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการและตรงตามขนาดประมาณ 1000 bp (ภาพที่ 1)

ตัดต่อชิ้นส่วน promoter (A1000) เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (cloning vector) ได้แก่ pBS 35S MCS GFP (ที่ได้ตัดชิ้นส่วนของยีน *GFP* ออก) ได้เป็น pBS 35S MCS A1000 ถ่ายฝาก ดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เมื่อตรวจสอบด้วยการทำโคลนพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วน promoter (A1000) พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตามกำหนด (1,000 bp) จึงสกัดพลาสมิดของดีเอ็นเอสายผสมของแต่ละโคลนไว้ จากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Sma*I-

SacI เพื่อทดสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการโคลนดังภาพที่ 5 ก่อนการนำไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ (sequencing)



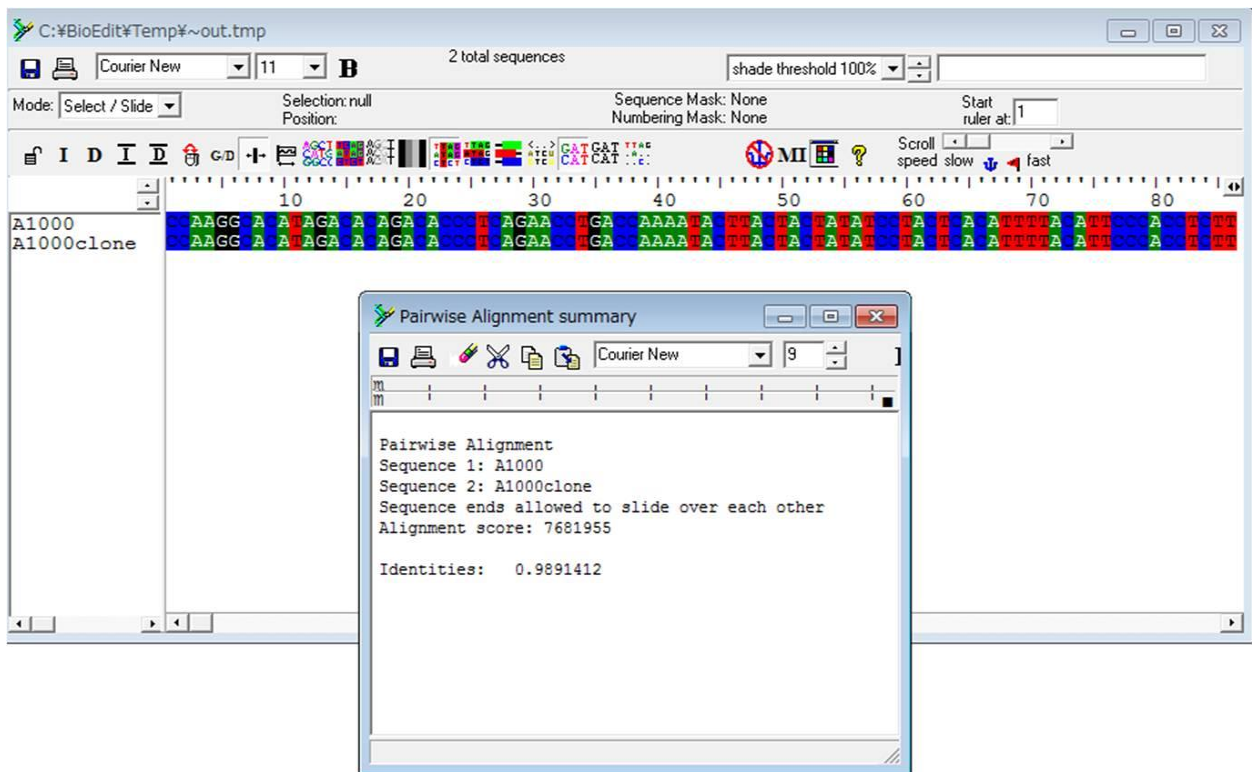
ภาพที่ 5. การตรวจสอบความถูกต้องของโคลนีนี pBS 35S MCS A1000 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *SmaI-SacI*

การตรวจสอบวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) ภายใน cloning vector และเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล SoyBase และ SURE รวมถึงการ pairwise alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit พบว่า ชิ้นส่วนที่ทำการโคลนมีลำดับดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล (ภาพที่ 6) มีความเหมือน (Identities) กับลำดับดีเอ็นเอของ A1000 ที่รายงานในฐานข้อมูล SURE คิดเป็น 98.9% (ภาพที่ 7) ซึ่งได้นำชิ้นส่วน promoter (A1000) ที่ทำการโคลนดังกล่าวไปสร้างชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter ของยีน *Glyma04g05080* โดยตัดต่อเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้สำหรับการถ่ายฝากยีนในพืช (plant vector) ในลำดับต่อไป

```

A1000clone - メモ帳
ファイル(F) 編集(E) 書式(O) 表示(V) ヘルプ(H)
CCAAGGCACATAGACACAGACACCCTCAGAACCTGACCAAAATACTTACT
ACTATATCCTACTCACATTTTACATTCCCACCTCTTTTCTTTCCCCCTTA
CCATTCTCGAGATTCTCGCTTTTACTACATTACTCTCTCTTTCATTCTGG
GTTTAAGGTAGGGTTTATTTAACTAGGAAGAAAGTTTTTAAAGAGAGAGA
TAGGCAAACCGAAAAGACGTGGTCTTTCTCATTGATATATACATACACAG
ATCCCTATGGAATGAAGAGGGTGCTCCCCAATCTTCGCTTGCCGAGAATT
CATTCTTTTTGCTTAGTTTTAAAGAGACCAGTCTTGTTGTTTCGGAGAGA
GAGACATATTTGTGTGTTGAGCAGATAGAACGATGAGTTTTGGTTGGTAGA
GGAGCAAGTATAGCATTGTAGTTGTAGCAATAGCAACACACACAACACA
ACAAAACAAAACCAAGTCTTCATCATCTTCATATGCAGAGATTAACATG
ATGATTAGTTTTATTTGCCAAGCAATGCCTTCTTCGTGAGATATAAACTG
CTAGCAATTTCAAATCTTTTCGAGTAACCAAAAAGAAAAAACA AAAAGC
AAGAAGATGAAGCGCATAAATGAGAGTAACAATACCGATGATGGAAACAA
TCATAACTGGTTGGGGTTCTCTCTCACCCACATGAAAATGGAGGCTA
CTTCAGCACCCACTGTTCCGACAACCTTCTACATGTCCCCTTCTCAATCT
CACTTGTCCAAATTCGGAATGTGTTACGGTGTGCGAGAAAATGGTAACTT
CCATTCTCCACTTACGGTTATGCCTCTCAAGTCTGATGGGTCACTTTGTA
TCTTGGAAGCTCTCAAAAGATCACAAACGCAAGGTTGCCTTTTTTTTTGT
TTTTTTTTTTTTATTATCTTCAGACAATATTTTAAAATGATGCAGTACTAT
TTTTTATGTCATGTATTATGGCTCTTTATTAATCATTACATTGTGAACCT
GGTTGCATTGAAG
  
```

ภาพที่ 6. ลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) ที่ตรวจวิเคราะห์จากโคลนที่ 5 (A1000clone)



ภาพที่ 7. การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของ promoter (A1000) จากโคลนที่ 5 กับลำดับดีเอ็นเอของ A1000 จากฐานข้อมูล SURE โดยใช้โปรแกรม BioEdit

3. การสร้างชุดยีน *GmPR1* ภายใต้การควบคุมของ promoter

นำพลาสมิดของดีเอ็นเอสายผสมแต่ละชนิด ได้แก่ ยีน *GmPR1* ภายใน cloning vector (pBS 35S MCS *GmPR1*) และ promoter ของยีน *Glyma04g05080* ภายใน cloning vector (pBS 35S MCS A1000) ที่ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอแล้ว มาทำการตัดด้วยเอนไซม์และสกัดชิ้นส่วนยีน *GmPR1* รวมถึงชิ้นส่วน promoter (A1000) สำหรับนำไปต่อเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้สำหรับการถ่ายฝากยีนในพืช (plant vector) ได้แก่ pBI121 35S MCS GFP

ทำการต่อชิ้นส่วนยีน *GmPR1* เข้าสู่ pBI121 35S MCS ที่ได้ตัดชิ้นส่วนของยีน *GFP* ออกไปแล้ว ได้เป็น pBI121 35S MCS *GmPR1* จากนั้นถ่ายฝากเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α พบว่ามีโคลนเกิดขึ้น แต่ใช้เวลานานกว่าจะปรากฏให้เห็น นำโคลนที่ปรากฏมาเพิ่มปริมาณโดยเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน พบว่า *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α เจริญเติบโตได้ช้ามาก เมื่อทำการสกัดพลาสมิดออกมาและนำไปทดสอบโดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ของยีน *GmPR1* พบว่า มีแถบดีเอ็นเอปรากฏแต่แถบดีเอ็นเอจาง คาดว่าการถ่ายฝากชุดยีน pBI121 35S MCS *GmPR1* อาจส่งผลทำให้ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α เจริญเติบโตได้ไม่ดีเนื่องจากในชุดยีนดังกล่าวมียีน *GmPR1* ที่ทำงานในระบบต้านทานโรคของพืชรวมอยู่ด้วยซึ่งอาจเป็นพิษต่อ *E.coli* (Singha *et al.*, 2014)

สรุปผลการวิจัย

1. ได้ดีเอ็นเอที่สกัดจากถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคราสนิม โรคราน้ำค้างและโรคใบจุดนูน นำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในการโคลนยีน *GmPR1* และชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080*

2. ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *GmPR1* ภายใน cloning vector (pBS 35S MCS GmPR1) ที่ตรวจสอบแล้ว พบว่า ชิ้นส่วนยีน *GmPR1* ที่ทำการโคลนมีขนาดถูกต้อง (525 bp) และมีลำดับดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล โดยมีความเหมือน (Identities) กับ CDS ของยีน *GmPR1* (*Glyma13g251600*) 100% สามารถนำไปต่อยอดในการสร้างชุดยีนอื่นๆ ได้

3. ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของ promoter ของยีน *Glyma04g05080* ภายใน cloning vector (pBS 35S MCS A1000) ที่ตรวจสอบแล้ว พบว่า ชิ้นส่วน promoter ที่ทำการโคลนมีขนาดถูกต้อง (1,000 bp) และมีลำดับดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล โดยมีความเหมือน (Identities) กับลำดับดีเอ็นเอของ A1000 ที่รายงานในฐานข้อมูล SURE คิดเป็น 98.9% สามารถนำไปต่อยอดในการสร้างชุดยีนอื่นๆ ได้

4. เนื่องจากชุดยีน pBI121 35S MCS GmPR1 อาจส่งผลให้ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α เจริญเติบโตได้ไม่ดี ดังรายละเอียดในผลการทดลองและวิจารณ์ข้างต้น ดังนั้นถ้ามีการดำเนินการทดลองต่อในอนาคต คณะผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่าการปรับเปลี่ยนลำดับการตัดต่อยีน โดยทำการต่อชิ้นส่วน promoter (A1000) เข้าสู่ plant vector แทนที่ 35S promoter ก่อน จากนั้นทำการต่อชิ้นส่วนยีน *GmPR1* เข้าไป อาจเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหา *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α เจริญเติบโตได้ไม่ดีอันมีสาเหตุมาจากการผลิตยีน *GmPR1* ที่มากเกินไป

การทดลองที่ 2.3

การถ่ายฝากยีน ERD15 ที่อยู่ในรูป RNAi เข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) และศึกษาการแสดงออกของยีน ERD15 gene transformation in the form of RNAi into the model plant (Tobacco) and gene expression study

พญกศกดิ์ รวยอารี

อรุณทัย ชาวา

ภรณี สว่างศรี

บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

คำสำคัญ

การโคลนยีน (Gene cloning), RNAi, การแสดงออกของยีน, ERD4 gene

บทคัดย่อ

ปัจจุบันพืชประสบปัญหาสภาวะขาดน้ำจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เทคโนโลยี RNA interference (RNAi) ได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มคุณสมบัติของพืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยใช้ยีนทนแล้งต่างๆ งานวิจัยนี้ได้ออกแบบเวกเตอร์ pRNAi-GG plant expression vector ที่ประกอบด้วยยีน ERD15 ในทิศทาง sense และ antisense ที่ประกอบด้วยยีนอินทรอน pdk คั่นกลาง และ ยีน ccdB (lethal gene) ถูกแทนที่ด้วย ERD15 โดยอาศัยวิธีการ One tube restriction-ligation method เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ BsaI และ เชื่อมต่อกับเอนไซม์ T4 DNA ligase ตามวิธีการของ Pu Yan et al. 2012 ออกแบบและสังเคราะห์ยีน ERD15 ให้มีขนาดเท่ากับ 609 คู่เบส เติมจุดตัด BsaI ที่ด้านปลาย 5' และ 3' ของยีน บนพลาสมิดเวกเตอร์ pRNAi-GG (Golden gate vector) ที่ประกอบด้วยตำแหน่งโปรเมอร์จำเพาะเพื่อใช้ในการคัดเลือกทรานส์ฟอร์แมนส์และโครงสร้าง RNAi ที่ได้ประกอบด้วยทั้ง CaMV35S promoter และ Nos terminator ศึกษาควบคุมการทำงานของยีนในลักษณะการยับยั้งการทำงานของยีน ERD15 (gene silencing) เมื่อ ccdB lethal gene ถูกแทนที่ด้วยยีน ERD15 ทั้งทิศทาง sense และ antisense ตรวจสอบผลการแทรกแซงของยีน ERD15 ในคอนสตรัคส์ โดยการหาลำดับเบสและโดยการใช้โปรเมอร์จำเพาะทิศทาง ผลการทดลองพบว่า ได้ยีน ERD15 ที่อยู่ใน pRNAiGG+ERD15 จำนวน 100% (12 โคลนิจาก 12 โคลนิจ) จากนั้นถ่ายฝากพลาสมิด pRNAi-GG ที่ประกอบด้วยยีน ERD15 (pRNAi+ERD15 construct) เข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ *E. coli* เพื่อเพิ่มจำนวน โดยวิธี Electroporation ผลจากการตรวจสอบทรานส์ฟอร์แมนส์ พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ ERD15 มีลำดับเบสคล้ายคลึงอย่างสูงกับ ERD15 ของ *Arabidopsis thaliana* และได้ ihpRNAi+GG คอนสตรัคส์ที่ประกอบด้วยยีน ERD15 ทั้งทิศทาง sense และ antisense ที่ถูกต้อง ทำการทดลองระหว่างปี 2559 ถึง 2560 ณ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จากนั้น ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ เพื่อทำการถ่ายฝากยีน ERD15 โดยอาศัยวิธีการ Agrobacterium transformation เข้าสู่เชื้ออะโกราแบคทีเรียที่เตรียม ElectroMAX LBA4404 และ A10460 ผลการทดลองในเบื้องต้น พบว่า ทรานส์ฟอร์แมนส์ที่ถ่ายฝากเข้าสู่เชื้อ Agrobacterium A10460 ได้ค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี โดย A10460 มีคุณสมบัติต้านทานต่อยีน ccdB แต่ประสิทธิภาพการถ่ายฝากยีน ERD15 เข้าสู่ต้นพืชยาสูบค่อนข้างต่ำเมื่อใช้ LBA4404 โดยทรานส์ฟอร์แมนส์ไม่สามารถเติบโตเป็นแคลลัสได้ จากการถ่ายฝากยีน แต่การทดลองควบคุม (control experiments) โดยอาศัยใบของต้นยาสูบ ประสบความสำเร็จ 100% สรุปได้ว่า ต้องศึกษาโดยใช้

Agrobacterium สายพันธุ์อื่นๆ พร้อมกับทำการปรับสภาพที่เหมาะสมในการถ่ายฝากยีน ERD15 ในรูปพลาสมิด ihpRNAi+GG ด้วยวิธี ELECTRO agrobacterium transformation เพื่อให้ได้ต้นยาสูบที่ประกอบด้วยยีน ERD15 เพิ่มเติมต่อไป

Abstract

RNA interference (RNAi) of ERD15 gene has largely been used to study abiotic stress such as drought tolerance trait. Plasmid pRNA-GG plant expression vector comprising ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15) has been designed by GeneArtGene synthesis and RNAi silencing method according to Restriction-ligation method of Pu Yan et al., 2012. pRNAi-GG (Golden gate vector) contains both ccdB lethal genes and 5' and 3' end, pdk introns and primers-flanking sites for transformant screening in its constructs. In this experiment, the full-length of synthesized ERD15 cDNA is 609 bp with BsaI restriction sites at 5' and 3' ends. The resulted ERD15 protein shares high protein amino acid similarity with ERD15 of *Arabidopsis thaliana* in the database. Then, the construct was transformed into *E. coli* electrocompetent cells for amplification. The results showed that a 100% of the transformants was shown. Furthermore, ERD15 gene was successfully transformed for analysis of the growth of transgenic plants into tobacco plants by agrobacterium-mediated transformation using both agrobacterium strains, LBA4404 and A10460. The results showed that the resulted transformants examined could not be grown onto the MS media+cefotaxim+kanamycin using agrobacterium LBA4404 strain comprising ccdB lethal gene and pdk intron in between. In contrast, the transformants was able to grow on Agrobacterium A10460 lacking ccdB lethal gene. Our result indicated that the pRNAi-GG+ERD15 plasmid vector was successfully constructed for further analysis but further transformation using the different agrobacterium strains needed to be used for success plant transformation.

บทนำ

ปัจจุบัน เป็นที่ทราบกันดีว่าอุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอันเนื่องมาจากกิจกรรมของมนุษย์ ทั้งภาคเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรม จำนวนประชากรมนุษย์ที่เพิ่มสูง จำนวนพื้นที่เพาะปลูกหรือภาคการเกษตรที่ลดลงเพื่อใช้ในกิจกรรมอย่างอื่นที่ไม่ใช่ภาคเกษตร บวกกับเทคโนโลยีใหม่ๆที่มนุษย์สร้างขึ้น ทำให้โลกต้องประสบกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นในชั้นบรรยากาศ (ชั้นบรรยากาศบางลง) บวกกับปัจจัยอื่นๆ เช่น รัศมี ความเค็ม และความเครียดอื่นๆที่ส่งผลต่อพืช (Levitt, 1980) ทำให้เป็นที่คาดการณ์กันว่า มนุษย์ต้องเผชิญกับภาวะโลกร้อน ภาวะเรือนกระจกหรือสภาพการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศ (climate change) อย่างมากในอนาคตอันใกล้และปัจจุบันได้เกิดขึ้นแล้ว (Sun et al., 2014) โดยจะส่งผลกระทบต่อทั้งธรรมชาติและมนุษย์ ปัจจุบันผลที่เกิดจากภาวะโลกร้อนได้ทำให้มนุษย์เห็นแล้วว่าส่งผลกระทบต่อทั้งความสำคัญอย่างแท้จริง เช่น ทำให้สภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไป เช่น ฝนตกไม่ถูกต้องตามฤดูกาล พืชเกิดสภาวะขาดน้ำจากภาวะโลกร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในภาคการเกษตร พืชต้องประสบกับปัญหาภัยแล้ง

ในบางฤดูกาล เพราะฝนไม่ตกตามช่วงเวลาที่เหมาะสม ทำให้พืชประสบปัญหาภัยแล้ง และพืชบางพันธุ์อ่อนแอต่อสภาวะขาดน้ำ โดยสภาวะขาดน้ำนี้เป็นปัญหาที่พบได้ทั่วไป ทำให้พืชมีปริมาณน้ำในเซลล์ลดลง ความต่างศักย์ของน้ำในเซลล์ลดลง สูญเสียความดันน้ำในเซลล์ ปากใบปิดน้อยลงทำให้เกิดการสูญเสียน้ำและท้ายสุดทำให้พืชมีการเจริญเติบโตลดลง และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านการแสดงออกของยีนและขบวนการเมตาบอลิซึม (Shinozaki *et al.*, 2007) โดยทั่วไปแล้ว พืชจะมีการแสดงออกของยีนในสภาวะขาดน้ำเป็นสองช่วง คือ ในช่วงที่ขาดน้ำ (dehydration) และช่วงระยะเริ่มต้น (early responsive to dehydration) ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เพราะปริมาณพืชที่คาดหวังภายหลังการเพาะปลูกลดลง ทั้งมีสาเหตุมาจากไม่สามารถเพาะปลูกพืชได้ตามที่ต้องการหรือสูญเสียผลผลิตพืชที่ได้เพาะปลูกไป (yield loss) กล่าวโดยทั่วไปว่า ภัยแล้งจัดเป็นปัญหาทางกายภาพที่สำคัญที่สุดที่ทั่วโลกเผชิญ และทำให้การปรับปรุงพันธุ์ประสบความสำเร็จลำบากและทำลาย (Cattivelli *et al.*, 2008) เท่าที่ผ่านมา นอกเหนือจากวิธีการทางภาคเกษตรตามปกติแล้ว ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการพัฒนาพืชให้มีความทนทานแล้ง ทนต่อสภาวะขาดน้ำ หรือทนต่อสภาวะเครียดในช่วงการเพาะปลูกได้ (drought stress tolerance) โดยการศึกษาหา ยีนทนแล้งต่างๆ และนำยีนต่างๆ เหล่านั้นเข้าสู่จีโนมของพืชที่ต้องการให้มีสรีรวิทยาตามต้องการ อย่างไรก็ตาม การศึกษาตามวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพดังกล่าว ต่างให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันออกไป เช่น ระดับการตอบสนองต่อการขาดน้ำหลังการได้รับยีนที่ผันแปรไปตามแต่ละชนิดยีนหรือชนิดพืช เป็นต้น อีกทั้งในด้านความซับซ้อนของการตอบสนองของสภาวะขาดน้ำ ทำให้การระบุหา ยีนที่มีผลต่อความทนทานต่อการขาดน้ำนั้นเป็นเรื่องยาก

ยีน ERD (Early Responsive to Dehydration) จัดอยู่ในประเภท gene family เป็นยีนที่ถูกกระตุ้นอย่างรวดเร็วในช่วงขาดน้ำ (Kiyosue *et al.*, 1994) และพบมีความเป็นอนุรักษ์ในพืชทุกชนิด (conserved) จากการศึกษาโปรตีน ERD4 ในวัชพืชอะราบิโดพซิส (*Arabidopsis thaliana*) พบว่า ERD เป็นโปรตีนประเภท Integral membrane protein พบที่บริเวณเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์ (chloroplastic envelop membrane) เป็นโดเมนที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (unknown function) (Froehlich *et al.*, 2003)

ที่ผ่านมา การศึกษา ยีน ERD15 ใน *Arabidopsis* พบว่าการทำให้ยีนมีการแสดงออกที่สูงมากเกินไป (overexpression) เป็นสาเหตุให้เกิดการตอบสนองของวิถีทนทานต่อสภาวะขาดน้ำที่วิถี (pathway) ที่ต้องอาศัย ABA และ SA (abscisic acid และ salicylic acid (SA)-dependent pathway) โดยทำให้การตอบสนองของ ABA ลดลง มีผลทำให้ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม (transgenic plant) เกิดความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำลดลงและไม่สามารถที่จะเพิ่มความทนทานต่อสภาวะเย็นจัดเมื่อถูกให้ด้วยฮอร์โมนได้ในทางตรงกันข้าม การสูญเสียการทำงานของ ERD15 อันเนื่องมาจากภาวะ gene silencing ทำให้เกิดภาวะ hypersensitivity ต่อ ABA และทำให้พืชที่ไม่มีการแสดงออกของยีน (silenced plants) ดังกล่าว แสดงความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำและสภาพเย็นจัดได้ (Kariola *et al.*, 2006)

แม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับยีนทนแล้งจะมีอยู่ก็ตาม แต่ก็มียู้อย่างจำกัด ส่วนมากเป็นรายงานการศึกษาจากต่างประเทศ ด้วยเหตุนี้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการหาหน้าที่ของยีน ERD15 ในสภาวะที่เกิด gene silencing ที่มีผลในเชิงสรีรวิทยาต่อการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของพืชต้นแบบ (ยาสูบ) ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการได้มาซึ่งข้อมูลในด้านความทนแล้งและกับการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในประเทศต่อไปในอนาคต

พืชมีการปรับตัวทางสรีรวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองปรับตัวและมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆได้ เช่น ขาดน้ำหรือแห้งแล้ง เป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนา

หรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น ต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดี่ยวหรือกลุ่มยีนส์ (ยีนหลายๆ ชนิดพร้อมกันในสภาวะเดียวกัน) จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ที่ผ่านมานักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยวิธีการเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้

ในประเทศไทย พืชข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย นับเป็นฐานพันธุ์กรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดี รวมทั้งข้าวโพดเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อถ่ายฝากยีน ERD15 ที่อยู่ในรูป RNAi เข้าสู่พืชต้นแบบ และเพื่อศึกษาระดับความทนแล้งของพืชต้นแบบ (ยาสูบ) ภายหลังจากการถ่ายฝากยีน ERD15 เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งได้ต่อไปในอนาคต ทำให้งานวิจัยนี้สามารถให้ข้อมูลในรูปยีนที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรของประเทศไทยได้

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. สืบค้นข้อมูลยีน ERD15 ของพืชชนิดต่างๆ ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ERD15 จากฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI เพื่อใช้ในการออกแบบส่วนของยีน ERD15 ที่สามารถขับโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pRNAi+GG (Expression Golden gate vector)

2. ออกแบบไพรเมอร์ 5'-accaggtctcaggag-gene ERD15 forward specific primers-3'
3. ออกแบบไพรเมอร์ 5'-acca ggtctc atcgt-gene ERD15 specific reverse primers-3'
4. ทำการสังเคราะห์ยีน ERD15 ที่มีปลาย 5' และ 3' เชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ Bsal (GeneArt

GeneSynthesis, Invrtrogen, USA) ขนาด 609 bp Bsal restriction site (GGTCTC)

เพราะฉะนั้น ปลาย 3' ไป 5' ของ Bsal คือ CCAGAG ตัด DNA ด้วยเอนไซม์ Bsal และ พลาสมิดดีเอ็นเอ pRNAi+GG ด้วยเอนไซม์ Bsal และเชื่อมต่อเข้ากันด้วย T4 DNA ligase ในหลอดเดียว (single tube reaction หรือ one tube reaction) จากนั้น ทำการ transformation เข้าสู่ DH5 alpha หรือ Stellar Electrocompetent Cell เพื่อเพิ่มขยายจำนวน

One tube reaction

- 50 ng PCR product หรือ ERD gene fragment synthesis (Template DNA)
- 200 ng Vector plastmid DNA (pRNAi-GG vecter)
- 5 Units Bsal Enzyme (NEB)
- 10 Units T4 DNA ligase (Promega, High concentration 20U/ul)
- 1x Ligation buffer
- Total 10 ul

ปฏิกิริยานาน 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ต่อด้วย 5 นาทีที่ 50 องศาเซลเซียส

8 นาที ที่ 80 องศาเซลเซียส (Heat inactivation) ทรานส์ฟอร์มด้วย stellar electrocompetent cells, Invitrogen โดยการเพลทงานเพาะเชื้อ LB Medium + 25 mg/L คานามัยซิน และ 5ug/L คลอแรมเฟนิคอลเพื่อคัดเลือกกรีมบีแนนต์ ตรวจสอบด้วย PCR และ DNA sequencing ใช้ไพรเมอร์ P21 P22 P23 P24 และ P25 ตาม Pu Yan et al., 2012

5. ซับโคลนยีน (gene subcloning) ERD15 ขนาด 609 bp ที่สังเคราะห์ได้ เข้าสู่คอมพิเทนต์เซลล์ *E. coli* Stellar Electrocompetent cell หรือ DH5 alpha เพื่อเก็บไว้เป็นแบคทีเรียสต็อก ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ตามคู่มือผู้ผลิต

6. ตรวจสอบความถูกต้องของยีน ERD15 ตามตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ (restriction sites) เช่น ด้วยการใช้เอนไซม์ BsaI และด้วยการหาลำดับเบส (sequencing) เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับ Similarity Blast search ก่อนทำการตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด RNAi vector (pRNAi vector)

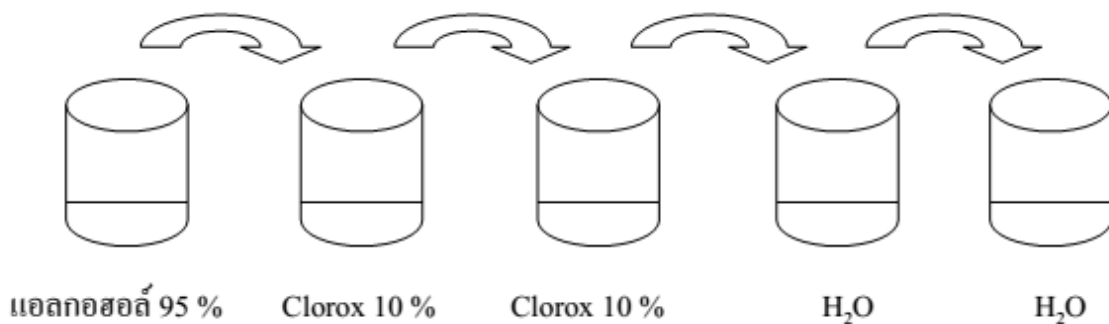
7. เตรียมยีนและพลาสมิดในรูป RNAi (pRNAiGG + ERD15) หรือที่เรียกว่า พลาสมิดคอนสตรัคต์ pRNAiGG+ERD15 Constructs ทำการทรานส์ฟอร์ม พลาสมิดคอนสตรัคต์เข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* (Stellar Electrocompetent cells) ด้วยวิธีการยิงยีน ที่สภาวะ 2-2.5 K, 25 μ F 200 โอห์ม บนอาหาร และ ตรวจสอบรีคอมบีแนนต์ (recombinants) ด้วยวิธีการหาลำดับเบส (5 คู่ไพรเมอร์) ตามขั้นตอนดังนี้ นำ competent cells ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก -80 องศาเซลเซียส มาละลายในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำพลาสมิด pRNAiGG + ERD15 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาใส่ลงในหลอด competent cells ผสมกันให้เข้ากัน เปรี้ยว นำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 - 30 นาทีที่ดูส่วนผสมที่ได้จากข้อ 3 มาใส่ลงใน cuvette ขนาด 0.2 ซม. จากนั้น เคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยใช้สภาวะ (Conditions) ตามคำแนะนำของบริษัท / คู่มือผู้ผลิต (Biorad- Gene Pulser) ดังนี้

- | | |
|---------------|-----------------|
| a. Cuvette | 0.2 cm |
| b. Voltage | 2.5 kV |
| c. Capacity | 25 μ F |
| d. Resistance | 360 - 480 โอห์ม |

ก่อน pulse เช็ด cuvette ให้แห้ง อย่าให้มีฟองอากาศเด็ดขาด หลัง pulse แล้ว เติมหาอาหาร YEP (ไม่เติมปฏิชีวนะ) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วย้ายส่วนผสมลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ นำไปวางไว้บนน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 220 rpm เป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เทอาหารเหลวทิ้ง แล้วเติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไป Spread plate บนอาหารแข็ง + rifam YEP (control) + rifam และบนอาหารแข็ง YEP + rifam + kanamycin เพลทละ 80 ไมโครลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 วัน แล้วนำโคโลนีที่เจริญ เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มาตรวจสอบหายีนด้วย ไพรเมอร์ Forward และ Reverse primers (colony PCR)

8. เตรียมต้นยาสูบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

8.1 การเพาะเมล็ดยาสูบ



ขั้นตอนการปฏิบัติ (ทุกอย่างทำในตู้ปลอดเชื้อ)

- ห่อเมล็ดยาสูบด้วยผ้าขาวบาง
- เตรียมขวดตามลำดับ
- นำปากคีบลงไฟที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ ทิ้งไว้ให้เย็น
- ใช้ปากคีบ คีบห่อเมล็ดยาสูบลงไปในขวดที่เตรียมไว้
- ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 % 5 นาที เขย่าขวดด้วยมือ
- ล้างด้วย Clorox 10 % ครั้งละ 10 นาที 2 ครั้ง เขย่าขวดด้วยมือ
- ล้างด้วย H₂O ครั้งละ 5 นาที 2 ครั้ง เขย่าขวดด้วยมือ
- ใช้ปากคีบ คีบห่อเมล็ดยาสูบออกจากขวด วางลงในจานอาหาร (Plate) ที่มีกระดาษทิชชู

เพื่อซับน้ำ

- เปิดผ้าขาวบางออก ผึ่งเมล็ด
- นำปากคีบ คีบเมล็ดวางบนขวดอาหาร MS
- ปิดฝาขวดวางในที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- เมล็ดใช้เวลาออก 1 เดือน
- ทำการย้ายใส่ขวดอาหารใหม่ เพื่อลดการปนเปื้อน จากขวดเพาะเมล็ดที่เม่งอก
- รोजनต้นยาสูบโต แล้วทำในขั้นตอนต่อไป

- หมายเหตุ :
1. ปากคีบต้องลงไฟและทิ้งไว้ให้เย็นทุกครั้ง
 2. ก่อนเปิดและปิดฝาขวด ต้องลงไฟที่คอขวดทุกครั้ง

9. เตรียมเชื้ออะโกราแบคทีเรีย ซึ่งมี origin of replication ต่ำกว่า E. coli เพื่อเตรียมไว้ใช้ในการถ่ายฝากยีนด้วยวิธีการ Electrotransformation

10. ถ่ายฝากยีนด้วยวิธีการ ยิงยีน (ELECTROMAX LBA4404) และตรวจสอบการถ่ายฝากยีน เปรียบเทียบกับการทำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่ได้ทำการถ่ายฝากยีน (control)

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การโคลนชิ้นยีน ERD15 โดยการออกแบบและสังเคราะห์ยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pUC19

โดยได้ชิ้นยีน ERD15 Fragment จากการออกแบบและสังเคราะห์ (ORF 609 คู่เบส) เพื่อโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pUC19 และถ่ายฝากเข้าสู่ Stellar Electrocompetent cells เพื่อเพิ่มขยายจำนวน โดยได้ออกแบบไพรเมอร์ที่ด้านปลาย 5' (5'-end) ที่เติม protective bases-adapters สำหรับ pRNAi-GG (5'-protective abases adapters -Bsal- ORF (ERD open reading frame)-Bsal -Protective bases adapters - 3') (ภาพที่ 1) ตามด้วย gene specific sequences-3' ที่ปลาย 3' (3'-end) (ภาพที่ 2) เมื่อทำการหาลำดับเบสของ pRNAi คอนสตรัคส์และเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ได้ผลดังภาพที่ 3

5-Bsal-

```
ATGGCGTTAGTTTCAGGAGGAAGGTCGACACTGAATCCGAATGC
ACCTCTTTTCATCCCGTCTTATGTGCGTCAAGTGGAGGACTTTTCA
CCCGAATGGTGGAAATTTGGTGACAACCTTCGACATGGTTCCATGAT
TATTGGACGAGGCAGCATCAAGGAGAGGAATATGGCGATGATGC
TTTTGGTTTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTGCTTCCGAAAAT
ATCGATCTTGATGTTGATGAAGATATTTGAACATGGAAGCTCAGT
TTGAAGAATTCCTCCAATCATCTGAAAGTGAACAACAAGGAATCA
AGTCATCACCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTATATAT
CTCCATTATCTTACAATTATAGTCATGATAGTGATAGAGCCACAAAT
TTATACTAGGGGATTCAAAAAGTATACTGACCAAGGGTTCGGAGGC
ACTCGTAAGGACACTGAGCATATCAAAGGGGCCAAAATCTCCCAT
TGAGCCACCAAAGTACTATGAGAAACCAGCAAAGATTGTTAGCC
CAAAGAACAGCCTTCGCCGCATCCAGCAACCTCGCTAA-Bsal-3'
```

ภาพที่ 1. แสดงลำดับเบสของยีน ERD15 ที่เติมจุดตัดเอนไซม์ Bsal ที่ด้านปลาย 5' และ 3' -lhpRNAiERD15 construct

5' -ACCA GGT CTC AGGAG

```
ATGGCGTTAGTTTCAGGAGGAAGGTCGACACTGAATCCGAATGCACCTCTTTTCATCCCGTCTTATGTGCGTCAA
GTGGAGGACTTTTCACCCGAATGGTGGAAATTTGGTGACAACCTTCGACATGGTTCCATGATTATTGGACGAGGCAG
CATCAAGGAGAGGAATATGGCGATGATGCTTTTGGTTTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTGCTTCCGAAAAT
ATCGATCTTGATGTTGATGAAGATATTTGAACATGGAAGCTCAGTTTGAAGAATTCCTCCAATCATCTGAAAGT
GAACAACAAGGAATCAAGTCATCACCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTATATATCTCCATTATCTT
ACAATTATAGTCATGATAGTGATAGAGCCACAAATTTATACTAGGGGATTCAAAAAGTATACTGACCAAGGGTTCG
GAGGCACTCGTAAGGACACTGAGCATATCAAAGGGGCCAAAATCTCCCATTGAGCCACCAAAGTACTATGAGAAA
CCAGCAAAGATTGTTAGCCCAAAGAACAGCCTTCGCCGCATCCAGCAACCTCGCTAAACGATGAGACCTGGT-3'
```

ภาพที่ 2. แสดง lhpRNAiERD15 construct ที่ประกอบด้วยลำดับไพรเมอร์ที่ด้านปลาย 5' (5'-end) และ 3' (3'-end) ที่เติม protective bases-adapters สำหรับ pRNAi-GG (5'-protective abases adapters -Bsal- ORF (ERD open reading frame)-Bsal -Protective bases adapters - 3') ทั้งนี้ Bsal มีจุดตัด GGTCTC

Other reports: [Search Summary](#) [[Taxonomy reports](#)] [[Distance tree of results](#)]

Graphic Summary

Distribution of 108 Blast Hits on the Query Sequence

NM_001202798 Arabidopsis thaliana dehydration-induced protein ERD15 ... S=214 E=1.1e-51

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Red
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Magenta
>=200	Dark Blue

Descriptions

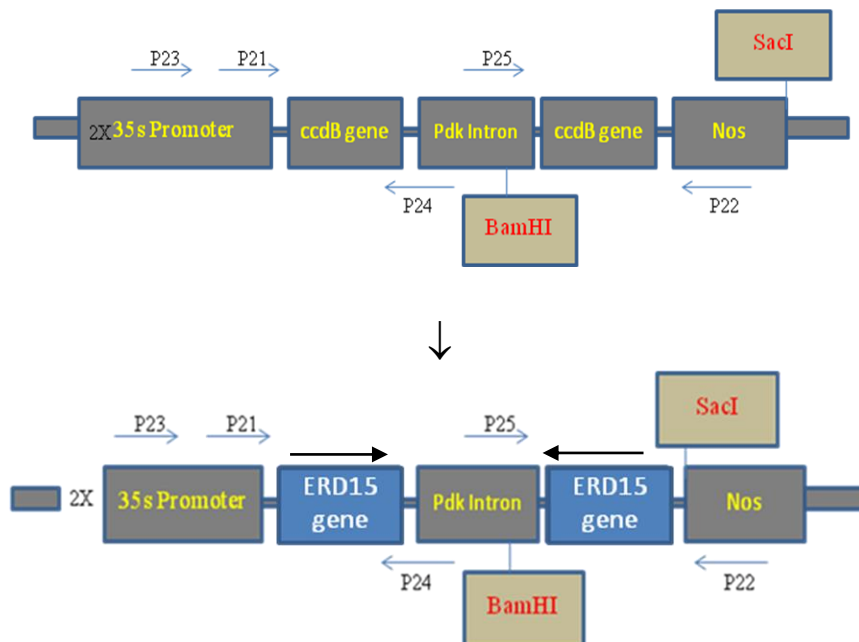
Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Brassica napus</i> ERD15 protein (ERD15) mRNA, complete cds	542	542	93%	2e-150	99%	GU189587.1
PREDICTED: <i>Brassica napus</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106391682), mRNA	538	538	93%	2e-149	98%	XM_013832358.1
PREDICTED: <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106342874), transcript variant X1	538	538	93%	2e-149	98%	XM_013781925.1
<i>Brassica rapa</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC103865885), mRNA	515	515	93%	2e-142	97%	NM_001301910.1
PREDICTED: <i>Brassica napus</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106431116), transcript variant X2, mRNA	511	511	93%	3e-141	96%	XM_013871929.1
PREDICTED: <i>Brassica napus</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106431116), transcript variant X1, mRNA	511	511	93%	3e-141	96%	XM_013871928.1
PREDICTED: <i>Brassica napus</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106447547), transcript variant X2, mRNA	511	511	93%	3e-141	96%	XM_013889495.1
PREDICTED: <i>Brassica napus</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106447547), transcript variant X1, mRNA	511	511	93%	3e-141	96%	XM_013889494.1
PREDICTED: <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106342874), transcript variant X2	511	511	93%	3e-141	96%	XM_013781926.1
PREDICTED: <i>Brassica rapa</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC103865885), mRNA	509	509	90%	1e-140	98%	XM_009143743.1
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> clone K9H009104, complete sequence	450	516	90%	9e-123	98%	AC189568.2
PREDICTED: <i>Brassica rapa</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC103857883), mRNA	295	295	90%	4e-76	81%	XM_009135245.1
<i>Eutrema salsugineum</i> hypothetical protein (EUTSA_v10017353m) mRNA, complete cds	295	295	88%	4e-76	80%	XM_006411346.1
<i>Eutrema salsugineum</i> hypothetical protein (EUTSA_v10017353m) mRNA, complete cds	295	295	88%	4e-76	80%	XM_006411345.1
<i>Thellungiella halophila</i> mRNA, complete cds, clone: RTFL01-22-O13	295	295	88%	4e-76	80%	AK353238.1
PREDICTED: <i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106335515), mRNA	291	291	89%	5e-75	81%	XM_013774056.1
PREDICTED: <i>Brassica napus</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106437989), mRNA	289	289	90%	2e-74	81%	XM_013879020.1
<i>Brassica luncea</i> clone 672 ERD15 mRNA, partial sequence	289	289	90%	2e-74	81%	KM403604.1
PREDICTED: <i>Brassica napus</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC106352795), mRNA	279	279	89%	3e-71	80%	XM_013792427.1
PREDICTED: <i>Camelina sativa</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104793054), transcript variant X2, mRNA	246	246	88%	2e-61	76%	XM_010519336.1
PREDICTED: <i>Camelina sativa</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104793054), transcript variant X1, mRNA	246	246	88%	2e-61	76%	XM_010519335.1
<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> clone K9B086M08, complete sequence	244	301	70%	7e-61	88%	AC232531.1
PREDICTED: <i>Camelina sativa</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104782630), transcript variant X2, mRNA	241	241	89%	8e-60	76%	XM_010507622.1
PREDICTED: <i>Camelina sativa</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104782630), transcript variant X1, mRNA	241	241	89%	8e-60	76%	XM_010507621.1
<i>Capsella rubella</i> hypothetical protein (CARUB_v10024218m) mRNA, complete cds	241	241	89%	8e-60	77%	XM_006295083.1
PREDICTED: <i>Camelina sativa</i> protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104785239), mRNA	239	239	87%	3e-59	76%	XM_010510417.1
<i>Capsella rubella</i> hypothetical protein (CARUB_v10024225m) mRNA, complete cds	233	233	89%	1e-57	76%	XM_006295088.1
<i>Capsella rubella</i> hypothetical protein (CARUB_v10024225m) mRNA, complete cds	219	219	88%	3e-53	76%	XM_002879884.1

ภาพที่ 3. แสดงผลที่ได้จากการทำ blast search ระหว่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ lhpRNAiERD15 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ERD15 ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล

2. การสร้างคาสเซตต์ของ pRNAiERD15

การสร้างคาสเซตต์ของ pRNAiERD15 จากยีน *ccdB* คอนสตรัคส์ โดย (ภาพที่ 4) แสดงคาสเซตต์หรือคอนสตรัคส์ของ ERD15 ที่แทนที่ *ccdB* lethal gene ในทิศทาง sense และ antisense ที่ประกอบด้วย 35s Promoter; Pdk Intron และ Nos terminator และตรวจสอบทิศทางโคลนคาสเซตต์ของ ERD15 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*BsaI*) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4. แสดงแผนภาพคอนสตรัคส์ของ ERD15 ที่แทนที่ *ccdB* lethal gene ในทิศทาง sense และ antisense ที่ประกอบด้วย 35s Promoter; Pdk Intron และ Nos terminator 100 bp ERD15



ภาพที่ 5. ภาพอะกาโรสเจลแสดงการเชื่อมต่อพลาสมิด pRNAi เข้ากับยีน ERD15 และการตัดพลาสมิด pRNAi+ERD15 คอนสตรัคส์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ

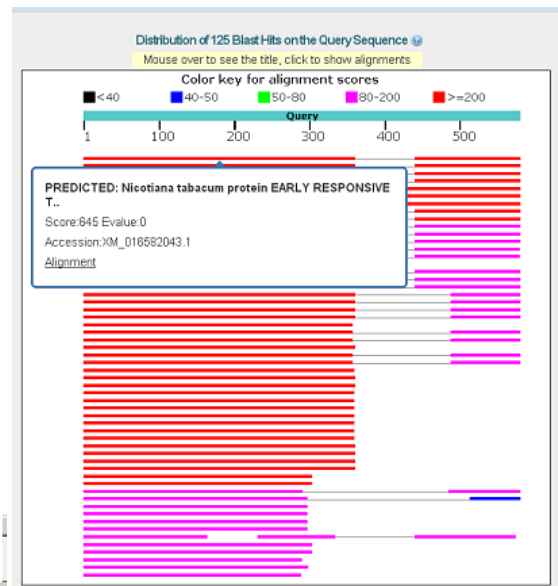
3. การหาลำดับเบสเพื่อยืนยันความถูกต้องของยีนและเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI)

ผลการทำ blast search พบว่า match กับยีน Early responsive to dehydration ของพืช *Nicotiana tabacum* (100% identity), *Nicotiana glauca* (100% identity), *Nicotiana glauca* (100% identity), *Nicotiana glauca* (100% identity), *Nicotiana glauca* (95% identity), *Capsicum annuum* (90% identity), *Solanum pennellii* (83% identity), *Solanum lycopersicum*, (83% identity), *Arabidopsis thaliana* (76% identity), *Glycine max* (70% identity) และ *Balsamifera populus* (70% identity) ตามลำดับ ผลการหาลำดับเบสของพลาสมิด pRNAi-GG ด้วยไพรเมอร์ P22

(ก.)

```
>141844_plasmid16_P22_D06
CTCTAGATCCATACCAAGTCTCAGGAGATGGCGTGTAGTTTCAGGAGGAAGTCGACACTGAATCCGAATGCACCTCTTTT
CATCCCGCTTATGTGCGTCAAGTGGAGACTTTCCACCAGATGGTGAATTTGGTGACAATCCGACATGGTTCATG
ATTATTGGACAGGACGACATCAAGGAGGAATATGGCGATGATGCTTTTGGTTTACTGGGAATGATTTGCTGACCTG
CTTCCCGAAAATATCGATCTTGTATGATGAAGATATTTGAACAATGGAACTCAGTTTGAAGAAATCCCTCAATCATC
TGAAAGTGAACAACAAAGAAATCAAGTCAATCACCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTATATATCTCCATATC
TTACAATATATAGTCATGATAGTATAGAGCCAAATTTATACTAGGGGATTCAAAAGTACTGACCAAGGGTTCCGAG
GCATCGTAGGACACTGAGCATACAAAGGGGCCAAATCTCCCATTTGAGCCACCAAGTACTATGAGAAACGACAAA
GATTGTGATCCCAAGAACAGCCTTCGGCCATCCAGCAACCTCGCACGATGAGACCTGGTATTTGGATCGGATCCCGGGC
CGGTGACTGCAGAGCCCTGCATCAAGCTTGGTGAATCAGTGGTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTC
ACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGTAACTCAATTAAT
TGCGTTGCGCTCACTCCGCCCTTCCAGTCCGGAACCTGCGTCCGAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGA
GAGCGGTTTGGTATTTGGCGCTCTCCGCTTCCGCTCAGTACTGCTGCGCTGGCTGGCTGGCTGGCGGCGGAGCG
GTATCAGCTCACTCAAAGGGGTAATACGGTTATCCACAGAAACAGGGGATACCGAGAAAGAACATGTAGCAAAAGG
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGAGCGCGGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACA
AAAATCAGCTCAAGTCAAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGTACCAGCGGTTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTC
GTGGCTCTCCTGTTCCGACCTCGCGCTTACGGATACCTGTCGCGCTTTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCA
TAGCTCAGCTAGGATATCTCACTGCGGTAGTGTGCTGCTCCAGCTGGGCTCTAGATCATACCAAGCTCAGG
AGATGGCGTTAGTTTTCAGGAGGAGGTGCACACTGAATCCGAATGCACCTTTTCAATCCGCTTATGTCGCTCAAGT
GAGGACTTTTCCACCGAATGGTGAATTTGGTGACAATCGACATGGTTCATGATTTGAGCAGGCGAGCATCAAGG
AGAGGAATATGGCGATGATGCTTTTGGTTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTCCCGAAAATATCGATCTTGAATG
TTGATGAAGATATTTGAACATGGAAGCTCAGTTGAAGAAATTCCTCAATCATCTGAAAGTGAACAACAAAGAAATCAAG
TCAATCCACTATGGTATCAGTGTATGCTTCTATTTGGTATATATCTCCATATCTACAAATATAGTCATGATGAT
AGAGCCCAAAATTTATACTAGGCGATTCAAAAGTACTGACCAAGGGTTCGGAGGCACTGTAAGGACACTGAGCATAT
CAAAGGGCCAAAATCTCCCATTTAGCCACCAAGTACTATGAGAAACAGCAAGATTGTTAGCCAAAGAACACGCTT
CGCCGCTCAGCAACCTCGCACGATGAGACCTGGTATGGATCGGAATCCCGGCCGCTGACTGCAAGGCGTGCATGC
AAGTTGGTGAATCATGGCTATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTTCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCG
GAGCATAAAGTGAAGCTCGGGTGCCTAATGAGTGAAGTCACTCAATTAATGCGTGGCTCACTCCCGCTTTC
CGTCCGGAACCTGCTCGCTGCTGATTAATGAATCGCCAACGCGCGGGAGGCGGTTGCTGATTGGGCGCTC
TTCGCTTCTCGCTCACTGACTGCTGCGCTGCTGCTGCTGCGCGGCGGCTGACTGACTCAAAAGCGGTA
TAGGGTATCCACAAGATCAGGGGATAAGCGAAGAAACATGTGACCAAAAGCCAGCAAAAGCCAGGAACCTAAA
AAGCCCGGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAATTCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
CGCAAAACCGCAGGACTATAAAGTACCAAGGCTTTCCCGCTGGAAGCTCCCTGCTGGCTCCTCTGTCGACCTCCG
CGCTTCCGGATACCTGTCGCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGTATCTCAGT
TCGGGGAGGTCGTCGCTCAAGCTGGCTGGTGCACGAACCCCGC
```

(ข.)



(ค.)

Description	score	score	cover	value	num	Accession
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107763558), transcript variant X1, mRNA	645	904	86%	0.0	99%	XM_016582043.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC104249802), transcript variant X1, mRNA	645	904	86%	0.0	99%	XM_008908052.1
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107763558), transcript variant X2, mRNA	618	877	83%	6e-173	100%	XM_016582044.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC104249802), transcript variant X2, mRNA	618	877	83%	6e-173	100%	XM_008908053.1
Solanum pennellii chromosome.ch04, complete genome	610	610	100%	9e-171	83%	H0975443.1
Solanum lycopersicum chromosome.ch04, complete genome	605	605	100%	4e-169	83%	H0975516.1
Solanum lycopersicum cDNA clone: LEFL1080DF03, HTC in leaf	601	601	100%	5e-168	83%	AK247855.1
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104114318), mRNA	536	754	83%	2e-148	95%	XM_008624730.2
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107831960), mRNA	531	749	83%	7e-147	94%	XM_016689754.1
PREDICTED: Solanum tuberosum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC102602203), mRNA	461	658	83%	1e-125	90%	XM_006357970.2
PREDICTED: Solanum pennellii protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC107018091), transcript variant X2, mRNA	459	648	83%	4e-125	90%	XM_015218464.1
PREDICTED: Solanum pennellii protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC107018091), transcript variant X1, mRNA	459	648	83%	4e-125	90%	XM_015218463.1
PREDICTED: Capsicum annuum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107669991), mRNA	457	635	82%	1e-124	90%	XM_016716361.1
Capsicum annuum ERD15 mRNA, complete cds	457	635	82%	1e-124	90%	DQ267932.1
PREDICTED: Capsicum annuum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107857836), mRNA	452	452	61%	6e-123	88%	XM_016702638.1
PREDICTED: Solanum lycopersicum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC101253770), transcript variant X2, mRNA	443	622	83%	3e-120	89%	XM_010320839.1
PREDICTED: Solanum lycopersicum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (LOC101253770), transcript variant X1, mRNA	443	622	83%	3e-120	89%	XM_010320837.1
Solanum lycopersicum cDNA clone: LEFL1093CD01, HTC in leaf	443	622	83%	3e-120	89%	AK325230.1
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104091000), transcript variant X2, mRNA	342	444	78%	7e-90	81%	XM_009596242.2
PREDICTED: Nicotiana tomentosiformis protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104091000), transcript variant X1, mRNA	342	444	78%	7e-90	81%	XM_009596241.2
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107818008), mRNA	342	444	78%	7e-90	81%	XM_016641670.1
Nicotiana tabacum early responsive to dehydration 1 protein (ERD1) mRNA, complete cds	342	444	78%	7e-90	81%	GU144573.1
Solanum tuberosum clone: SIDT31, dehydration-induced protein ERD15 mRNA, complete cds	331	331	61%	1e-86	80%	J0883413.1
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107778052), transcript variant X2, mRNA	327	420	77%	2e-85	80%	XM_016599398.1
PREDICTED: Nicotiana tabacum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107778052), transcript variant X1, mRNA	327	420	77%	2e-85	80%	XM_016599397.1
PREDICTED: Solanum tuberosum protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC102604076), mRNA	327	327	61%	2e-85	79%	XM_006351223.2
PREDICTED: Nicotiana sylvestris protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104221563), transcript variant X2, mRNA	327	420	77%	2e-85	80%	XM_008722628.1
PREDICTED: Nicotiana sylvestris protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC104221563), transcript variant X1, mRNA	327	420	77%	2e-85	80%	XM_008722627.1
Solanum pennellii chromosome.ch10, complete genome	325	325	61%	6e-85	79%	H0975449.1
PREDICTED: Solanum pennellii protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107002417), transcript variant X2, mRNA	324	324	61%	2e-84	79%	XM_015200440.1
PREDICTED: Solanum pennellii protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107002417), transcript variant X1, mRNA	324	324	61%	2e-84	79%	XM_015200439.1
Solanum lycopersicum chromosome.ch10, complete genome	322	322	61%	7e-84	79%	H0975522.1

ภาพที่ 6. แสดงผลการหาลำดับเบสของพลาสมิด pRNAi-GG ด้วยไพรเมอร์ P22 (ก) จากการ match จากการ ทำ blast search ของยีน ERD15 เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI database ค่า alignment scores ของลำดับเบสยีน ERD15 เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (ข) และ ค่า sequences producing significant alignments ของ alignment scores (ค) แสดง

4. การทำทรานส์ฟอร์มเมชัน

การทำทรานส์ฟอร์มเมชันของแฟรกเมนต์ ERD15 เข้าสู่เชื้อ อีโคไล (E.coli) ชนิด Electrocompetent cells (ให้ผลตามข้อ 6) ทำกลีเซอรอลสต็อกเพื่อเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสไว้ใช้ต่อไป แล้วทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการถ่ายฝากเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชต่อไป โดยการสกัดแยกไบนารีเวคเตอร์ที่เตรียมไว้แล้ว (ภาพที่ 7) เมื่อทำการหาลำดับเบสของยีน ERD15 จากจำนวน 17 โคโลนี พบว่ามี 4 โคโลนี ได้แก่ โคโลนี S1, S4, S10 และ S11 ที่ให้ผลเป็นยีน ERD15 (ภาพที่ 8) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคโลนี S1, S4, S10 และ S11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (blastx) ลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับกรดอะมิโน (ภาพที่ 9) แล้วทำออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการหา gene fragments ที่เชื่อมต่อเข้ากับไบนารีเวคเตอร์ (one tube restriction-ligation reaction) เมื่อทำการทรานส์ฟอร์มเมชันแล้ว (ตารางที่ 1) ตำแหน่งของไพรเมอร์ P21, P22, P23, P24 และ P25 ตำแหน่งยีนของคอนสตรัคส์ที่ใช้ในการตรวจสอบทิศทางของคอนสตรัคส์ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 7. แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอของไบนารีเวคเตอร์



ภาพที่ 8. แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก pRNAiGG+ERD15 ได้แก่ S1, S4, S10 และ S11

ตารางที่ 1. แสดงรายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบสรีคอมบิแนนต์ยีน ERD คอนสตรัคส์

Primer Sequence (5'- 3' description)		
P21	accatttacgaacgatagcc	For Recombinants identification
P22*	gtaaaacgacggccagtg	For Recombinants identification and sequencing
P23	cgaatctcaagcaatcaagc	For Recombinants sequencing
P24	cattttagcttccttagctcc	For Recombinants and intron orientation identification
P25	catttgattgattacagttgg	For Recombinants and intron orientation identification
หมายเหตุ		ทุกรีคอมบิแนนต์ ยืนยันผลการหาลำดับเบสและตรวจสอบทิศทางและการทำ Blast searching

>S1

CGGGATCCGATCCAAN TACCAGGTCTCATCGTGCAGAGTTGCG N GGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGGCTAACAACTCT
 TGCTGGTTTTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTGGCCCCCTTGATATGCTCAGTGCCTTACGAGTGCCT
 CCGAACCTTTGATCAGTATACTTTGAATCCCCTAGTATAAAATTTGTGGCTCTATCACTATCATGACTATAAATTTGAAGA
 TAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGTGACTTTGATTCTTGTGTTCACTTTTCA
 TGATTGGAGGAATTTCTCAAACCTGAGCTTCCATGTTCAAATATCTTCATCAACATCAAGATCGATATTTCCGGAAGCA
 AGTCAGCAAAATCATTCCAGTAAAACCA

>S4

C4_M13Reverse_H01 1002 bp
 CTCTGCAGTCGACGGGC N GGGATCCGATCCAATACCAGGTCTCATCGTGCAGAGTTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCT
 TTGGGCTAACAACTTTGCTGGTTTTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTGGCCCCCTTGATATGCTCAGT
 GTCCTTACGAGTGCCTCCGAACCTTTGGTCACTATACTTTGAAATCCCCTAGTATAAAATTTGTGGCTCTATCACTATCAT
 GACTATAAATTTGAAGATAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGTGACTTTGATTCTCT
 GTTGTTCACTTTTCAAGATGATTGGAGGAATTTCTCAAACCTGAGCTTCCATGTTCAAATATCTTCATCAACATCAAGATCG
 ATATTTTCGGGAAGCAAGTCAGCAACATCATTCCAGTAAAACCAAAAGCATCATCGCCATATTCCTCTCTTGTGCTG
 CCTCGTCCAATAATCATGGAACCATGTCGAAGTTGTCACCAAATCCACCATTTCGGGTGAAAAGTCCCTCACTTGACGCA
 CATAAGACGGGATGAAAAGAGGTGCATTCCGATTCACTGTCGACCTTCTCTGAAAACCAACGCCATCTCTGAGACCTG
 GTATTGGATCTAGATGTATTTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCTTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAC
 CCTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
 TCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTA
 TTTACACCGCATATGGCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGCGATAGTTAA N N AGCCACGACACCCGTCAC N A
 CCCGCTGACGCGCCCTGACGGGTTTGTCCGCTCCCGGCATCC

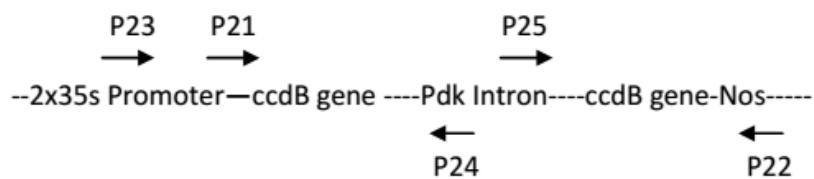
>S10

CGACGGGCCCCGGATCCGATCCAATACCAGGTCTCATCGTGCAGAGTTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGGCTA
 ACAATCTTTGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTGGCCCCCTTGATATGCTCAGTGCCTTAC
 GAGTGCCTCCGAACCTTTGGTCACTATACTTTGAAATCCCCTAGTATAAAATTTGTGGCTCTATCACTATCATGACTATAA
 TTGTAAGATAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGTGACTTTGATTCTTGTGTTCA
 CTTTCAAGATGATTGGAGGAATTTCTCAAACCTGAGCTTCCATGTTCAAATATCTTCATCAACATCAAGATCGATATTTT
 GGAAGCAAGTCAGCAACATCATTCCAGTAAAACCAAAAGCATCATCGCCATATTCCTCTCTTGTGCTGCCTCGTCC
 AATAATCATGGAACCATGTCGAAGTTGTCACCAAATTCACCATTTCGGGTGAAAAGTCCCTCACTTGACGCACATAAGAC
 GGGATGAAAAGAGGTGCATTCCGATTCACTGTCGACCTTCTCTGAAAACCAACGCCATCTCTGAGACCTGGATTGGA
 TCTAGATGTATTTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCTGCGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGT
 TACCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT
 CCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACAC
 CGCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGA
 CGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGA
 GGTTTTACCGTCACTACCGAAAACGCGCGATGCACTCTGGCCGCTGCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGAT
 AAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTAACG
 GAAAAGCTCGAGCCCGATTAATTTCAAACATGGATGCTGATTTAAATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAAATGTCGGGC
 AATCAGGTGACGCAATCTCAGTATGGATGGGAAGCCCGATGCCCCAAAATTTGTTCTGAAAACATGGCAAAGGTA N NGTT

>S11

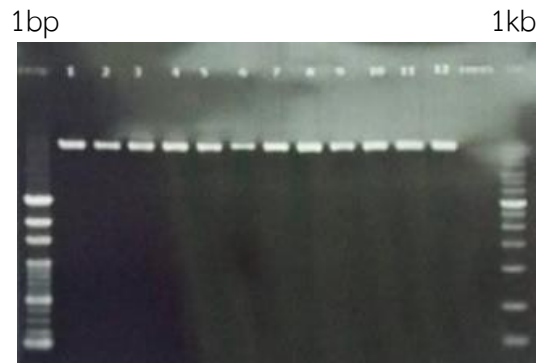
AGTCGACGGGCCCCGGATCCGATCCAATACCAGGTCTCATCGTGCAGAGTTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGG
 CTAACAATCTTTGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTGGCCCCCTTGATATGCTCAGTGCCT
 TACGAGTGCCTCCGAACCTTTGGTCACTATACTTTGAAATCCCCTAGTATAAAATTTGTGGCTCTATCACTATCATGACTA
 TAATTTGAAGATAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGTGACTTTGATTCTTGTGTTG
 TCACTTTCAGATGATTGGAGGAATTTCTCAAACCTGAGCTTCCATGTTCAAATATCTTCATCAACATCAAGATCGATATT
 TTCGGGAAGCAAGTCAGCAACATCATTCCAGTAAAACCAAAAGCATCATCGCCATATTCCTCTCTTGTGCTGCCTCG
 TCCAATAATCATGGAACCATGTCGAAGTTGTCACCAAATTCACCATTTCGGGTGAAAAGTCCCTCACTTGACGCACATAA
 GACGGGATGAAAAGAGGTGCATTCCGATTCACTGTCGACCTTCTCTGAAAACCAACGCCATCTCTGAGACCTGGATT
 GGATCTAGATGTATTTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCTTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGG
 CGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCC
 CTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCA
 CACCGCATATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTGATGCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
 TGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC
 AAAGGTTTTACCGTCACTACCGAAAACGCGCGATGCACTCTGGCCGCTGCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAA
 GATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTA
 ACGGGAACGTCGAGGCCCGATTAATTTCAAACATGGATGCTGATTTAAATGGGATAAATGGGCTCGCGATAAATGTCGG
 GCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGGATGGGAAGCCCGATGCCCCAAAATTTGTTT

ภาพที่ 9 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน S1, S4, S10 และ S11



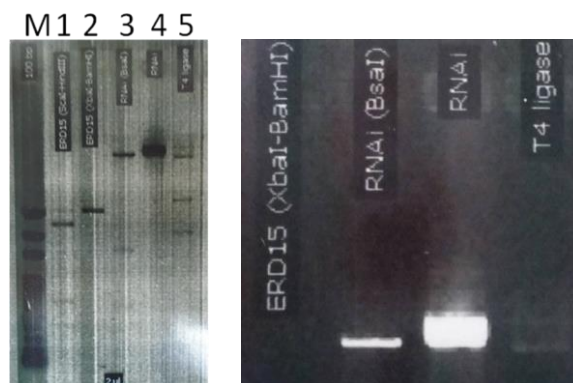
ภาพที่ 10. แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบสที่ตำแหน่งของยีน ERD15 คอนสตรัคส์

การเลี้ยงเชื้อของเซลล์และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอของเวกเตอร์ p-RNAi-GG (kanamycin resistant) ทำการหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R พบว่าเป็นเวกเตอร์ที่ถูกต้องจากจำนวน 12 โคลนี (Forward และ Reverse) รวมเป็น 24 reactions (100% match) ยกตัวอย่าง 5 โคลนีแรก มีลำดับเบสที่ match กับ pRNAi-GG (Gene Bank Accession no. JQ085427) ภาพที่ 11 สำหรับการตัดยีน ERD15 ที่ได้จากการทำทรานส์ฟอร์เมชัน ตรวจสอบความถูกต้องของยีน จำนวน 8 โคลนี ทั้งทิศทาง 5' และ 3' ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะดังต่อไปนี้ (เลขที่ 1; SacI-HindIII), (เลขที่ 2; XbaI-BamHI), RNAi (เลขที่ 3; ตัดด้วย BsaI), (เลขที่ 4; RNAi loading) และ (เลขที่ 5; RNAi+T4 DNA ligase) เพื่อทำการทรานส์ฟอร์เมชัน ได้ผล ดังต่อไปนี้ (M: DNA ladder 100 bp) (ภาพที่ 12ก)

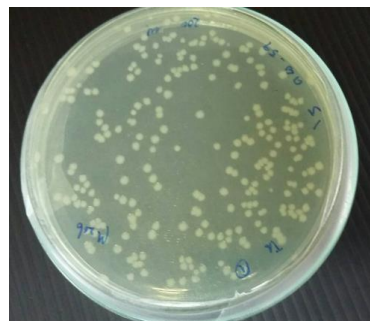


ภาพที่ 11. แสดง 5 โคลนีแรก มีลำดับเบสที่ match กับ pRNAi-GG (Gene Bank Accession no. JQ085427)

(ก)



(ข)



ภาพที่ 12. (ก) แสดงการตัดยีน ERD15 ที่ได้จากการทำทรานส์ฟอร์เมชันด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ การเชื่อมต่อกับ T4 DNA ligase และ pRNAi loading (ข) แสดงโคลนีที่ปรากฏภายหลังการทำทรานส์ฟอร์เมชันยีน ERD15 + T4 DNA ligase ด้วยปฏิกิริยา one-tube ligation reaction system

การทำทรานส์ฟอร์เมชัน plasmid pRNAi+GG expression vector ซึ่งประกอบด้วยยีน *ccdB* ในคอนสตรัคส์ (ทิศทาง sense และ anti-sense) เข้าสู่ อะโบริแบคทีเรีย *Escherichia coli* LBA4404 และถ่ายฝากเข้าสู่พืชยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ทำการทดลอง 2 ครั้ง ผลการทดลองให้ผลตามทฤษฎีคือ ต้นยาสูบไม่สามารถเติบโตได้ ดังนั้น จึงพิสูจน์ได้ว่า การใส่คอนสตรัคส์ pRNAi+GG เข้าสู่คอนสตรัคส์ pRNAi+GG ซึ่งประกอบด้วยยีน *ccdB* ซึ่งเป็น lethal gene ต่ออะโบริแบคทีเรีย *Escherichia coli* LBA4404 ประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ตาม หากต้องการทดสอบการทรานส์ฟอร์เมชันคอนสตรัคส์ ยีน ERD15+plasmid RNAi+GG เข้าสู่ต้นยาสูบ อาจทดสอบด้วยอะโบริแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่ประกอบด้วยยีน *ccdB* นอกเหนือจาก LBA4404 แล้วศึกษาการเติบโตของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีนต่อไป ซึ่งเป็นคำแนะนำที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จากการทดลองเบื้องต้น ได้สุ่มทดสอบนำคอนสตรัคส์ (ภาพที่ 13) pRNAiGG+ERD15 เข้าสู่ LBA4404 และทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ อยู่ระหว่างทำการสุ่มโคลน คอนสตรัคส์เพื่อทรานส์ฟอร์มต่อไป คำแนะนำคือ อาจเปลี่ยนไปใช้อะโบริแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น หรือ สุ่ม pRNAiGG+ERD15 เพิ่มเติมที่ได้จากการทำทรานส์ฟอร์เมชันก่อนหน้านี้ และภาพที่ 14 ผลการ MATCH ของยีน ERD15 จาก pRNAi ควบคุม เทียบกับยีน ERD15 ของต้นยาสูบที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพ

```
COLONY 1
CGGGATCCGATCCAANTACCAGGTCTCATCGTGCAGGTTGCGGGATGCGGCGAAGGCTGTTCTTTGGGCTAACAACTTT
TGCTGGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTTGGCCCTTTGATATGCTCAGTGTCTTACGAGTGCCT
CCGAACCCCTTGGTCAGTATACTTTTGAATCCCTAGTATAAAATTTGTGGCTCTATCACTATCATGACTATAATTGTAAGA
TAATGGAGATATATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGATGACTTGCCTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTG
TGATTTGGAGGAATTTCTCAAACCTGAGCTTCCATGTTTCAAAATATCTTTCATCAACATCAAGATCGATATTTTCCGGAAGCA
AGTCAGCAAATCATTTCCAGTAAACCCA
COLONY 4
CTCTGCAGTCGACGGGCGGGATCCGATCCAANTACCAGGTCTCATCGTGCAGGTTGCTGGATGCGGCGAAGGCTGTTCT
TTGGGCTAACAACTTTTGTGTTTCTCATAGTACTTTGGTGGCTCAATGGGAGATTTTGGCCCTTTGATATGCTCAGT
GTCCTTACGAGTGCCTCCGAACCCCTTGGTCAGTATACTTTTGAATCCCTAGTATAAAATTTGTGGCTCTATCACTATCAT
GACTATAATTGTAAGATAAATGGAGATAATACCAAATAGAAGCATACCACTGATACCATAGGGTGATGACTTGCCTTGTGTT
GTTGTTTCACTTTTCAGATGATTTGGAGGAATTTCTCAAACCTGAGCTTCCATGTTTCAAAATATCTTTCATCAACATCAAGATCG
ATATTTTCCGGGAGCAAGTCAGCAACATCATTTCCAGTAAACCAAAAGCATCATCGCCATATTCCTCTCCTTGTGTTGCTG
CCTCGTCAATAATCATGGAACCATGTCGAAGTTGTCACCAAATTCACCATTCGGGTGAAAAGTCTTCCACTTGACGCA
CATAAGACGGGATGAAAGAGGTTGATTCGGATTCAGTGTGACCTTCTTCTGAAACTAACGCCATCTCCTGAGACCTG
GTATTTGGATCTAGATGTATTTCGGAGGTTACCGAGCTCGAATTTCTGCGGCTGCTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAAC
CCTGGCCTTACCCCAACTTAATCGCTTTCAGCACATCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAAATAGCGAAGAGGCCCGCCACCGA
TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
TTTACACCCGCATATGGCGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCGGCATAGTTAANCNAGCCACGACACCCGTCACNA
CCCGTGCAGCGCCCTGACGGGTTTGTCCGCTCCCGCATCC
```

ภาพที่ 13. โคลน ERD15+plasmid RNAi+GG ที่สุ่มได้จากเพลทจานเพาะเลี้ยงภายหลังการทรานส์ฟอร์เมชัน

PREDICTED: *Nicotiana tabacum* protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107763558), transcript variant X1, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_016582043.1

[GenBank Graphics](#)

>gi|1025403043|ref|XM_016582043.1| PREDICTED: *Nicotiana tabacum* protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like (LOC107763558), transcript variant X1, mRNA

```
TAATAGAACCTTCTGTCATTGGGGATAAGACTTCATACGTGTACGAGTCTGTTCTGTTGAAAGATAT
TTTCTCTCATTTTCAAGACATCTTGGAGTAACAATTTGGAGAAAGGAGAATGGCGTTAGTTTCAAGAGGA
AGGTCGACACTGAATCCGAATGCACCTCTTTTATCCCGTCTTATGTGCGTCAAGTGGAGGACTTTTTCAC
CCGAATGGTGAATTTGGTGACAACCTTCGACATGGTTCATGATTTATTTGGACGAGGCATCAAGGAGA
GGAATATGGCGATGATGCTTTTGGTTTTACTGGGAATGATGTTGCTGACTTGCCTCCGAAAATATCGAT
CTTGATGTTGATGAAGATATTTTGAACATGGAAGCTCAGTTTGAAGAATTCCTCCAATCATCTGAAAGTG
AACAACAAGGAATCAAGTCATCACCCTATGGTATCAGTGGTATGCTTCTATTTGGTTTTACCAAGGGTTC
GGAGGCACTCGTAAGGCACTGAGCATATCAAAGGGGCCAAAATCTCCCATTTAGCCACCAAGTACTAT
GAGAAACCCAGCAAAAGATTGTTAGCCCAAAGAACAGCCTTCGCCGCATCCGCAACCTCGCTAAATGTAGT
TTAGCTTAAGCAAAAAGCTCTTGGTTTTGTAGTTTGGGCATGTCAGTTCTTAATTTGCAGCTTTGTCTCTTT
CACAAAGCAGCAGTTGAGAGTCTTAAGAGTTTGTAGTTTCTGGTAACCTTTTGTATAGAGCAAGGTAGGTG
GCACCTTCTGTATCTAGCCTTGTTCATAGTTGTAGTATCCTTTGTTTCACTTTTAACTTGTAAACAGCAA
AACTGTTAAAGGGAAAAAATGTAATAATCAGTTTACAAAATGCAAAAAGAGCGCTCTTTGAGTTTTATT
TCAGGTAA
```

ภาพที่ 14. ผลการ MATCH ของยีน ERD15 จาก pRNAi ควบคุม เทียบกับยีน ERD15 ของต้นยาสูบที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพ

5. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ ดัดแปลงจาก Paul J. Bottino (2016) ตามขั้นตอนในตู้ปลอดเชื้อดังต่อไปนี้ นำใบยาสูบมาทำให้ปลอดเชื้อตามลำดับดังนี้ 95% เอทานอล นาน 15 วินาที และ 25% chlorox นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อ นำไปชุบด้วยกระดาษปลอดเชื้อ เจาะยาสูบประมาณ 30-40 ชิ้นด้วย (hole punch) เก็บไว้ในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ ทำการเทเชื้อ *Agrobacterium* ที่เพาะเลี้ยงไว้ นานข้ามคืน และบ่มต่อด้วยการเขย่าเบาๆ นาน 5-10 นาที ขจัดแบคทีเรียส่วนเกินออกโดยการวางลงบนกระดาษซับและกระดาษปลอดเชื้อ และถ่ายไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ MS cocultivation medium แล้ว Cocultivate ในสภาวะมีดนาน 48 ชั่วโมง หลังจาก cocultivation ให้ถ่ายโอนไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ MS selection medium โดยให้มีทิศทางด้านล่างของใบอยู่ห่างขึ้น บ่มในสภาวะมีด และสังเกตการเกิดขึ้นของ transformed callus เป็นเวลาสองสัปดาห์ เมื่อปรากฏยอดใบแล้ว ให้ย้ายจานเพาะเชื้อไปที่มีแสงและที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อการเจริญเติบโตของพืช (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15. แสดงแสดงต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการประยุกต์ใช้วิธีการของ Pu Yan et al., 2012 ในการโคลน (subcloning) ชิ้นส่วนยีน ERD15 เข้าสู่ RNAi เวกเตอร์ ที่เรียกว่า Plasmid Golden Gate Expression Vector โดยวิธีนี้ มีข้อดี คือเป็นการโคลนที่ค่อนข้างง่าย อาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ *BsaI* และการหาลำดับเบส ภายในคาสเซตส์ (cassettes) ที่ประกอบด้วย *ccdB* lethal gene หากการโคลนประสบความสำเร็จจะเกิดโคลนี แต่การถ่ายฝากเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียจะไม่สามารถเติบโตได้ เพื่อเป็นการยืนยันการสร้างคอนสตรักส์ในเบื้องต้น การตรวจสอบทิศทางและรีคอมบิแนนต์ โดยวิธีการดังกล่าว ได้ประยุกต์ใช้การสังเคราะห์ยีน ทดแทนการโคลน โดยวิธีเติมจุดตัดเอนไซม์ (restriction sites) แต่นำเอาจุดตัดเอนไซม์ (*BsaI*) ที่มีอยู่บน pRNAi มาใช้ เพื่อง่ายและสะดวกต่อการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ร่วมกับการหาลำดับเบส ดังกล่าว

การทดลองที่ 2.4

การโคลนยีน PIS (Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase ที่เกี่ยวข้องกับสถานะทนแล้งในพืชทนแล้ง PIS (Phosphatidyl Inositol (PdIns) Synthase) Gene Cloning for Drought Tolerance Traits Study in Tobacco Plant

พญกัศดิ์ รวยอารี

ภรณี สว่างศรี

บุญเรือนรัตน์ เรื่องพิเศษ

สุภาวดี จ้อเหรียญ

คำสำคัญ

การโคลนยีน (Gene cloning), การแสดงออกของยีน, PIS gene

บทคัดย่อ

รวบรวมลำดับเบสของยีน PIS (Phosphatidyl (pdIns)_Inositol Synthase) จากฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI) ออกแบบและสังเคราะห์ยีน PIS ด้วยวิธี GeneArt Gene Synthesis ที่ประกอบด้วย 3 คู่ จุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ที่ปลายด้าน 5' และ 3' ได้แก่ XbaI-BamHI, XbaI-EcoRI, และ XbaI-KpnI โคลนยีน PIS ที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่ TOPO cloning vector และ pUC19 ทรานส์ฟอร์มเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* DH5 alpha เพื่อเพิ่มจำนวน ตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธีการหาลำดับเบส จากนั้น ตัดพลาสมิดไบนารีเวคเตอร์ pCAMBIA2300 ที่ประกอบด้วย CaMV35S promoter และ Nos Terminator และ pRI909/pRI910 ที่ประกอบด้วย Nos promoter และ Nos terminator พร้อมด้วยยีน PIS ใน TOPO cloning vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามสามคู่จุดตัดเอนไซม์เดียวกัน (compatible restriction sites) ทำการทดลองระหว่างปี 2559 ถึงปี 2560 ที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ การเชื่อมต่อยีน PIS เข้ากับ pCAMBIA2300, pRI909, และ pRI910 ทั้งสามคู่จุดตัดเอนไซม์ ด้วย T4 DNA ligase ผลการทดลองพบว่าสามารถสร้างคอนสตรักส์ของยีน PIS เข้ากับไบนารีเวคเตอร์ทั้งสามชนิดพลาสมิดได้ อีกทั้ง ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบเพื่อเตรียมไว้สำหรับการถ่ายฝากยีนด้วยวิธี Agrobacterium transformation ด้วยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ ELETROMAX LBA4404 และเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียตามความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป ผลการทดลองการถ่ายฝากยีนในเบื้องต้น ยังไม่ได้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน อาจต้องมีการปรับสภาวะการทดลองเพื่อให้ได้ต้นยาสูบที่ประกอบด้วยยีน PIS ต่อไป ส่วนการทดลองควบคุม และเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำกรานส์ฟอร์มเมชันด้วยสายพันธุ์ LBA4404 ให้ผล 100 เปอร์เซ็นต์ และได้ต้นต้นยาสูบสมบูรณ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการถ่ายฝากยีนต่อไป

Abstract

PIS DNA base sequences were retrieved from National Centre for Bioinformatics Information (NCBI Database). The open reading frame of PIS gene has been designed and synthesized by GeneArt gene synthesis method. The full-length of PIS gene contains 648 base pairs comprising 3 pairs of restriction sites at their 5' and 3'-ends which are *XbaI-BamHI*, *XbaI-EcoRI*, and *XbaI-KpnI*. The PIS gene then was cloned into TOPO cloning system

and pUC19 for gene amplification and for transformation into tobacco plant. DNA sequencing was used to confirm the identity of the correction of DNA bases. The DNA sequencing and blast search results showed homology with other PIS plant genes in the database. The plant expression vector, pCAMBIA2300, pRI909 and pRI910 were cut with the same sites of their compatible restriction enzymes. The experiments were conducted between 2016 and 2017. The results showed that the construction of PIS gene with all three plant expression vectors has been successful. The agrobacterium-mediated transformation of PIS gene constructs using LBA4404 were under studied. Furthermore, the tobacco plant tissue culture was succeeded for further gene transformation. The preliminary results showed that the appropriate conditions of gene transformation need to be adjusted for successful transformation.

บทนำ

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าอุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอันเนื่องมาจากกิจกรรมของมนุษย์ ทั้งภาคเกษตรกรรมและภาคอุตสาหกรรม จำนวนประชากรมนุษย์ที่เพิ่มสูง จำนวนพื้นที่เพาะปลูกหรือภาคการเกษตรลดลงเพื่อใช้ในกิจกรรมอย่างอื่นที่ไม่ใช่ภาคเกษตร บวกกับเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่มนุษย์สร้างขึ้น จนทำให้โลกต้องประสบกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นในชั้นบรรยากาศ (ชั้นบรรยากาศบางลง) รังสีความเค็ม และความเครียดทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ (Environmental stresses) ที่ส่งผลต่อพืช (Levitt, 1980) ทำให้เป็นที่คาดการณ์กันว่า มนุษย์ต้องเผชิญกับภาวะโลกร้อน ภาวะเรือนกระจกหรือสภาพการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศ (climate change) อย่างมากในอนาคตอันใกล้และปัจจุบันได้เกิดขึ้นแล้ว (Sun *et al.*, 2014) โดยจะส่งผลกระทบต่อทั้งธรรมชาติและมนุษย์ ปัจจุบันผลที่เกิดจากภาวะโลกร้อนได้ทำให้มนุษย์เห็นแล้วว่าส่งผลกระทบและมีความสำคัญอย่างแท้จริง เช่น ทำให้สภาพแวดล้อมของโลกเปลี่ยนแปลงไป เช่น ฝนตกไม่ถูกต้องตามฤดูกาล พืชเกิดสภาวะขาดน้ำจากภาวะโลกร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในภาคการเกษตร พืชต้องประสบกับปัญหาภัยแล้งในบางฤดูกาล เพราะฝนไม่ตกตามช่วงเวลาที่เหมาะสม ทำให้พืชประสบปัญหาภัยแล้ง และพืชบางพันธุ์อ่อนแอต่อสภาวะขาดน้ำ ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เพราะปริมาณพืชที่คาดหวังภายหลังการเพาะปลูกลดลง ทั้งมีสาเหตุมาจากไม่สามารถเพาะปลูกพืชได้ตามที่ต้องการหรือสูญเสียผลผลิตพืชที่ได้เพาะปลูกไป (yield loss) กล่าวโดยทั่วไปว่า ภัยแล้งจัดเป็นปัญหาทางกายภาพที่สำคัญที่สุดที่ทั่วโลกเผชิญ และทำให้การเพิ่มปริมาณผลผลิตของพืช (Hezky, 2008) เท่าที่ผ่านมา นอกเหนือจากวิธีการทางภาคเกษตรตามปกติแล้ว ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยการพัฒนาพืชให้มีความทนทานแล้ง ทนต่อสภาวะขาดน้ำ หรือทนต่อสภาวะเครียดในช่วงการเพาะปลูกได้ (drought stress tolerance) โดยการศึกษาหาหนทางต่างๆ และนำยีนต่างๆ เหล่านั้นเข้าสู่จีโนมของพืชที่ต้องการให้มีสรรพวิทยาตามต้องการ อย่างไรก็ตาม การศึกษาตามวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพดังกล่าว ต่างให้ผลลัพธ์ที่แตกต่างกันออกไป เช่น ระดับการตอบสนองต่อการขาดน้ำหลังการได้รับยีนที่ผันแปรไปตามแต่ละชนิดยีนหรือชนิดพืช เป็นต้น ด้วยเหตุนี้ ในงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นการศึกษาหาหนทาง PIS (Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase) ซึ่งเป็นยีนที่ได้ผ่านการศึกษามาแล้วว่ามีผลต่อคุณลักษณะทนแล้งในพืชทนแล้ง ในอนาคต อาจนำไปใช้ในต่อยอดและทดสอบกับพืชต้นแบบต่อไป แม้ว่าการศึกษาเกี่ยวกับยีนทนแล้งจะมีอยู่ก็ตาม แต่ก็มีอยู่อย่างจำกัด ส่วนมากเป็นรายงานการศึกษาจากต่างประเทศ ด้วยเหตุนี้ วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อเป็น

การหาข้อมูลการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำกับพืชสำคัญในประเทศไทย อาจเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในประเทศต่อไปในอนาคต

นอกจากนี้เนื่องจากอุณหภูมิโลกมีแนวโน้มสูงขึ้น หรือที่เรียกกันว่าภาวะโลกร้อน ดังกล่าวนั้น ทำให้จำนวนพื้นที่การเพาะปลูกและผลผลิตของพืชลดลง เกษตรกรทั่วโลกสูญเสียรายได้ โดยปกติแล้ว เมื่อพืชต้องประสบปัญหาในการเจริญเติบโตในสภาวะขาดน้ำ พืชจะมีกลไกควบคุมภายในเซลล์อย่างเป็นระบบเพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นๆ ตามธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น การมีองค์ประกอบโครงสร้างสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ประกอบด้วยเอ็นไซม์สำคัญในวิถีฟอสโฟลิปิด (phospholipid pathways) ชื่อว่า PIS (Phosphatidylinositol (PtdIns) synthase) ที่ถูกสร้างขึ้นมาจากแหล่งเริ่มต้นสำคัญในการสร้างลิปิดที่ประกอบด้วยอินออสซิทอล (inositol-containing lipid precursor) ชื่อว่า Phosphatidylinositol (PtdIns) นี้ โดยสามารถถูกสร้างขึ้นมาได้ทั้งจาก cytidine-diphosphodiacylglycerol (CDP-DG) และ myo-inositol โดย PtdIns synthase (PIS) พบได้ทั่วไปทั้งในเซลล์พืชและสัตว์ทุกชนิด

PtdIns พบที่เยื่อหุ้มเซลล์ และเป็นตัวช่วยสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึม อีกทั้ง เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ (signal molecules) เพื่อควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในพืช ที่ควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะเครียดทางสิ่งแวดล้อม (Zhai *et al.*, 2012; Lie *et al.*, 2013) จากการศึกษาใน PIS ในยีสต์มิวแทนท์ ชื่อว่า BY4743 ยืนยันว่ายีน ZmPIS และ ZmPIS2 ในข้าวโพด มีการแสดงออกในระดับทรานสคริปชันที่เพิ่มสูงขึ้น (transcriptional up-regulated) เพื่อตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ (drought stress) และภายใต้สภาวะดังกล่าว ข้าวโพดจะมีการแสดงออกของยีน ZmPIS ที่สูงขึ้น ก่อให้เกิดระดับที่เพิ่มขึ้นของฟอสโฟลิปิดและกาแลคโคลิปิด (galactolipids) ในใบเทียบกับระดับของยีนดังกล่าวในพันธุ์ปกติ โดยพบมีการเชื่อมโยงการปิดของปากใบเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ (stomatal closure)

ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายฝากยีนจากข้าวโพด ZmPIS มีระดับลิปิดเพิ่มขึ้นที่ส่วนใบอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากยีน ทำให้มีความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell integrity) เพิ่มขึ้น อีกทั้ง เซลล์สามารถเก็บรักษาน้ำและสารอาหารต่างๆ (solutes) ต่างๆ ให้อยู่ภายในเซลล์ได้นานขึ้นภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Liu *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2012)

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. ออกแบบไพรเมอร์ PIS พร้อมจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ด้านปลาย 5' และ 3'

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน PIS โดยเพิ่มจำนวน 3 คู่ จุดตัดเอนไซม์ ที่ด้านปลาย 5' และ 3' XbaI-BamHI, XbaI-KpnI, XbaI-SacI สำหรับเติมเข้า pMAT – vector โดยวิธีการออกแบบและสังเคราะห์ยีน (Invitrogen, USA) คู่จุดตัดเอนไซม์และตำแหน่งไพรเมอร์ของ PIS gene ที่ด้านปลาย 3' และ 5' พร้อมไพรเมอร์ตรวจสอบขึ้นยีน (Screening primers) เพื่อให้ได้ยีน PIS แบบเต็มยีน (Full-length) จำนวน 3 เส้น ความยาวของยีนประมาณ 650 เบส โดยยีน PIS ที่ได้ประกอบด้วยตำแหน่งจุดตัดบริเวณปลาย 5' และ ปลาย 3' จำนวน 3 จุดตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ ได้แก่ XbaI-KpnI, XbaI-SacI และ XbaI-BamHI และ PIS gene screening primers รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของยีน PIS มาออกแบบและสังเคราะห์โดยวิธีการออกแบบและสังเคราะห์ยีน (GeneArt and GeneSynthesis, Invitrogen, USA) ตามคู่ไพรเมอร์ ให้ได้แบบเต็มสายยีน (full-length) พร้อมตำแหน่งจุดตัดเอนไซม์ที่เพิ่มลงไปทั้งด้านปลาย 5' และ ปลาย 3' ของยีน

Xbal-BamHI

PIS-Xbal(forward) 5'- TAAGCATCTAGAATGCCATCAGTTTATCTTTAC -3'

PIS-BamHI(reverse) 5'-TGCTTAGAATCCTCATTGCTGCGCTTCAGATC-3'

Xbal-KpnI

PIS-Xbal(forward) 5'- TAAGCATCTAGAATGCCATCAGTTTATCTTTAC -3'

PIS-KpnI(reverse) 5'- TGCTTAGGTACCTCATTGCTGCGCTTCAGATC-3'

Xbal-SacI

PIS-Xbal(forward) 5'- TAAGCATCTAGAATGCCATCAGTTTATCTTTAC-3'

PIS-SacI(reverse) 5'- TCTAGAGAGCTCTCATTGCTGCGCTTCAGATC-3'

: PIS gene screening primers

PIS(scr)-Fv : ATGCCATCAGTTTATCTTTACATCCCTAACATT (33)

PIS(scr)-Rv : TCATTGCTGCGCTTCAGATCATAACG (31)

2. การเชื่อมต่อยีนเข้ากับเวกเตอร์ดีเอ็นเอ

ทำปฏิกิริยาไลเกชันโดยการนำเวกเตอร์ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร อินเสิร์ตดีเอ็นเอ (3 คู่ จุดตัด เอนไซม์) (xbal-KpnI, xbal-sacI, xbal-bamHI) 1 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (Promega) 0.5 ไมโครลิตร ไลเกสบัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร เติมน้ำ ปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ทำการถ่ายฝากเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* บน วัฒนธรรมเลี้ยงเชื้อ LB โดยวิธี Heat shock หรือใช้ TOPO cloning kit ต่อไป

3. การทำทรานส์ฟอร์มเมชัน

เติม 2 ไมโครลิตรของปฏิกิริยาไลเกชันข้างต้น ลงในหลอด competent cells บ่มบนน้ำแข็ง นาน 50 นาที ทำปฏิกิริยา Heat Shock นาน 30 นาที ที่ 42 องศาเซลเซียส วางหลอดลงบนน้ำแข็ง เติมน้ำอาหารเหลว S.O.C. 250 ไมโครลิตร ลงในหลอด แล้วเขย่านาน 2.5 ชั่วโมง ที่ 200 rpm ทำการเพาะจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 ไมโครลิตร ถึง 100 ไมโครลิตร บนวัฒนธรรม LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

4. การคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่ประกอบด้วยรีคอมบิแนนต์ที่ต้องการ

คัดเลือกโคโลนีที่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบสารปฏิชีวนะ เพื่อนำมาหาอินสอดแทรกหรือ อินเสิร์ตยีน (inserted gene) ที่ต้องการด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 สาย ได้แก่ PIS(scr)-Fv และ PIS(scr)-Rv และ/หรือตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อเก็บไว้เป็น glycerol stock (อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบความถูกต้องด้วยการหาลำดับเบส

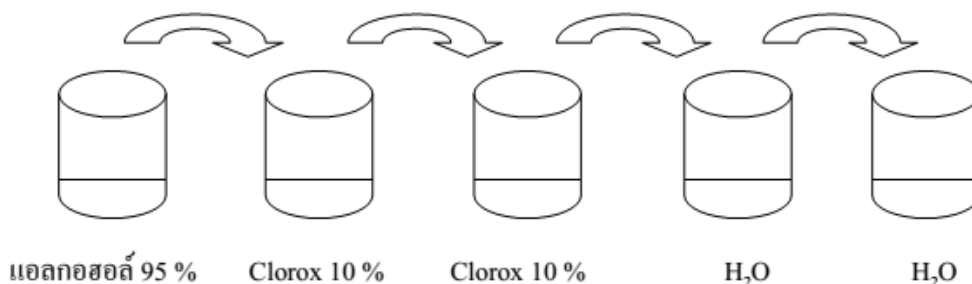
5. สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบอินเสิร์ตดีเอ็นเอ

ทำพลาสมิดดีเอ็นเอมินิเพรพของโคโลนี เพื่อให้ได้ยีนจำนวนมาก พร้อมโคลนเข้าสู่บิวรีเวกเตอร์ (vector construct) ในขั้นตอนต่อไป นำดีเอ็นเอมินิเพรพที่ได้จากข้อ 2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัด

จำเพาะ ตามตำแหน่งที่เข้ากันได้กับตำแหน่งจุดตัดจำเพาะของพลาสมิดไบนารีเวคเตอร์ และเชื่อมต่อเข้ากันด้วยเอนไซม์ DNA ligase ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้

6. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบ

เตรียมต้นยาสูบด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตามขั้นตอนการเพาะเมล็ดยาสูบ ดังนี้



ขั้นตอนการปฏิบัติ (ทุกอย่างทำในตู้ปลอดเชื้อ)

- ห่อเมล็ดยาสูบด้วยผ้าขาวบาง
- เตรียมขวดตามลำดับ
- นำปากคิปลนไฟที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ ทิ้งไว้ให้เย็น
- ใช้ปากคิปลน คีบห่อเมล็ดยาสูบลงไปในช่วงที่เตรียมไว้
- ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95 % 5 นาที เขย่าขวดด้วยมือ
- ล้างด้วย Clorox 10 % ครั้งละ 10 นาที 2 ครั้ง เขย่าขวดด้วยมือ
- ล้างด้วย H₂O ครั้งละ 5 นาที 2 ครั้ง เขย่าขวดด้วยมือ
- ใช้ปากคิปลน คีบห่อเมล็ดยาสูบออกจากขวด วางลงในจานอาหาร (Plate) ที่มีกระดาษทิชชู เพื่อซับน้ำ
- เปิดผ้าขาวบางออก ผึ่งเมล็ด
- นำปากคิปลน คีบเมล็ดวางบนขวดอาหาร MS
- ปิดฝาขวดวางในที่ควบคุมแสงและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- เมล็ดใช้เวลาออก 1 เดือน
- ทำการย้ายใส่ขวดอาหารใหม่ เพื่อลดการปนเปื้อน จากขวดเพาะเมล็ดที่ไม่งอก
- รอจนต้นยาสูบโต แล้วทำในขั้นตอนต่อไป

7. การถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบยาสูบ

ทำการถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ (ยาสูบ) โดยวิธีการ *Agrobacterium*-mediated transformation ด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (ELECTROMAX LBA4404)

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี

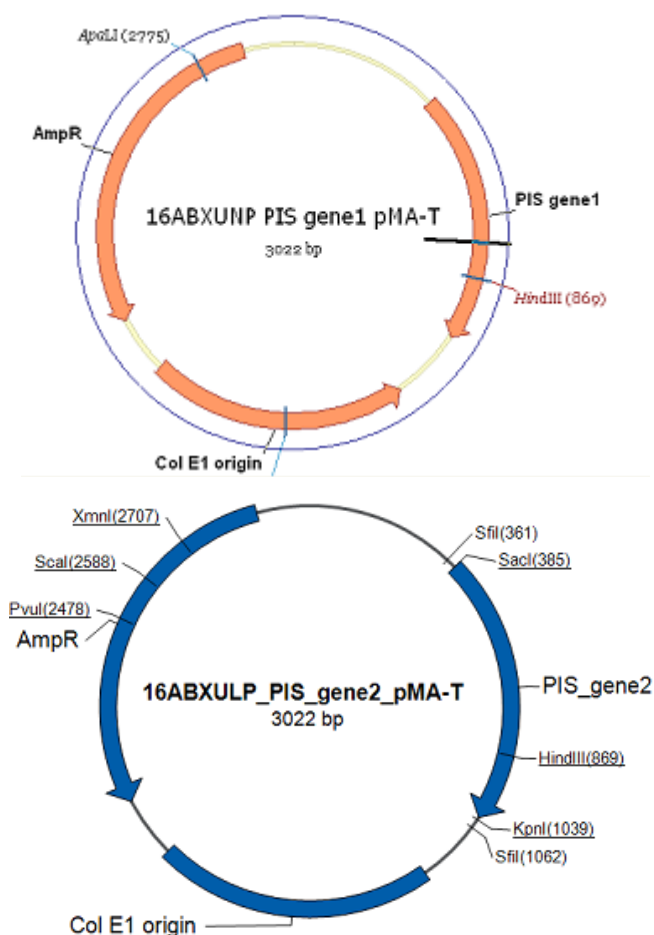
สถานที่ดำเนินการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การสังเคราะห์สายไพรเมอร์ พร้อม 3 คู่ จุดตัดเอนไซม์และท่อนยีน PIS โดยวิธีการสังเคราะห์ยีน ทำให้ลำดับเบสและความยาวของยีนประมาณ 648 คู่เบส (bp) และเชื่อมต่อเข้าสู่ pMAT vector (ภาพที่ 1) ถ่ายยีนเข้าสู่ pMAT- vector เพื่อเพิ่มจำนวนสำเนา โดย pMAT vector ประกอบด้วย ยีนต้านทานปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของ พลาสมิดดีเอ็นเอกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (ภาพที่ 2) ลำดับเบสของยีน PIS (ขนาด 648 คู่เบส) และ 2 คู่จุดตัดเอนไซม์ที่ด้านปลาย 5' และ 3' ได้แก่ (XbaI-KpnI และ XbaI-BamHI) (ภาพที่ 3) พบว่า มีค่า alignment scores ที่ match กับยีน PIS ที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพสากล (ภาพที่ 4) ภาพที่ 5 แสดงค่า Sequences producing significant alignments ของยีน PIS ที่ 100%

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PIS กับยีน PIS ของสิ่งมีชีวิตที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพสากล พบว่า มีความสัมพันธ์อย่างสูง (ภาพที่ 6) และความสัมพันธ์ระหว่างยีน PIS ของพืช Dicot และ Monocot (ภาพที่ 7) ภาพที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PIS แบบเต็มสายยีน (full-length) ภาพที่ 9 ภาพแสดงต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการถ่ายยีน



ภาพที่ 1. แสดงแผนที่การถ่ายยีน PIS เข้าสู่ pMAT- vector >Sense strand, 5'-3' : Sequence length: 648 bp

ATGCCATCAGTTTATCTTTACATCCCTAACATTATCGGGTATTTTAGGATCATCATAAAATTTTCAT
 TGCATTTGCGGTTTGCTATTCCAACAAGGCTCTCTTTGCTATCCTGTACTTCATCAGCTTTGTCC
 TTGATGGTGTGGATGGTTGGTTTGCAAGGAAGTTCAATCAAGCATCAACCTTTGGAGCTGTGTTA
 GACATGGTTACAGATAGGGTTAGCACTGCTTGTTTGTTGGCCCTTCTCTCCAGTTTTACAGACC
 TGGTTTAGTCTTCTTGATATTGCTTGGATTGGATATTACGAGCCACTGGTTTCAAATGTACAGTT
 CTTTCTTGTGAGGTAAGACTAGCCACAAGGATGTAAAACACACAGGCAATTGGCTTCTGAAATTA
 TATTATGGGTACAGGCCATTCATGGCCTTCTGCTGTGTTTCTTGTGAGGTTTTATATATTTTCTCT
 GTTTCTCTTTGCTGATGAGGAGTCAACAAGCTTGCTTAGTGTATGCAAAGGCATCCTGAACCAA
 GTCCCGTCGTTATCTTGGTGTGTTGTTTCCACTCTAGTTGGCTGGGCAGTGAAGCAAGCCACCAAC
 GTCATCCAGATGAAAAC TGCTGCGGACGCATGCGTGGTGTATGATCTGAAGCGCAGCAAATGA

ภาพที่ 2. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PIS

>เส้นที่ 1

5' - XbaI -

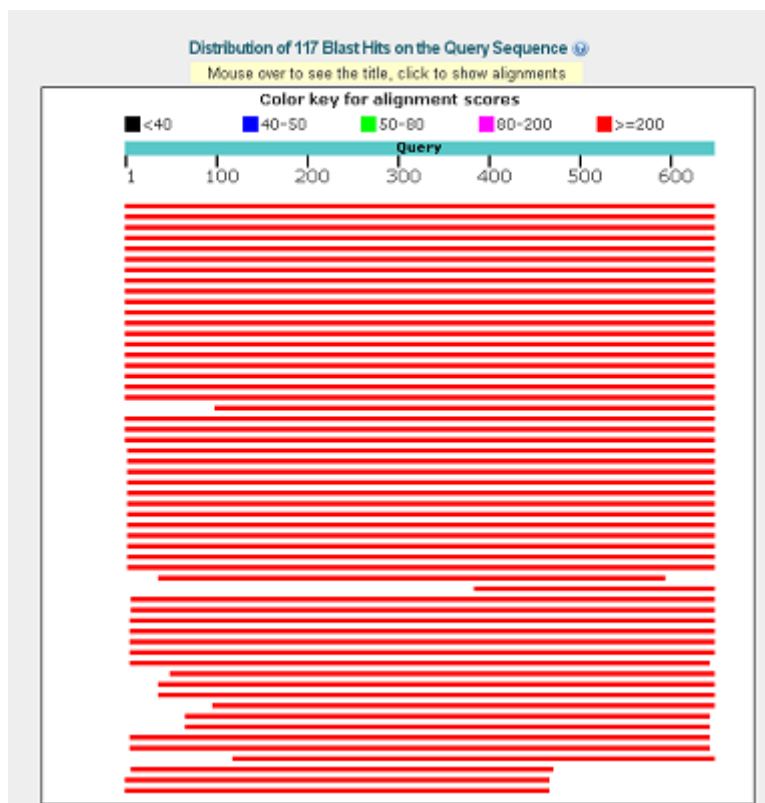
atgccatcagtttatctttacatccctaacattatcgggtatTTtaggatcatcataaatttcattgcatttgcggtttg
 ctattccaacaaggctctctttgctatcctgtacttcatcagctttgtccttgatgggtggtggtttgcaagga
 agttcaatcaagcatcaacctttggagctgtgttagacatggttacagatagggtagcactgctgtttgtggccctt
 ctctcccagttttacagacctggtttagtctcttgatattgcttggattggatattacgagccactggtttcaaatgta
 cagttctttctgtcaggttaagactagccacaaggatgtaaaacacacaggcaattggcttctgaaattatattatgggt
 acaggccattcatggccttctgctgtgtttctgtgaggtttatatatTTTcctgtttctctttgctgatgaggagtca
 acaagcttgccttagtgatgcaaaggcatcctgaaccaaagtcccgtcgttatcttgggtttgtttccactctagttgg
 ctgggcagtgaagcaagccaccaacgtcatccagatgaaaactgctgcgacgcctgctggtgtatgatctgaagcgca
 gcaaatga-KpnI -3'

>เส้นที่ 2

5' - XbaI -

atgccatcagtttatctttacatccctaacattatcgggtatTTtaggatcatcataaatttcattgcatttgcggtttg
 ctattccaacaaggctctctttgctatcctgtacttcatcagctttgtccttgatgggtggtggtttgcaagga
 agttcaatcaagcatcaacctttggagctgtgttagacatggttacagatagggtagcactgctgtttgtggccctt
 ctctcccagttttacagacctggtttagtctcttgatattgcttggattggatattacgagccactggtttcaaatgta
 cagttctttctgtcaggttaagactagccacaaggatgtaaaacacacaggcaattggcttctgaaattatattatgggt
 acaggccattcatggccttctgctgtgtttctgtgaggtttatatatTTTcctgtttctctttgctgatgaggagtca
 acaagcttgccttagtgatgcaaaggcatcctgaaccaaagtcccgtcgttatcttgggtttgtttccactctagttgg
 ctgggcagtgaagcaagccaccaacgtcatccagatgaaaactgctgcgacgcctgctggtgtatgatctgaagcgca
 gcaaatga-BamHI -3'

ภาพที่ 3. แสดงลำดับเบสของยีน PIS (ขนาด 648 คู่เบส) และ 2 จุดตัดเอนไซม์ที่ด้านปลาย 5' และ 3' ได้แก่ (XbaI-KpnI และ XbaI-BamHI)



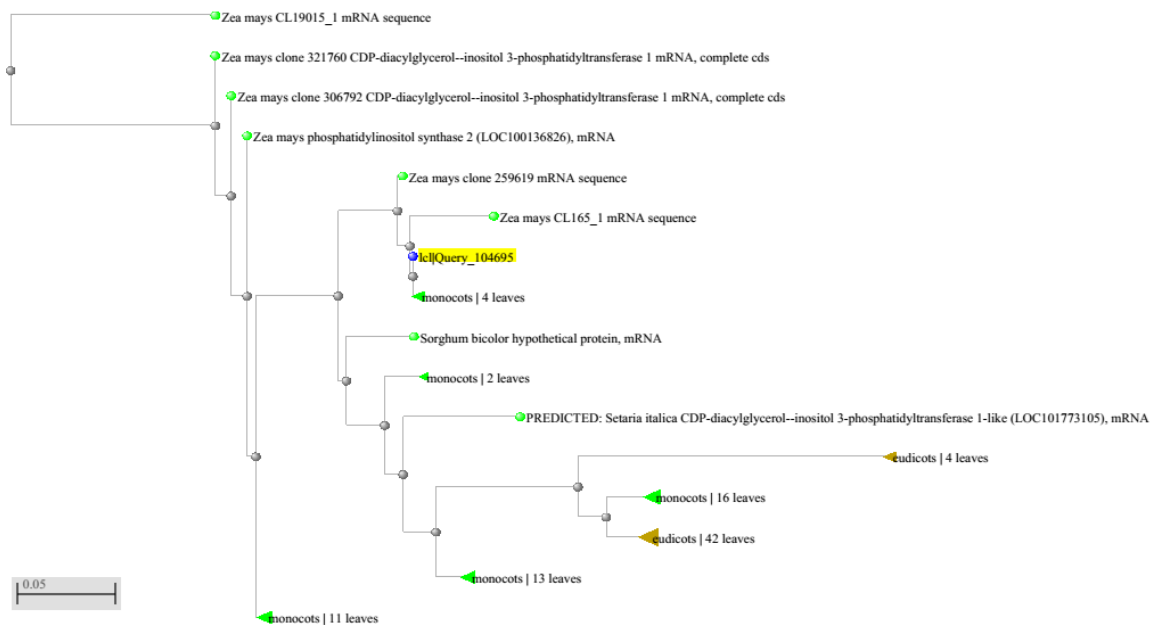
ภาพที่ 4. แสดงการ match จากการทำ blast search ของยีน PIS เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล NCBI database

Description	score	score	cover	value	ident	Accession
Zea mays clone Z84101 CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidytransferase 1 mRNA, complete cds	1169	1169	100%	0.0	100%	EU865146.1
Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFb0298612 mRNA, complete cds	1169	1169	100%	0.0	100%	BT038618.1
Zea mays phosphatidylinositol synthase (PIS), mRNA	1164	1164	100%	0.0	99%	NM_001112089.1
Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	1047	1047	100%	0.0	96%	XM_002438786.1
Zea mays CL185_1 mRNA sequence	1043	1043	100%	0.0	95%	AY112475.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X9, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008849053.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X8, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008849052.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X7, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008640051.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X6, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008849050.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X5, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008849049.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X4, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649048.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X3, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649047.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X2, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649046.1
PREDICTED: Zea mays phosphatidylinositol synthase 2 (LOC100136826), transcript variant X1, mRNA	1007	1007	100%	0.0	94%	XM_008649045.1
Zea mays full-length cDNA clone ZM_BFb0350F04 mRNA, complete cds	1007	1007	100%	0.0	94%	BT062821.1
Zea mays clone Z21760 CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidytransferase 1 mRNA, complete cds	1007	1007	100%	0.0	94%	EU868519.1
Zea mays clone Z06792 CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidytransferase 1 mRNA, complete cds	1007	1007	100%	0.0	94%	EU867880.1

ภาพที่ 5. แสดง Sequences producing significant alignments ของยีน PIS



ภาพที่ 6. แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน PIS (Phylogenetic tree) ที่ได้กับยีน PIS ของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI)



ภาพที่ 7. แสดง Phylogenetic tree ของยีน PIS ระหว่าง monocot และ eudicot


```

1      CTA AAT TGA T ACG GTT A A T T T T T G T A A A A T T C C G G T T A A A T T T T T G T T A A T C A G C T C A T T T T T T A A C C A A T A G C C G C A A A A T C C C G C C G A A A A T C C C C T T A T
G A T T T A A C A T T C C C A A T T A A A C A A T T T A G T C G A G T A A A A A A T T G T T A T C C G C G T T T A G G C C T T A T
A A A T C A A A A G A A T A G A C C G A G A T A G A G G G T T G A G G G C C G C T A C A G G C C G C T C C C A G G G T T T T C G G T G C G
201    T T F A G T T T F C T T A T C T G C C T C A T C C C A A C T C A C C C G G A T G C C C C G G A G G G T A A G T T C G A C G C C T T C C C G
C C G G A G A G C G A T A A G C C G C G C G A A C C C C C C T A C A T T C A A C C C A T T G C C G T C C C A A A G G G C C A A C T T T G C
301    A C C G G C A G T G A G C C G A C G T A A T A G C A C T A C T A T A T A G G C C G A A T T A G C C G C T C A A G C C A C G T G
T G C C G G C T C A C T T A T G C T G C A G T G A T A T C C C G C T T A A A C C C G C C T T C O G G T G C A C A G A A C A G C A G
401    C T T F A C A T C C T A A C A T T A T C C G G T A T T T A G G A T C A T C A A A T T T C A T T G C A T T T G C C A A C A A G G C
G A A A T G T A G G G A T T G A T T A A T C C C C A T A A A T T C C T A G T A G T A T T T A A A G C T A C T T A A C G C A A G C A T A
501    T C A T C A G C T T T G T C C T G A T G G T G G A T G C C A A A C C C A A C C A C C A A G C A T C A C C T T T G G A
A G F A G T C C G A A C A G G A A C T A C C A C A C T A C C A C C A A A C G T T C C T T C A A G T A G T T G T A T C C A
601    T A G C A C T C C T T G T T T G T G G C C C C T T C T C T A G A G C C T T T A G T T C T T G A T A T A T T G C T T
A T C G T G A C G A A C A A A C A A C C G G G A G A G A G G G T C A A A A T T C T C T G A C C A A A T C A G A A G A A C T A T A C A C C T A T
701    A T G T A C A G T T T C T T C T T G T C A G G T A A G C T A G C C A C A A G G A T G T A A A A C A C A C A G G C A A T T G C C T C T G A
T A C A T G T C A A G A A G A C A G T C C A T T C T G A T G G T G T T C T A C A T T T G T G T G C C G T T A A C C G A A G A C T
HindIII
801    C C T T C T G C T G T G T T T C T F T G G A G G T T T A T A T A T T T C C C T G T T T C T T T G C T G A T G A G C A G T C A C A A A G
G G R A G A C C A G C A A A G A M C A C C A A A A T A T A T A A A G G A C A A A G A A A C C A C T A C T C C C A G T A G C A G C A A C A
901    C C A A A G T C C C G T C C T A T C T T G T G T T G T T C C A C T C T A T A T A A A G G A C A A A G A A C C A C T A C T C C C A G A
G C T T C C A G G C A G C A A T A G A C C A C A A A C A A G T G A G A T C A C A C C G A A C C G T A C T C C T C C T C O G T G T T G
1001  T G C T G C C G T G T A T A G T A C T G A A G C G C A A A T G A G G T A C C T G G A C A A A C A C C G A C T A C T G C C T C C C
A C C C A C C A C C A C T A G A C T T C C G C T C G T T A C T C C A T T G G A C T G G A C G A A C C C G G A G G T C G A A A G G T C
1101  T G T C G T G C C A G C T C A T T A A C A T G C T A T G C T G T T F C C T T G C C T A T T G G C A G C A T T A A G C T A G C A T T
A A G C C G G C T G C G A C A A A A G C A C C A A A G C C A G C A A A A G C C C A A A A G G C C T A A A A A G G C C G C T T G C T G A
1201  A A G C C T C C G G C G T C C T A A T T G C A A A A A G C C A G C A A A A G C C C A A A A G G C C T A A A A A G G C C G A A A A A G G C
T T T G C C A G C C A C C G G A C T T A C T G T T T C C G G T C C T T G C C G C C A A A A A G G C C G A A A A A G G C C G A A A A G G C
1301  A G C A T C A C A A A A A T C G A C C T C A A G T C A G A G G T G G C G A A A C C C G A C A G G A C A T A A A A G A T A C C A G G C G T T
T T T A G T C C G C A G T T C A G T C C A G T T C C A C C A A C C T T T C C C C T G C T A T T A T T C T A T G G T C C G C A A A G G G G A C C
1401  T G T T C C G A C C T C C C C C T T A C C G G A T A C C T G C C C C T T T C T C C C T T G C G A A C C G T G C C T G C T A C T A G C T C A C C
A C A A G C T G G C A G G C G A A T C A G G C G G A A A C A G G G A A A C T T C C G C A C C C G A A A G A G T A T C G A A A G T A T C G A
ApaI
1501  T A G G T C G T T C G C T C C A A G C T G G G C T G T G T G C A C G A A A C C C C C C G T T C A G C C C G A C C G C T G A G C C T T A C C G
A T C C A G C A A G C A G G T T G A C C C G A C A C A C G T C T T G G G G G G C A A G T C C G C C T C C G C C T G A G C C G A A T T G G C A C T T
1601  G A C C G A C C T T A T C C G T T A C T T G C T G T T G G G C G A T T A C C A G C G A T T A C C A G C C T G C C T A C C A G C A T T G A G C C
T A G C C G T G A G T A G C C G T G A C C C T C C G G T G A C C A C C A T T G C T C T A C C A A T C C G C C A G C A G C C G T T G
1701  C G G C T A C A C T A G A A G A A C A G T A T T T G G T A T C T G C G C T C T G A G C C A G C A T T A C C A A A G A G T T G G T A G C C T T
T C T C T T G T C A A A A A C C A T A A A C C A T A G A C G A G A C G A C T C C G T C G T A A T T T T C T C A A C A T C G A A A
1801  C G T C G T A G C G G T G T G T T T T T T G T T T G C A A G C A G A T T A C C C C A G A A A A A A G A G A G T T C T C A G A G A T C
A G C A C A C C G C C A C C A A A A A A C A A A A C C G T T C G T C T A A T G C C G T C T T T T C C T A G A G A T C C A A T G A T A C
1901  A G T G G A A G C A A A A C C A C G T T A A G G A T T T T G G T C A T G A G A T A T A C A A A A A G G A T C C T A G A T C C T T T A A A T T A A
T C A C C T T G C T T T G A G T G C A A A T C C C T A A A A C C A G T A C T C T A A T A G T T T T T C T A G A A G T G G A T C T A A A T T A A T T
2001  C T A A A G T A T A T A G A T A A A C T T G G T C T G A C A G T A C C A A T G C T T A A T C A A C A G T G A G G C A C C T A T C T C A G C C
G A T T T C A T A T A T A C A T T T G A A C C A G A C T G T C A A T G G T T A C G A A T T A G C A T T A G C A T T C C C G T G G C
2101  T A C T C C C C G T C G T G T A G A T A M C T A C A T A T C G G A A G G G C T T A C C A T T G G C C C A G T A G C A A T G A T A T A C
A C F A G G G G C A G C A C A C T A T T G A T G C T A T G C C C T C C C G A A T A T A T A C A A A A G G A T C C T A C T A T G C
2201  T A T C A G C A A T A A A C C G A C C A G C C G G A A G G G C C G A G G C C G A G A A G T G T C C A C T T T A T C C C C T C C A T C A G C T A T T
A T A G T C G T T A T T T G G T C G G T C G G C C T T F C C G G C T C C G T C T A A T G T C G T A A T T C A C C A G G A C G T T G A A A T A
2301  A G T A A G T A G T T C C C A G T T A A T A G T T T G C C A A C T T G T T T G C A A G C T T G T T T G C A C C G C A G C T G C A T T C A T T C A T C A
T C A T T C A T C A A G C G G C A A T A T C A A A C C G C T T T C C A C A A G C T T G C C A A A A A G C C A T T A G C T C A G C
2401  G G T T C C C A A C G A T C A A G C C G A G T T A C A T G A T T C C C A T G T T G C C A A A A A G C C G G T C A C G A
C C A A G G G T T G C F A G T T C C C G T C A A T G T A C T A G G G G G T A C A C A C T T T T T G C C A A T C C G
2501  C A G T G T T A T C A C T C A T G G T T A T G C C A G C A C T T G C A T A A T T C T G C A T A A T T C T A C T G A C T T T C T G T G A C T
G T C A C A A T A G T A G A T A C C A A T A C C G T C G T G A C G T A T T A A G A A A T G A C A G A T G A C A G A C A C T G A C C A C T A T G
2601  A T T C T G A G A A T A G T G T A T A G C C G A C C G A G T T G C T C T T C C G C G A C C G A T T A C C G G G T A A T A C C G C C A
T A G A C T C T T A T C A C A T A C G C C G C T G G C T A A C G A A A A G C G G C A G T T A T G C C C A T T A T G C C T T A
2701  G G A A A A C G T T C T T C G G G C G C A A A A C T C T C A A G G A T C T T A C C G T T G A G A T C C A G C A T T C C
C C T T T T G C A A G A A G C C C C G C T T T T G A G A A T G C C A C A C A C T C T A G G T C A A A G C A A G C T A G A T T A C C A
2801  T T A C T T T C A C A G C G T T T C T C G G T G C C A A G C C C A C T C G T T T T T G C C T T G C G A A A A A G C C A T T A C C A
C C T T T T T C A A T A T T T A G A A G C A T T A T A C A G G G T A T T G T C G T A T T G C C T A T A G C C G T T T T T C C
2901  G G A A A A A G T T A T A T A A C T T C G T A A A T A G T C C C A A T A A C A G A G T A C T G C C
A C A T T T T C C C G A A A A G T C C A C
3001  T G T A A A A G G G C T T T T C A C C G T G

```

ภาพที่ 8. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PIS



ภาพที่ 9. ภาพแสดงต้นยาสูบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการถ่ายฝากยีน

สรุปผลการวิจัย

1. ชุดยีน PIS construct ที่ได้จากการวิจัยนี้ ได้มาจากการออกแบบไพรเมอร์ที่ด้านปลาย 5' และ 3' และจากการสังเคราะห์ยีน ทำให้ประหยัดเวลาในการโคลนนิ่งและตรวจสอบทิศทางของยีน ทำให้ความถูกต้องและความแม่นยำในทิศทางของยีนในเวกเตอร์สูงขึ้น
2. คอนสตรัคส์ของยีน PIS ที่ได้ มีจำนวน 2 คอนสตรัคส์ ได้แก่ ยีน PIS1 และ ยีน PIS2 ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการออกแบบและสังเคราะห์ยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตรอื่นๆต่อไปได้

การทดลองที่ 2.5

การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *calreticulin* และ *calmodulin*
เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืชต้นแบบ

Gene Cloning and Expression of Gene *Calreticulin* and *Calmodulin*
for Drought and Salt Stress in Model Plant

สุภาวดี จ้อเหรียญ ภรณ์ สว่างศรี ภูมรินทร์ วนิชชนานันท์
อัจฉราพรรณ ใจเจริญ อรุณทัย ชาววา

คำสำคัญ

การโคลนยีน (gene cloning), การแสดงออกของยีน (gene expression), สภาวะขาดน้ำ (drought stress), สภาวะเค็ม (salt stress), แคลเซียมไอออน (calcium ion; Ca^{2+}), การปรับปรุงพันธุ์พืช (plant breeding)

บทคัดย่อ

การโคลนยีน *calreticulin* (*CRT*) และ *calmodulin* (*CaM*) ในข้าวโพด มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืชสำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนต่อสภาวะเครียดเนื่องจากการขาดน้ำและดินเค็มได้ โดย *CRT* และ *CaM* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเซลล์ในส่วนของระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำหน้าที่ในการรับส่งสัญญาณ (signal transduction) การควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) การจับตัวของเซลล์ (cell adhesion) และการยับยั้งขบวนการทำลายของระบบ complement นอกจากนี้ยังเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการรักษาระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ภายในเซลล์ ซึ่งพบว่าเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือถูกกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ จะทำให้ระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ต่างๆ ในระดับที่เกินปกติ จนอาจทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้น พืชจำเป็นต้องมีการปรับสมดุลแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เพื่อให้มีชีวิตอยู่ได้ ภายใต้สภาวะเครียดดังกล่าว งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *CRT* และ *CaM* จากข้าวโพด โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) จากยีน *CRT* และ *CaM* ในพืชชนิดต่างๆ ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล NCBI นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวโพด 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1 ตากฟ้า 3 นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 ได้ยีนขนาด 3,699 และ 2,472 คู่เบสตามลำดับ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม Software GenScan Version 1.0 พบว่า ยีน *CRT* และ *CaM* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 14 และ 2 exon ตามลำดับ จากนั้นทำการโคลนยีน ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน โดยการทำปฏิกิริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ซึ่งได้เติมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส ได้ยีน *CRT* และ *CaM* มีขนาดเท่ากับ 1,263 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีนได้เท่ากับ 421 และ 150 amino acids ตามลำดับ เปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีนชนิด

เดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *CRT* ที่โคลนได้จากข้าวโพด มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calreticulin (CRT)* ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU961008.1) และ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) (XM_021453764.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 95% ตามลำดับ และยีน *CaM* ที่โคลนได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calmodulin (CaM)* ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (NM_001111985.2) และ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) (XM_002441253.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ

Abstract

Calreticulin (CRT) and calmodulin (CaM) genes are involved in the regulation of cellular functions, including the regulation of immune system, signal transduction pathways, gene expression, cell adhesion and inhibit the destruction of the complement system. In addition, these are also a gene involved in the maintaining of calcium ion concentration within cells. When plants are under an environment stimuli both biotic and abiotic stress. Ca^{2+} within the cell increases, resulting in the activation of various enzymes in excessive levels can cause death of cells. So, plants need to balance calcium ions inside the cell to survive under abiotic stress conditions. In this study, a full-length genomic DNA sequences of corn (*Zea mays* L.) encoding *calreticulin (CRT)* and *calmodulin (CaM)* have been isolated from four corn variety names TAKFA 1, TAKFA 3, NAKORNSAWAN 3 and NAKORNSAWAN 1 via PCR – based method. The gene sequence contains a fragment of 3,699 bp and 2,472 bp, including with 14 exons and 2 exons, a 1,263 bp and 450 bp complete ORF, plus a polyA signal AAATAA motif in *CaM* gene. *CRT* and *CaM* gene encoding the 421 and 150 amino acid polypeptide. The highly conserved region of the gene is calreticulin and colmodulin which are also found in monocots *Zea mays* (L.) (EU961008.1, NM_001111985.2) and *Sorghum bicolor* (L.) XM_021453764.1, XM_002441253.2) with 99% and 95% (*CRT* gene) and 99% and 98% (*CaM* gene) of homology respectively.

บทนำ

ปัญหาภัยแล้งอันเกิดจากสภาพการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ (climate change) หรือที่เรียกว่า ภาวะโลกร้อน (global warming) เป็นปัญหาสำคัญและพบว่ามี ความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะผลผลิตทางการเกษตร เนื่องจากน้ำเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญที่สุดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช การเกิดสภาวะขาดน้ำ (drought stress) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น ปริมาณน้ำในดินน้อย อัตราการระเหยของน้ำสูง สภาพอากาศที่หนาวเย็นหรือแห้งแล้ง ปริมาณน้ำฝนน้อย หรือสภาพดินเค็ม ซึ่งองค์ประกอบของพืชส่วนใหญ่คือ น้ำ และน้ำยังเป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญภายในเซลล์พืช ดังนั้น เมื่อพืชเกิดสภาวะขาดน้ำจะทำให้พืชเกิดความผิดปกติต่างๆ เช่น แร่งต้นเต่งภายในเซลล์ลดลง และพืชจะแสดงอาการเหี่ยว อัตราการเจริญเติบโตช้าลง เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก กระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของโปรตีนและกรดอะมิโนจะค่อยๆ ถูกทำลายในที่สุด การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อ

สภาวะเครียดอันเกิดจากการขาดน้ำและสภาวะดินเค็ม โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาพันธุ์พืช ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการค้นหา ยีน การศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนหรือกลุ่มยีน และการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะดินเค็ม โดยการนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้มาใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชเพื่อให้พืชสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้เมื่อต้องอยู่ภายใต้สภาวะเครียดดังกล่าว ซึ่งนับว่าเป็นพืชทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหาอันเกิดจากภาวะโลกร้อน อีกทั้งยังเป็นการช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกทางหนึ่งด้วย

calreticulin (CRT) เป็นโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเซลล์โดยเฉพาะในส่วนของระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีหน้าที่ในการรับส่งสัญญาณ การควบคุมการทำงานของยีน (gene expression) การจับตัวของเซลล์ (cell adhesion) และยับยั้งขบวนการทำลายของระบบ complement (สถาพร และคณะ, 2557) นอกจากนี้ *calreticulin (CRT)* และ *calmodulin (CaM)* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการรักษาภาวะสมดุลของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ ซึ่ง calcium ion (Ca^{2+}) ทำหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) และกระบวนการทางสรีรวิทยา (physiology) เช่น การเจริญเติบโต การทำงานของเซลล์ การแสดงออกของยีน ดังนั้น เซลล์จำเป็นต้องมีกลไกการรักษาภาวะคงที่ของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ซึ่งในบางกระบวนการอาจต้องใช้พลังงาน ถ้าเซลล์สูญเสียการรักษาภาวะคงที่ของ Ca^{2+} ไม่ว่าจะมาจากสาเหตุใดก็ตาม จะทำให้ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ต่างๆ ในระดับที่เกินปกติจนอาจทำให้เซลล์ตายได้ ซึ่งในการรักษาภาวะคงที่ของ Ca^{2+} โดยปกติเซลล์รักษาระดับ Ca^{2+} ในเซลล์ให้มีค่าประมาณ 100 nmol/L หรือน้อยกว่าความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่อยู่นอกเซลล์ประมาณ 10 เท่า แต่เมื่อมีสิ่งเร้าหรือ สิ่งกระตุ้น เช่น ฮอรโมน (hormones), สภาวะเครียด (stress), แสง (light) หรือ เชื้อก่อโรค (pathogenesis) จะทำให้กลไกการรักษาภาวะคงที่ของ Ca^{2+} เสียไป ดังนั้นเซลล์จึงมีกลไกในการรักษาภาวะของ Ca^{2+} ให้คงที่ทั้งภายในเซลล์และไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ซึ่งส่งผลทำให้พืชสามารถปรับสมดุลแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เพื่อให้มีชีวิตอยู่ได้ภายใต้เครียดจากการขาดน้ำและสภาวะดินเค็มได้ จากรายงานพบว่า ยีน *calreticulin (CRT)* ถูกแยกได้ครั้งแรกจากข้าวบาร์เลย์ (Chen Chandler *et al.*, 1994), ผักขม (Menegazzi *et al.*, 1993), ยาสูบ (Denecke *et al.*, 1993), ข้าวโพด (Kwiatkowski *et al.*, 1995, Dresselhaus *et al.*, 1996), Arabidopsis (Nelson *et al.*, 1997) และ ข้าว (Li and Komatsu, 2000) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีน *calreticulin* ในพืช โดยการถ่ายฝากยีน *calreticulin* จากข้าวโพดเข้าสู่พืชอะราบิโดพซิส พบว่า เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะมีการสะสม Ca^{2+} เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับพันธุ์ wide type (Wyatt *et al.*, 2002) เมื่อถ่ายฝากยีน *calreticulin* จากข้าวสาลีเข้าสู่ยาสูบ พบว่า ยาสูบที่มียีน *calreticulin* เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่ายาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากยีน (Jia *et al.*, 2008) และเมื่อถ่ายฝากยีน *calreticulin* ที่แยกได้จากข้าวโพดเข้าสู่มะเขือเทศ พบว่า มะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณของแคลเซียม คลอโรฟิลล์ และผลผลิตเมล็ดเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำโดยเปรียบเทียบกับพืช wild type สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *calmodulin (CaM)* ในพืชนั้น ได้มีการศึกษาวิจัยโดยการสร้างข้าวตัดแปลงพันธุกรรมจากยีน *OsCam1-1* ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ 35SCaMv ภายในเวกเตอร์ pCAMBIA1301 โดยวิธีอะโกรแบคทีเรีย พบว่า ข้าวแปลงพันธุ์ดังกล่าวมีอัตราการเจริญเติบโตและความสามารถในการทนเค็มสูงกว่าข้าวที่เป็นชุดควบคุม อีกทั้งยังมีปริมาณ ABA สูงกว่าข้าวที่เป็นชุดควบคุมเมื่อปลูกในภาวะปกติและภาวะที่ได้รับความเครียดจากความเค็มอีกด้วย (Buaboocha, 2009)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการโคลนยีน และศึกษาการแสดงออกของยีนเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็ม หากสามารถโคลนยีน *calreticulin* และ *calmodulin* ได้ และยีนที่ได้มีการแสดงออกในลักษณะทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืชต้นแบบ

(ยาสูบ) จะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจเพื่อให้ทนทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่มีลักษณะทนแล้ง ได้แก่ พันธุ์ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ โดยนำเมล็ดพันธุ์มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำ 2 – 3 วัน/ครั้ง เมื่ออายุประมาณ 30 วัน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนทั้งจีโนม และเมื่ออายุประมาณ 45 วัน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *Calreticulin (CRT)* และ *Calmodulin (CaM)*

ทำการศึกษาและค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด ได้แก่ ยีน *CRT* และ *CaM* ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserved region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนคือ GCRT (forward) GCRT (reverse) GCaM (forward) และ GCaM (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนคือ CCRT (forward) CCRT (reverse) CCaM (forward) และ CCaM (reverse) CRTXbal (forward) CRTKpnl (reverse) CaMBamHI (forward) และ CaMKpnl (reverse) (ตารางที่ 1)

3. การโคลนยีน *Calreticulin (CRT)* และ *Calmodulin (CaM)* ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 เมื่ออายุได้ 1 เดือน นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตัดใบอ่อนของอ้อยประมาณ 50–100 กรัม บดในโถพร้อมกบไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP1 buffer หรือ GPX1 buffer 400 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที เติม GP2 buffer 100 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 นาที วาง Filter column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน Filter column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ทิ้ง Filter column และย้าน้ำใสลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP3 buffer 750 ไมโครลิตร (1.5 เท่าของสารละลาย DNA ที่ได้) เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 5 วินาที วาง GD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube และเก็บ GD column ไว้ (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง เติม Wash

buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที่ นาน 30 วินาที เทน้ำใส่ทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที่ อีกครั้ง นาน 3 นาที เพื่อให้ Column แห้ง ย้าย GD column ที่แห้งแล้วลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Preheat Elution buffer 100 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ Column matrix ทิ้งไว้ นาน 3 – 5 นาที จนกระทั่ง Elution buffer ถูกดูดซับโดย matrix ได้มากที่สุด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที่ นาน 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ เก็บสารละลาย DNA (original) ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้ นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปวัดค่าความเข้มข้น (Optical Density : OD) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอของข้าวโพดที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CRT* และ *CaM* ที่ออกแบบไว้จำนวน 2 คู่ ได้แก่ GCRT (forward) GCRT (reverse) GCaM (forward) และ GCaM (reverse) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมอเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μM Gene Specific Primer (forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การโคลนยีน *CRT* และ *CaM* เข้าสู่เวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุณหภูมิ $50 - 60^{\circ}\text{C}$) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที่ นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TA Cloning Kit (Invitrogen,

USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR[®]2.1 vector 2 ไมโครลิตร, 5X ExpressLink[™]4 DNA Ligase Buffer 2 ไมโครลิตร, ExpressLink[™]4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝาก ยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH₂O) เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มี insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET[™] Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เเทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET[™] spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET[™] spin column วางบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *CRT* และ *CaM* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Kpn*I (*CRT*) และ *Bam*HI + *Apa*I (*CaM*) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *CRT* และ *CaM* มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3' และ M13 (reverse) 5'

–GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3' ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสติดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมลไพโรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH₂O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extension 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH₂O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป และโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

4. การโคลนยีน *Calreticulin (CRT)* และ *Calmodulin (CaM)* ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 เมื่ออายุได้ 45 วัน งดให้น้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของข้าวโพดประมาณ 5 มิลลิกรัม บดในโถพร้อมกบไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 – 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ย้ายส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 – 30 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปตละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติม Script Guard RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้อาร์เอ็นเอถูกย่อย วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลาย อาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

4.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT-PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ โดยใช้ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One-Step RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CRT* และ *CaM* คือ CCRT (forward) CCRT (reverse) CCaM (forward) และ CCaM (reverse) ในปริมาณของปฏิกิริยาพอลิเมอเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย total RNA 10 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม, 10 μ M Gene Specific Primer (forward), 10 μ M Gene Specific Primer (reverse), 2X Reaction Mix, 2U SuperScript™III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 55°C 30 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 68°C 5 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

4.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *CRT* และ *CaM* เข้ากับเวกเตอร์ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

4.3.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *CRT* และ *CaM* เข้ากับเวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุณหภูมิ 50 – 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) ในปริมาณของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR®2.1 vector 2 ไมโครลิตร, 5X ExpressLink™T4 DNA Ligase Buffer 2 ไมโครลิตร, ExpressLink™T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15

กรัม Bacto-Agar, ddH₂O) เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

4.3.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *CRT* และ *CaM* ในเวกเตอร์

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นส่วนของยีนสอดแทรกอยู่ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เติมน้ำล้างเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติมน้ำล้างเซลล์ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติมน้ำล้างเซลล์ 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำล้างเซลล์ 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำล้างเซลล์ 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *CRT* และ *CaM* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Kpn*I (*CRT*) และ *Bam*HI + *Apa*I (*CaM*) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *CRT* และ *CaM* มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3' และ M13 (reverse) 5' –GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3' ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมลไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH₂O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extension 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (∞) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำล้างเซลล์ (ddH₂O) 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20

นาที่ เทส่วนใส่ทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลง นาน 5 นาที นำไปหมუნเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การโคลนยีน *Calreticulin (CRT)* และ *Calmodulin (CaM)* ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์

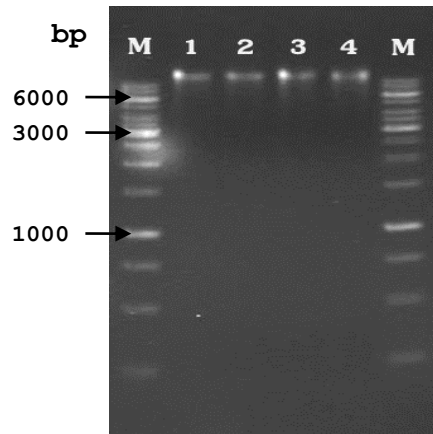
จากการโคลนยีน *Calreticulin (CRT)* และ *Calmodulin (CaM)* ในส่วนของยีนทั้งจีโนม โดยทำการออกแบบไพรเมอร์บริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CRT* และ *CaM* จำนวน 2 คู่ คือ GCRT (forward) GCRT (reverse) GCaM (forward) และ GCaM (reverse) (ตารางที่ 1) โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ (ภาพที่ 1ก) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.7 และ 2.5 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 2ก และ 2ข)

ตารางที่ 1. แสดงลำดับเบส, Melting temperature (Tm) และ % GC content ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR และ RT-PCR กับยีน *Calreticulin (CRT)* และ *Calmodulin (CaM)*

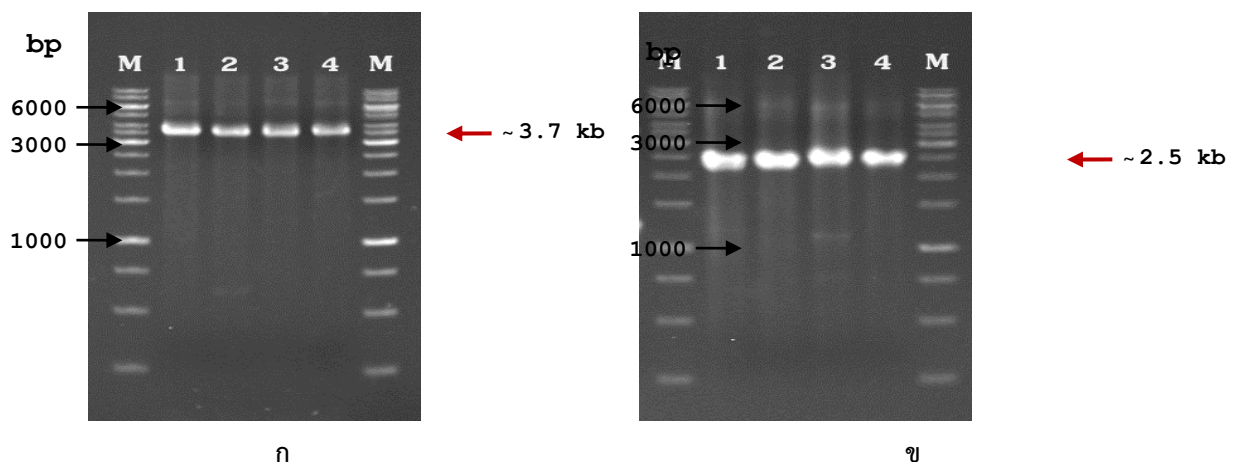
Primer name	Base sequence (5' → 3')	Size (bp)	Tm (°C)	GC content (%)
GCRT_F	GCT CGC TCT CCG CAG TGA CCG ATA GAA CAC G	31	67.3	61.3
GCRT_R	TGC AAA GTC CAC ACG CGT GAC GGA ACC AGT GC	32	69.3	59.4
GCaM_F	CAT CCG CTC AGG CCA ATC AAC AGA AGT G	28	63.0	53.6
GCaM_R	CCA GGT ATC TGA TGT CGC GTT CCC ATG	27	62.6	55.6
CCRT_F	ATG TCA GCT TCA CCG GCA ACG CCT TGT GCT CC	32	73.6	59.4
CCRT_R	TTA TGA AAA GGG GTT GTC AAA GCG TAT ACC	30	64.6	40.0
CCaM_F	ATG GCG GAC CAG CTC ACC GAC GAG C	25	68.6	68.0
CCaM_R	TCA CTT GGC CAT CAT AAC CTT GAC GA	26	60.1	46.2

นำดีเอ็นเอของยีน *CRT* และ *CaM* ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ TA Cloning Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5 α คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่ามียีน *CRT* และ *CaM* นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจำนวน 16 โคลน (ภาพที่ 3ก และ 3ข) และตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Kpn*I (*CRT*) และ *Bam*HI + *Apa*I (*CaM*) พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *CRT* และ *CaM* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ คือ ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์

(vector) และขนาดประมาณ 3.7 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน *CRT* และ ขนาดประมาณ 2.5 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน *CaM* ตามลำดับ (ภาพที่ 4ก และ 4ข) นำพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่มียีน *CRT* และ *CaM* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน *CRT* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 3,699 คู่เบส (ภาพที่ 5) และยีน *CaM* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 2,472 คู่เบส (ภาพที่ 6)

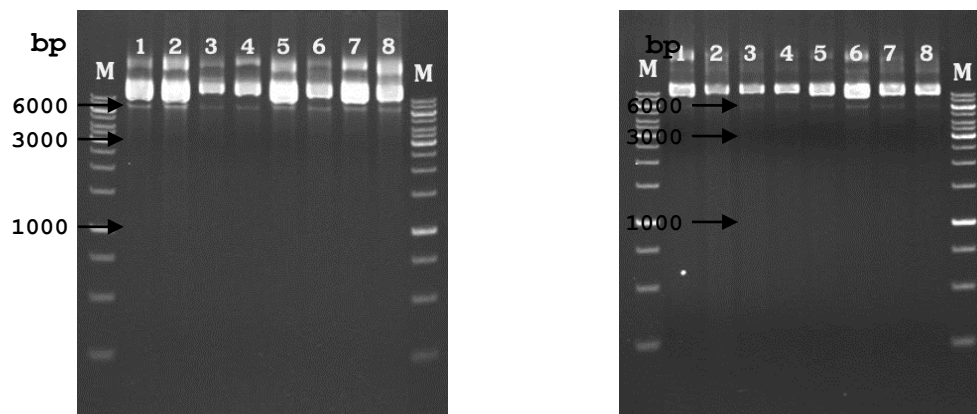


ภาพที่ 1. แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

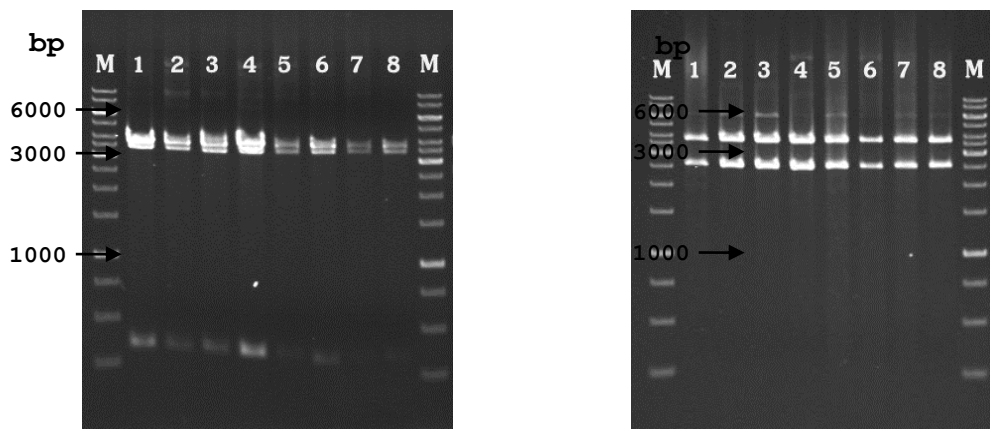


ภาพที่ 2 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *calreticulin (CRT)* ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ GCRT (forward) และ GCRT (reverse) ด้วยเทคนิค PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *calmodulin (CaM)* ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ GCaM (forward) และ GCaM (reverse) ด้วยเทคนิค PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



- ภาพที่ 3 ก. แสดงรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CRT*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = พลาสมิด ดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)
- ข. แสดงรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CaM*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = พลาสมิด ดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



- ภาพที่ 4 ก. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน *CRT* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)
- ข. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน *CaM* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และ *ApaI*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

1 gctcgcctctc cgcagtgacc gatagaacac gaccttaggg gttcagatcg gatcgggaagc
 61 ttccataagt ttccatcggg cgtcgcgggt **atgg**cgatcc gcaaggggtc ttcgtacgcc
 121 gtcgcggcac ttctcgcgct cgcctctgtc gccgcgctcg caggggaggt cttcttccag
 181 gagaagttcg aaggtgattc ccttgatccc accactcgaa cagtgcgac tggctctgtg
 241 cgatgcgcc tatgtcttg cccgaccgcc cgaatgcagt gcgtgtgaaa tggtaggcat
 301 taatttcgtc ggaccagtgg gtttttggtc cgttcatgcg atttaacagt gtgtaggtgt
 361 gtgacgggtg tcgagatttg ctctgaagat ctgggtggcat gtatatatgg tgttcggtac
 421 ttcagttatc tccgtagca tggatcctgc ggttgtgatt tttcgtgtgg tagtttggtg
 481 aatctgttcg aatgggtgtg cctttgggtca gcattcatat tcggctgtat agtgcggtga
 541 atcttatggc atttctgctg aggcgatcaa attttatact atttgtacc ttagacctgaa
 601 tgtgttttga tttgggatta tgtgttgatg tttatttcac ctagattagg aacatgtcgt
 661 gcagttctcc cgagtaagtt tggaccagct ggtggttcac attaggaatt ataggatctc
 721 caatactgac tgtcattttt gttgtaccgc gaagcatttt ctaattttga cattaccctt
 781 catgacattt tgcactgttg tgatggccag atggctggga aagtaggtgg gtcaagtctg
 841 agtggaaaga ggatgagaac atggctgggt aatggaacca cacctcggga aaatggaatg
 901 gagatgccga ggacaaaggt aaattccaaa acatcagaag attggtggtt tcagtttatt
 961 tatgagttgc tcaacgtgtt tcttgttgca ggtattcaaa cctccgagga ttacaggttc
 1021 tatgccattt cagccgaata ccctgagttc agcaacaagg ataagacct ggtgctgcag
 1081 ttctctgtga agcacgagca gaagcttgac tgcggcgggtg gctacgtcaa attgctgggt
 1141 ggtgatgtag accagaagaa atttgggtgga gacacatctt acaggtagac tttgaacaat
 1201 attggtgcgc tccttctccc tatcatatct catcttgtac atgtaacctc attcttctgt
 1261 actgcagcat tatgtttgga ccagatatct gtgggtacag caccaagaag gttcacacta
 1321 tcctgaccaa ggatggcaag aaccacttga tcaagaagga tgtgccttgt gagactgatc
 1381 agttgactca tgtttact ttgatcatcc gtcctgatgc aacatacagc attctcattg
 1441 ataataagaa gaagcaaaact ggcagcatct acgagcattg ggatattctt ccccctaaga
 1501 aaatcaagga cccagaggct aagaagggtg gaagagttaa tatttattat tgtgtttcaa
 1561 tttctttggt tgcacctgtt tggaaataat tgagatttat gtgttgattg cagcctgagg
 1621 actgggatga caaggagtac attcctgacc ctgaggacaa gaagccagag gtagtgttt
 1681 atttcttgct tggcgcctta agcttatgtc tcttacctga ccacaattta agagcttcta
 1741 ttgtatagta tttaatgaga aatttgctat tacgcaagtc actagtttcc ttaattttgt
 1801 agaacagtac agctcattgc cttttttcca ttactttcca gggctatgat gatattcca
 1861 aggaaattcc tgacctgat gctaagaagg tacttatgtg gttatttggt atgtagtttc
 1921 tgtcatatga ttaataacat gggatataaa attctaaaat gtccattgca gcctgaggac
 1981 tgggacgatg aggaagatgg tgaatggact gccctacca ttccaacc agaatacaag
 2041 ggaccatgga aacaaaaggt atggcagttc ctttaacct taaactgaca gcaattcgta
 2101 ttctgatatc tgacaacatg ttgtttcact tgccagaaaa tcaagaacct gaactaccag
 2161 ggtaaatgga aggcacctat gattgacaac ccaggatgt ttgcctgaaa cggatcctta
 2221 tatcttctta ctgtttggtt attactacgt cccttctcga atatttgcg ctcgctagtt
 2281 cttttttgaa ctaaaacgcg acaataaaaa aagaaaggag tgagtagaat gttagtgtg
 2341 aatctaattc ttgtgcatca cagattttaa ggatgatcca tacatttacg ccttcgacag
 2401 cttgaagtac attggcattg agctgtggca ggtcgggtgt ggatagtgat tgtcggatct
 2461 tcctctctct tgttcagaag gacatcacag ttatgcctct cttttttttg tttttctatg
 2521 tacaggttaa atcgggact ctgtttgaca acatcatcat cactgatgac cctgcggttg

ภาพที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calreticulin* (*CRT*) ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NSW 1)

```

2581 ccaagacttt tgcagaggag acctggggca agcacaagga ggtgtgtttt tcctctcagt
2641 aacatctcac tcagtaactc atggtttatt caggcacatg cactaactat gcttgttctt
2701 aacaggcaga aaaggctgct tttgatgagg ccgagaaaaa gaaggaagaa gaggtatata
2761 tttaaacacc atatatagtg tttttgtgac ggggtgatgc atgtgtccct tatattgggt
2821 tttgctgtat gttgtgtcct tgccatgcat cctggtttat gttgacgtag ggaatagcct
2881 tgttaggttg aactgaatga actataacca gtggcaagtg catgtgagtt taacagataa
2941 aactatcgag tttaacgctc cgttgtgttt ttttgtgtcc tgcatatcaa cagtttggct
3001 gaactcatct ttatgaacca caaggctctgt gcttttctgt tggagggtttg cacgtcgtcg
3061 attgtgaatc gcttttctct gtcaacagga tgccgccaaag ggtgggggatg atgaggatga
3121 tgacctagag gtcagcattg catcttcata ttcttcatgg gccattacgt ttcatatatg
3181 cagcttaa at gatctaataca ataaattgta catggtatcg gtctcaggat gaggaagacg
3241 atgagaaggc agacgaggac aaggccgact ctgatgccga ggatagcaag gattctgatg
3301 atgagaagca gcacgtaaga aactctttct tgagacctga ccaagcattt gtcattgtctc
3361 tctctgtcta atgcccctcac acgcctgttg tgatgaaatg ccatttgcag gacgagctct
3421 agatggcgag gatgatgttg cggccgctgg cctagattta tcagctctgc cactatgaag
3481 ttcttttttt ttcccgtgac caccaagaat gtagaacact gctaataagc agatggacag
3541 tttgggtcgc cgtagcgtt tgtagtcatt tttcccatta aagccgataa cactgaacaa
3601 ggaggaaagga tcttttgccc acgattgtta tctccctttc tgatgttaaa tgtgagcctt
3661 tgcgaaagca ctggttccgt cacgcgtgtg gactttgca

```

ภาพที่ 5. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calreticulin* (CRT) ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NSW 1) (ต่อ)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน CRT ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 14 exons (ตารางที่ 2) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (5' Untranslated region หรือ 5' URT) มีขนาดเท่ากับ 90 คู่เบส และทางปลาย 3' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (3' Untranslated region หรือ 3' URT) มีขนาดเท่ากับ 277 คู่เบส (ภาพที่ 5) และยีน *CaM* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 2 exons (ตารางที่ 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (5' Untranslated region หรือ 5' URT) มีขนาดเท่ากับ 102 คู่เบส และทางปลาย 3' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (3' Untranslated region หรือ 3' URT) มีขนาดเท่ากับ 170 คู่เบส และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง PolyA signal (AAATAA) อยู่ในส่วนของ 3'UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 2,318-2,323 (ภาพที่ 6)

```

1  catccgctca  ggccaatcaa  cagaagtgac  gcgagcacga  gcacacatcc  cctcccttct
61  tcggttattc  ctcgtcgctg  gccctcgccg  cagacctctg  ccatggcgga  ccagctcacc
121 gacgagcaga  tcgcgaggtt  caaggaggcc  ttcagcctct  tcgataagga  tggcgacggt
181 acccacctgg  cccctccctt  tttcctccct  gctaggctcc  ttgatctcgc  ggccgcatcg
241 ggatcgagct  cccgtcccgc  cccgatacag  cacgaattgt  ggggttcgtg  taggagctgt
301 tgctagtagg  gctctagatc  cggtcggccg  tgtgctgtgg  tgcttaggat  ttggtgatct
361 ctgagtcgat  actcgatagg  acattcgatg  gtattttggg  cgtatttgcg  tgcagcgatt
421 tagcacctgg  ttatgtattt  atttacggct  accatctggt  tattgtataa  gattttacca
481 tcaggtggca  gggcagtaaa  atgatgtttt  tgggagttct  actcacggcg  ggagaacgat
541 ttgggatcga  gaatttattg  ccttacccta  gcagggctgg  aattcaaagt  tctcgtaaag
601 cattctaggg  aatggacagc  gaacgtagca  tgatctgata  attcaacttt  gcgggtcagc
661 ttatcagcgt  ggttgcataa  tctacgtatc  tagtgccagt  agatgtatcg  actacgacta
721 tctcgagcaa  gcagcttctc  catcccctat  ccccatattc  aaactccact  ctgccaatac
781 tgctgcagtc  tacttttcaa  aatagtgttt  tacacgggca  tataattaag  ctgctggagg
841 cagtcagaga  atgtgttgat  gttggagcaa  gatagctgag  gatgtggatt  ctgactatgc
901 cttgaaataa  agttgttaat  ccggtgtgtg  tctactaata  tgtaagcag  tagccattct
961 ttgttttaga  ttttttttct  tttgtacatt  ttctttaaat  gtgtatcttt  gtttgtgttt
1021 catcaatgta  tgttttggta  tatgatagct  ttccagttgg  tcgtaaagtg  cttactgtgt
1081 agtcttagac  caacccatga  ttgtggagca  ctattatta  gccacttctc  atcactgata
1141 atctctggaa  gctttttact  gttctgttga  ataattacta  tagtactaac  aagttgtaca
1201 cacaggctga  actagtgcac  gatttgtgcc  atacctatta  cacgttatca  tttttatfff
1261 gttctacatc  tgttctcgaa  aatttgtcgc  ccgctagttc  attttttaat  taaaacgcga
1321 caaataaaaa  gaacggtggg  agtattttac  acattaatag  ttggtaagca  tgggtgcttca
1381 ttaaagtgtc  aggaaacaga  ttgagtttat  taaagctgtg  atgcattaat  ctcttcattt
1441 tacaccgtta  gatggatggt  ggtttttact  atattgtttc  cccaagtgtt  catgatatta
1501 tgtgatatag  atccataaat  tgaccgcttg  tatttggtag  tggatgacca  acatcattga
1561 tattttgtga  aatgactgt  cactttacta  tttcctcatg  tacttgttta  aataactttc
1621 atccttctgt  tgtaatgcaa  cattgtgcta  gtttagatga  ctccctccgg  agcaatgtct
1681 gtttaccatt  tttttcctgc  tactgtaagt  ttttgtttaa  taagagcatg  caagtgattt
1741 ggatgtgctg  ctgaaagtga  tgatggtgtc  tccaaaatgt  gcattttata  agctgcgcat
1801 aatcttaaca  gattcgccac  tgtatttggc  actttgttaa  aacaaaccag  tgatattgat
1861 ggacccttg  atgagaagat  tgttttttcc  caataactaat  ccaagtttgg  tttactcacc
1921 ctctgcaggc  tgcatcacta  ccaaggagct  tggaacggtg  atgcgctccc  ttggccagaa
1981 ccctaccgag  gcagagctgc  aggacatgat  caacgaggtc  gacgccgatg  gcaatgggac
2041 catcgacttc  ccggagtctc  tgaacctgat  ggcgaggaag  atgaaggaca  cggactcggg
2101 ggaggagctc  aaggaggcct  tccgcgtctt  tgacaaggac  cagaacggtt  tcatctcagc
2161 tgccgagctc  cgccatgtca  tgaccaacct  tggcgagaag  ctgactgacg  aggaggtcga
2221 cgagatgatc  cgtgaggccg  acgtcgacgg  cgacggccag  atcaactacg  aggagtctgt

PolyA signal
2281 caaggttatg  atggccaagt gaggagcggg  ccccggtg aaa taagtatcta  tggattgaag
2341 cgaattatca  ggcacacaag  ctgtactttg  tcatgtccct  ttgagttacg  catcagtgtc
2401 atgcaggtgg  taatgtcttg  tagtgggtccg  ttttaggcggg  gtagtcatgg  gaacgcgaca
2461 tcagatacct  gg

```

ภาพที่ 6. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calmodulin (CaM)* ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NSW 1)

ตารางที่ 2. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calreticulin (CRT)* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก (exon) บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.genes.mit.edu/GENSCAN.html

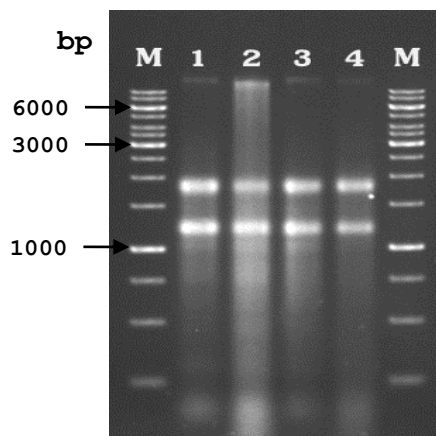
ลำดับที่	ชนิดของยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์สิ้นสุด (bp)	ความยาว exon (bp)
1.01	Initial exon (ATG to 5' splice site)	91	193	103
1.02	Internal exon (3' to 5' splice site)	811	918	108
1.03	Internal exon (3' to 5' splice site)	992	1184	193
1.04	Internal exon (3' to 5' splice site)	1268	1526	259
1.05	Internal exon (3' to 5' splice site)	1614	1670	57
1.06	Internal exon (3' to 5' splice site)	1842	1889	48
1.07	Internal exon (3' to 5' splice site)	1972	2058	87
1.08	Internal exon (3' to 5' splice site)	2137	2194	58
1.09	Internal exon (3' to 5' splice site)	2364	2431	68
1.10	Internal exon (3' to 5' splice site)	2526	2621	96
1.11	Internal exon (3' to 5' splice site)	2706	2753	48
1.12	Internal exon (3' to 5' splice site)	3089	3130	42
1.13	Internal exon (3' to 5' splice site)	3228	3314	87
1.14	Terminal exon (3' to stop codon)	3411	3422	12

ตารางที่ 3. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calmodulin (CaM)* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก (exon) บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.genes.mit.edu/GENSCAN.html

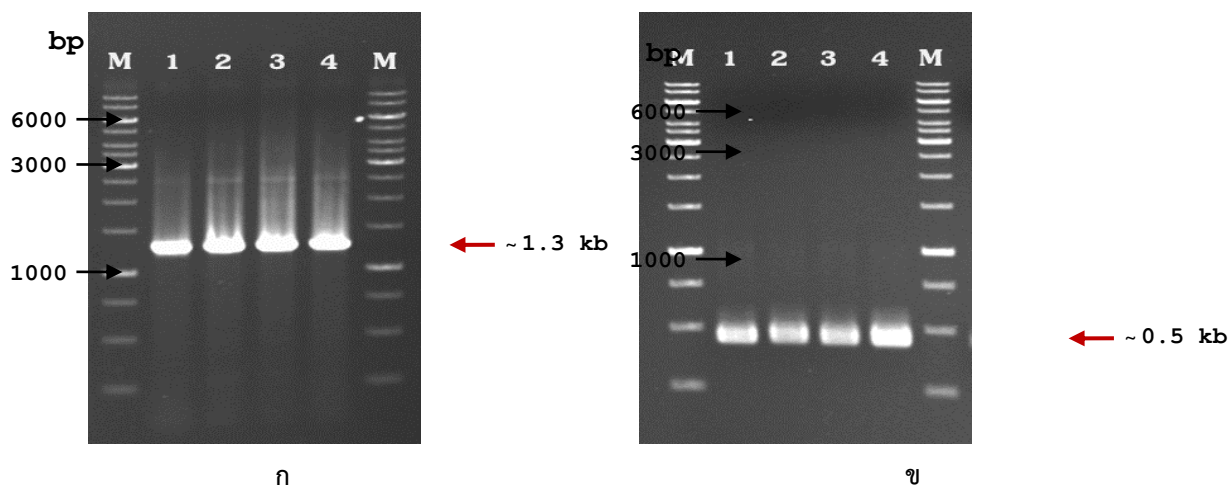
ลำดับที่	ชนิดของยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์สิ้นสุด (bp)	ความยาว exon (bp)
1.01	Internal exon (3' to 5' splice site)	94	178	85
1.02	Terminal exon (3' to stop codon)	1929	2302	374
1.03	PolyA signal	2318	2323	6

2. การโคลนยีน *Calreticulin (CRT)* และ *Calmodulin (CaM)* ในส่วนที่มีการแสดงออก

จากการโคลนยีน *CRT* และ *CaM* ในส่วนที่มีการแสดงออก โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CRT* คือ CCRT (forward) และ CCRT (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CaM* คือ CaM (forward) และ CaM (reverse) (ตารางที่ 1) โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ (ภาพที่ 7) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน *CRT* และ *CaM* ได้ยีนขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส และ 0.5 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 8ก และ 8ข) นำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ TA Cloning Vector และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5 α ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวนํามาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 9ก และ 9ข) และตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของยีน *CRT* และ *CaM* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Kpn*I (*CRT*) และ *Bam*HI + *Apa*I (*CaM*) พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน *CRT* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (vector) และขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน (*CRT* Gene) และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน *CaM* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (vector) และขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส (*CaM* Gene) (ภาพที่ 10ก และ 10ข) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน *CRT* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,263 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *CRT* โดยใช้โปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal บนอินเทอร์เน็ต จำนวน 421 amino acid และอยู่ภายใน Open reading frame ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 1 – 1,263 (ภาพที่ 11) และยีน *CaM* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 450 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *CaM* จำนวน 150 amino acid และอยู่ภายใน Open reading frame ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 1 – 450 (ภาพที่ 12) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *CRT* ที่โคลนได้จากข้าวโพดมีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calreticulin (CRT)* ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays*) (EU961008.1) และข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) (XM_021453764.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 95% ตามลำดับ และยีน *CaM* ที่โคลนได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calmodulin (CaM)* ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays*) (NM_001111985.2) และข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) (XM_002441253.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) (ตารางที่ 5)

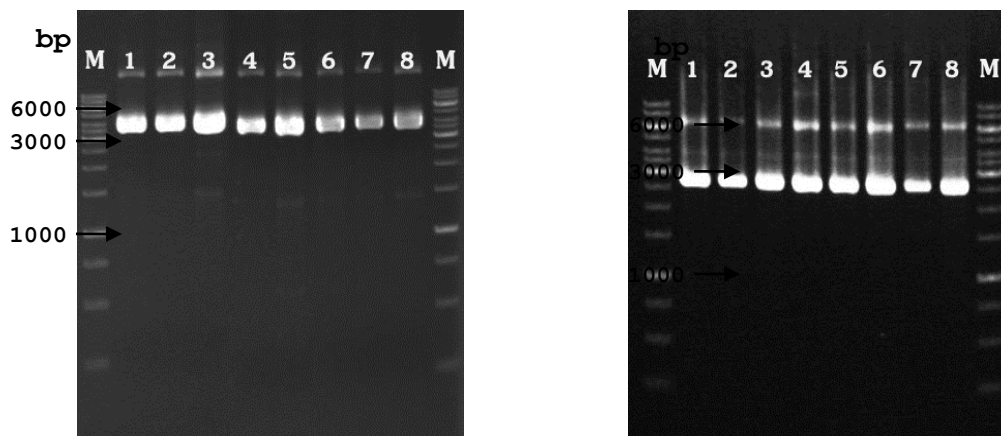


ภาพที่ 7. แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

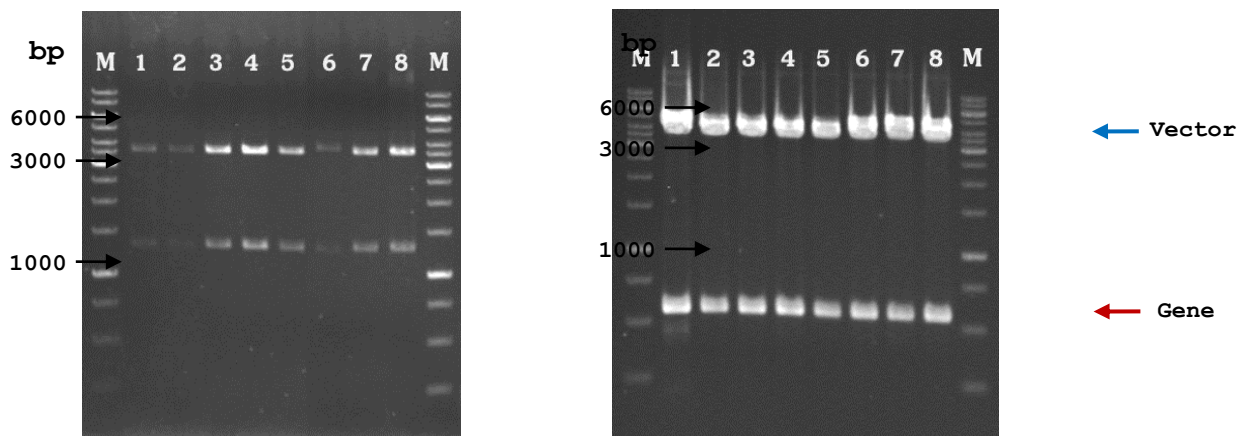


ภาพที่ 8 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ CCRT (forward) และ CCRT (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ CCaM (forward) และ CCaM (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



- ภาพที่ 9 ก. แสดงรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CRT*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = พลาสมิด ดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)
- ข. แสดงรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CaM*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = พลาสมิด ดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



- ภาพที่ 10 ก. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน *CRT* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)
- ข. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน *CaM* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

1 atggcgatccgcaaggggtcttctgtacgccgtcgcggcacttctcgcgctcgcctctgtc
 M A I R K G S S Y A V A A L L A L A S V
 61 gccgcgctcgaggggaggtcttctccaggagaagtgcgaagatggctgggaaagttag
 A A V A G E V F F Q E K F E D G W E S R
 121 tgggtcaagtctgagtggaagaaggatgagaacatggctggtgaatggaaccacacctcg
 W V K S E W K K D E N M A G E W N H T S
 181 ggaaaatggaatggagatgccgaggacaaaggtattcaaacctccgaggattacaggttc
 G K W N G D A E D K G I Q T S E D Y R F
 241 tatgccatctcagccgaataccctgagttcagcaacaaggataagaccctgggtgctgag
 Y A I S A E Y P E F S N K D K T L V L Q
 301 ttctctgtgaagcacgagcagaagcttgactgctgggtggctacgtcaagtctgggt
 F S V K H E Q K L D C G G G Y V K L L G
 361 ggtgatgtagaccagaaggaattgggtggagacacatcttacagcattatggttgacca
 G D V D Q K E F G G D T S Y S I M F G P
 421 gatctctgtgggtacagcaccagaaggttcacactatcctgaccaaggatggcaaaaac
 D I C G Y S T K K V H T I L T K D G K N
 481 cacttgatcaagaaggatgtgccttgtagactgacagttgactcatggttacacctg
 H L I K K D V P C E T D Q L T H V Y T L
 541 atcatccgtcctgatgcaacatacagcattctcattgataatgaagagaagcaaacctggc
 I I R P D A T Y S I L I D N E E K Q T G
 601 agcatctacgagcatgggatattcttccccctaagaaaatcaaggaccagaggctaaag
 S I Y E H W D I L P P K K I K D P E A K
 661 aagcctgaggactgggatgacaaggagtacattcctgaccctgaggacaagaagccagag
 K P E D W D D K E Y I P D P E D K K P E
 721 ggctatgatgatattcccaaggaaattcctgaccctgatgctaaagcctgaggactgg
 G Y D D I P K E I P D P D A K K P E D W
 781 gacgatgaggaaagatggtgaatggactgccccctaccattcccaaccagaaatacaaggga
 D D E E D G E W T A P T I P N P E Y K G
 841 ccatggaaacaaaagaaatcaagaaccggaaactaccagggtaaatggaagacaacctatg
 P W K Q K K I K N P N Y Q G K W K T P M
 901 attgacaaccagattttaaggatgatccatacatttacgcttcgacagcttgaaagta
 I D N P D F K D D P Y I Y A F D S L K Y
 961 attggcattgagctgtggcagggttaaatcgggcaactctgttcgacaacatcatcatcact
 I G I E L W Q V K S G T L F D N I I I T
 1021 gatgaccctcgctggccaaagacttttgagaggagacctggggcaagcacaaggaggca
 D D P A L A K T F A E E T W G K H K E A
 1081 gaaaaggctgcttttgatgaggccgagaaaaaaggaagaaagagatgcccgaagggt
 E K A A F D E A E K K K E E E D A A K G
 1141 ggggatgatgaggatgatgacctagaggatgaggaagacgatgaaaggcagacgaggac
 G D D E D D D L E D E E D D E K A D E D
 1201 aaggccgactctgatgccgaggatggcaaggattctgatgatgaaagcagcagcagctc
 K A D S D A E D G K D S D D E K H D E L
 1261 tag
 *

ภาพที่ 11. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *calreticulin (CRT)* ในส่วนที่มีการแสดงออก

1 atggcggaaccagctcaccgacgagcagatcgcgagggttcaaggaggccttcagcctcttc
 M A D Q L T D E Q I A E F K E A F S L F
 61 gataaggatggcgacggctgcatcactaccaaggagcttgaacgggtgatgctcctctt
 D K D G D G C I T T K E L G T V M R S L
 121 ggccagaaccctaccgagggcagagctgcaggacatgatcaacgaggtcgacgccaatggc
 G Q N P T E A E L Q D M I N E V D A D G
 181 aatgggaccatcgacttcccggagtctcctgaaacctgatggcgaggagaagatgaaggaca
 N G T I D F P E F L N L M A R K M K D T
 241 gactcggaggagagctcaaggaggccttccgctctttgacaaggaccagaacagggttc
 D S E E E L K E A F R V F D K D Q N G F
 301 atctcagctgccgagctccgcatgtcatgaccaaccttggcgaagaagctgactgacgag
 I S A A E L R H V M T N L G E K L T D E
 361 gaggtcgatgagatgatccgtgaggccgacgtcgacggcgacggccagatcaactacgag
 E V D E M I R E A D V D G D G Q I N Y E
 421 gagttcgtcaaggttatgatggccaagtga
 E F V K V M M A K *

ภาพที่ 12. แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *calreticulin (CRT)* ในส่วนที่มีการแสดงออก

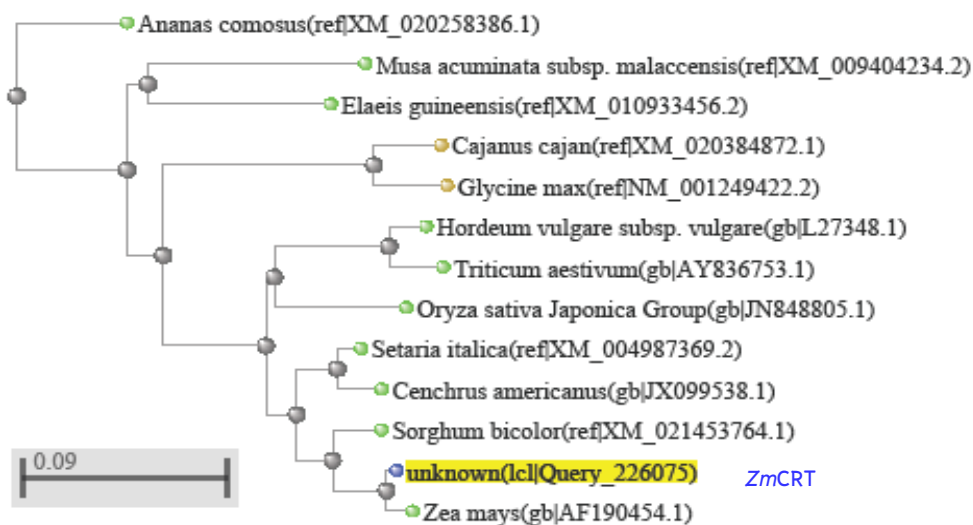
ตารางที่ 4. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์ นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ต โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Zea mays clone 230424 calreticulin precursor, mRNA, complete cds.	2232	2335	100%	0.0	99%	EU961008.1
Zea mays calreticulin (<i>CRT</i>) mRNA, complete cds.	2188	2292	100%	0.0	98%	AF190454.1
Sorghum bicolor calreticulin (LOC110432839), transcript variant X1, mRNA	1997	2106	100%	0.0	95%	XM021453764.1
Setaria italic calreticulin (LOC101774614), mRNA	1885	1987	100%	0.0	93%	XM004987369.2
Cenchrus americanus calreticulin (<i>CRT</i>) mRNA, complete cds.	1806	1908	99%	0.0	92%	JX099538.1

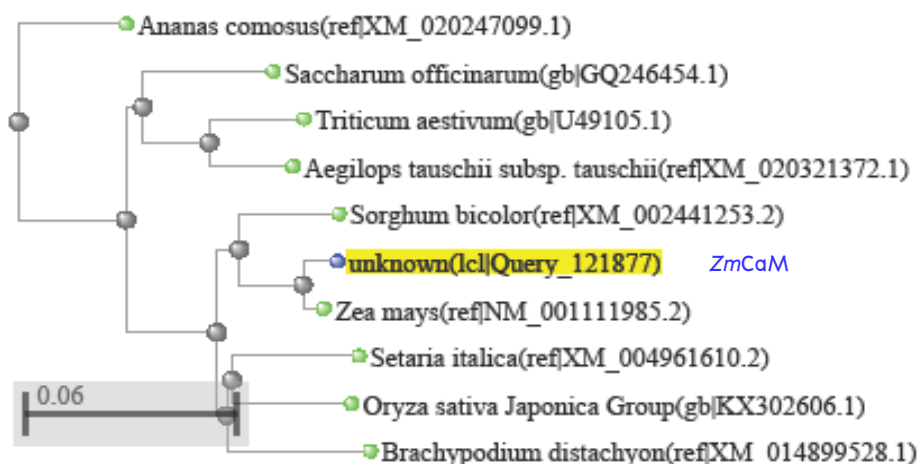
ตารางที่ 5. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์ นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ต โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Zea mays calmodulin, mRNA	780	882	100%	0.0	98%	NM001111985.2
Sorghum bicolor calmodulin (LOC8064169), mRNA	699	790	100%	0.0	94%	XM002441253.2
Brachypodium distachyon calmodulin (LOC100837560), mRNA	672	770	100%	0.0	93%	XM014899528.1
Setaria italic calmodulin (LOC101778363), mRNA	668	716	100%	0.0	93%	XM004961610.2
Oryza sativa clone KCB717D05 calreticulin-2 mRNA, complete cds.	654	696	100%	0.0	92%	KX302606.1

เมื่อนำข้อมูลยีน *calreticulin* (CRT) และ *calmodulin* (CaM) จากข้าวโพดมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน CRT และ CaM ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi) พบว่า ยีน CRT ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวโพด (*Zea mays* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชกลุ่มไบเลียงเดี่ยว ได้แก่ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) และ ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* L.) มากกว่าพืชกลุ่มไบเลียงเดี่ยว ได้แก่ สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) และ กัลย (Musa acuminata Colla) (ภาพที่ 13) ยีน CaM ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวโพด (*Zea mays* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชกลุ่มไบเลียงเดี่ยว ได้แก่ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) และ พืชตระกูลหญ้า (*Brachypodium distachyon* L.) มากกว่าพืชกลุ่มไบเลียงเดี่ยว ได้แก่ สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) และ อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 13. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *calreticulin* (CRT) ที่โคลนได้จากข้าวโพด เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi



ภาพที่ 14. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *calmodulin* (CaM) ที่โคลนได้จากข้าวโพดเปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

สรุปผลการวิจัย

การโคลนยีน *cereticulin (CRT)* และ *calmodulin (CaM)* ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์จากจีโนมมิกดีเอ็นเอของข้าวโพด จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ยีน *CRT* และ *CaM* ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 3,699 คู่เบส และ 2,472 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *CRT* และ *CaM* มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 14 exons และ 2 exons ตามลำดับ

การโคลนยีน *CRT* และ *CaM* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำข้อมูลยีนที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกทางปลาย 5' และ 3' พบว่า ยีน *CRT* และ *CaM* ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,263 คู่เบส และ 450 คู่เบส ตามลำดับ และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน (ORF) ของยีน *CRT* และ *CaM* จำนวน 421 amino acid และ 150 amino acid ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *CRT* ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calreticulin (CRT)* ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays*) และ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 95% ตามลำดับ และยีน *CaM* ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calmodulin (CaM)* ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays*) และ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ

กิจกรรมที่ 3

การศึกษาพัฒนาพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่และการทดสอบพืชตัดแปลงพันธุกรรม

การทดลองที่ 3.1

การถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) เข้าสู่หน้าวัว Transformation of Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) Gene in Anthurium.

Transformation of Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) Gene in Anthurium.

กุหลาบ คงทอง ประสาน สืบสุข จีราพร แก่นทรัพย์
อำไพ สีนพัฒนานนท์ กัลยา เกษะกลาง

คำสำคัญ

หน้าวัว, ยีนควบคุมสีดอก, Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H), ถ่ายยีน

บทคัดย่อ

ยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H)* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มรงควัตถุแอนโทไซยานินสีน้ำเงินหรือสีม่วง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการถ่ายยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)* ที่โคลนได้จากอัญชันสีน้ำเงินและนำเข้าสู่เวกเตอร์แบบไบนารี pMDC32 ได้เป็น *CtF3'5'H.pMDC32* ซึ่งเป็นชุดยีนที่โคลนได้และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกแล้วในยาสูบ (โดยกุหลาบ และ ประสาน 2557) มาทำการถ่ายสู่หน้าวัวโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 สามารถนำไปถ่ายฝากสู่หน้าวัวพันธุ์โซเนตและพันธุ์ราปิโด ได้แคลัสหน้าวัวหน้าตาที่ได้รับการถ่ายยีน และผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin สำหรับนำไปเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไป

Abstract

Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H) gene is involved in flavonoid pathway leading to the production of the blue or purple-colored anthocyanins. *F3'5'H* from *Clitoria ternatea* was cloned into a pMDC32 binary vector, generating *CtF3'5'H.pMDC32*. The *CtF3'5'H.pMDC32* was introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. *Anthurium spp.* cv. Sonate and cv. Rahpido transformation were performed using the *A. tumefaciens*. The transformation of *F3'5'H* into *Anthurium spp* was successful. The transformed calli of *Anthurium spp.* were selected on media containing hygromycin. Subsequently, they will to be cultured to complete plants and checked by PCR analysis using specific primers.

บทนำ

ในแต่ละปีประเทศไทยได้ผลิตไม้ดอกสำหรับใช้ทั้งภายในประเทศ และส่งออก แม้การผลิตเพื่อป้อนตลาดภายในประเทศจะมีอยู่มาก แต่การผลิตเพื่อส่งออกให้มูลค่าที่สูงกว่า ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก และมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้น เนื่องจากตลาดไม้ดอกเป็นตลาดที่มีผู้ค้าจำนวนมาก มีการแข่งขันสูง ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพเพื่อการผลิตไม้ดอกเพื่อส่งออกเป็นความจำเป็นที่ผู้ผลิตต้องเอาใจใส่ และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในทุกรูปแบบ ปัจจุบันลูกค้าให้ความสำคัญกับสีสันของดอกไม้เป็นอันดับแรก ผู้ผลิตจึงต้องสร้างความแปลกใหม่ในตัวสินค้า เพื่อรักษาและเพิ่มส่วนแบ่งการตลาดให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีสร้างความหลากหลายด้านสีดอกเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้ เป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิต และการส่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

หน้าวัวเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ที่ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลาดต่างประเทศและตลาดภายในประเทศต้องการ นอกจากการผลิตเพื่อ ตัดดอกแล้วยังผลิตเป็นไม้กระถางได้อีกด้วย ประเทศไทยมีพื้นที่การปลูกประมาณ 120 ไร่ กระจายไปทั่วประเทศ ได้แก่ กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี เลย กระบี่ ภูเก็ต ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา ชุมพร สุราษฎร์ธานี เป็นต้น มีผลผลิตทั่วประเทศ ประมาณ 4,800,000 ดอกต่อปี และเพิ่มปริมาณขึ้นทุกปี ปัจจุบันมีความต้องการหน้าวัวที่มีสีสันและรูปร่างแปลกใหม่ มีความหลากหลายมากขึ้น จึงมีการมีการนำเข้าพันธุ์หน้าวัวจากต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศเนเธอร์แลนด์ เมื่อปี 2544 สั่งเข้ามา ประมาณ 140,000 ต้น ปี 2549 ดอกหน้าวัวมี ปริมาณการส่งออก 270,556 ชิ้น มูลค่าการส่งออก 2,220,383 บาท ใบหน้าวัวมีปริมาณ 47,508 ชิ้น มูลค่าการส่งออก 261,552 บาท ต้นหน้าวัวมีปริมาณการส่งออก 1,466 ขวด 42,499 ต้น มูลค่าการส่งออก 972,133 บาท รวมมูลค่าการส่งออก 3,454,068 บาท (http://www.gardencentre.co.th/thai/love_suan/kasat) เป็นผลผลิตจากหน้าวัวพันธุ์ลูกผสมพันธุ์ใหม่ส่วนใหญ่ได้มาจากพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ และมลรัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา เนื่องจากหน้าวัวมีความหลากหลายของพันธุ์มากขึ้น คุณภาพดอกดีขึ้น เทคโนโลยีการปลูกเลี้ยงหน้าวัวในประเทศมีการพัฒนาเพิ่มขึ้น และเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ทั่วประเทศ ประกอบกับทัศนคติในการใช้ดอกหน้าวัวเปลี่ยนแปลงไป จึงมีการนิยมนำดอกหน้าวัวไปใช้งานมงคลมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับดอกไม้อื่นๆ หน้าวัวมีราคาสูงกว่าดอกไม้หลายชนิด รวมทั้งแนวโน้มตลาดดอกหน้าวัวในตลาดโลกขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ทั้งหมดจึงเป็นปัจจัยสนับสนุนให้มีการปลูกหน้าวัวเป็นการค้ามากขึ้น

ในอนาคตหน้าวัวจะมีศักยภาพในการพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกต่างประเทศ ปัจจุบันภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการผลิตหน้าวัว ซึ่งได้พัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมสามารถทำได้แต่มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถผสมพันธุ์ให้ได้สีดอกที่แตกต่างจากโทนสีของพ่อแม่ แนวทางการสร้างหน้าวัวสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่หน้าวัว หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างหน้าวัวพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการส่งออกไม้ดอกในอนาคต การทดลองนี้ทำการถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ซึ่งยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่สำคัญใน

การสร้างรงควัตถุที่ให้ดอกไม้ไม่มีสีน้ำเงินหรือสีม่วงสู่หน้าวัว เพื่อปรับปรุงพันธุ์หน้าวัว ให้มีสีสรรหลากหลาย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกในอนาคต

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การเตรียมพืชสำหรับใช้ถ่ายยีน มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

- 1.1. ฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนใบของหน้าวัว โดยใช้หน้าวัวพันธุ์ ราปิโด ดอกสีชมพู
- 1.2. นำใบหน้าวัวมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS ในสภาพปลอดเชื้อ
- 1.3. ชักน้ำให้ใบหน้าวัวเกิดแคลลัส
- 1.4. เพิ่มปริมาณแคลลัส

เตรียมแคลลัสหน้าวัวสำหรับใช้ในการถ่ายยีน โดยตัดชิ้นส่วนใบอ่อนหน้าวัวพันธุ์ราปิโด และพันธุ์ไซเนต นำมาฟอกฆ่าเชื้อแล้ว นำมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ MS โดยทำการตัดใบหน้าวัวเป็นรูป สี่เหลี่ยมขนาด 0.5-1 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS วาง 5 ชิ้น/plate เลี้ยงจนกระทั่งเกิดเป็นแคลลัส และเพิ่มแคลลัสให้ได้ปริมาณมากเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

2. การถ่ายยีน F3' 5'H เข้าสู่ แคลลัสหน้าวัว มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

- 2.1. เตรียม *Agrobacterium* ที่มี Binary vector pMDC32 + F3' 5'H เพื่อนำไปใช้ถ่ายเข้าสู่หน้าวัว
- 2.2. ถ่ายยีนเข้าสู่หน้าวัวโดยนำแคลลัสหน้าวัวมาเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* ที่มี Binary vector pMDC32 + F3' 5'H
- 2.3. นำแคลลัสหน้าวัวมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS และทำการกำจัดเชื้อส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อ
- 2.4. นำแคลลัสที่ผ่านการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับยีน F3' 5'H สำหรับนำมาเลี้ยงและตรวจสอบขั้นต่อไป

เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย LBA4404 ที่มีพลาสมิด *Ct F3'5'H.pMDC32* (กุหลาบ และ ประสาน 2555) (Figure 1) มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP (peptone 10 g/l +Yeast extract 10 g/l , NaCl 5 g/l pH 7.0) ที่เติม Kanamycin 50 μ g/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง spin down และ resuspend pellet bacteria ด้วย co-culture media ที่ประกอบด้วยอาหารเหลว สูตรMS ที่เติม NAA 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 2 mg/l sucrose 3 % pH 5.7 ในอัตราส่วนเชื้อ *Agrobacterium* : อาหารเหลว เป็น 1 : 10 ให้ได้ OD.600 ประมาณ 0.6-1.0

นำแคลลัสหน้าวัวที่ได้จากการเลี้ยงใบหน้าวัวที่เตรียมไว้มา เลี้ยงเขยาร่วมกับ *Agrobacterium* 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ แล้วซับเนื้อเยื่อให้แห้งด้วยกระดาษกรอง เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 3 วัน ล้างใบด้วย cefotaxime 500 mg/lg เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่เติม cefotaxime 200 mg/l เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 10 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร

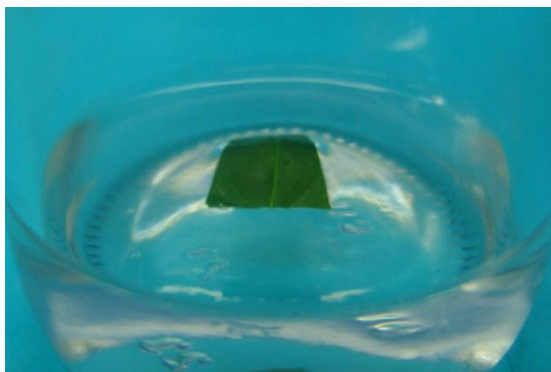
MS ที่เติม hygromycin 50 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี antibiotic เพื่อนำไปเลี้ยงให้พัฒนาสำหรับนำไปตรวจสอบต่อไป

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี
 สถานที่ดำเนินการวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

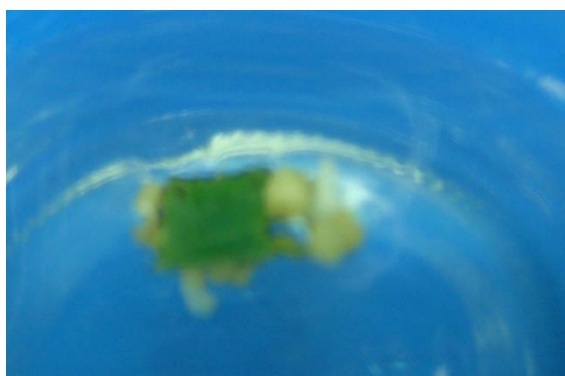
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การเตรียมพืชสำหรับใช้ถ่ายยีน

จากการนำชิ้นส่วนใบอ่อนหน้าวัวมาทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว และเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร MS. ทำให้ได้ชิ้นส่วนใบอ่อนของหน้าวัวในสภาพปลอดเชื้อ ดังภาพที่ 1 จากนั้นชักนำให้ชิ้นส่วนหน้าวัวในสภาพปลอดเชื้อให้เกิดแคลลัส ชิ้นส่วนหน้าวัวเริ่มพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสรอบๆเนื้อเยื่อหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณทำให้ได้แคลลัสจากหน้าวัวในปริมาณเพิ่มมากขึ้น ดังภาพที่ 2,3



ภาพที่ 1. ชิ้นส่วนใบของหน้าวัวในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพที่ 2. การเกิดแคลลัสหลังจากนำมาชิ้นใบหน้าวัวมาเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส



ภาพที่ 3. แคลลัสหน้าวุ้นหลังจากนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเป็นเวลา 9 เดือน

จากการนำแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงชิ้นส่วนหน้าวุ้นในสภาพปลอดเชื้อ มาเลี้ยงในอาหารสูตร MS สำหรับเพิ่มปริมาณแคลลัส ทำให้ได้แคลลัส ในปริมาณเพิ่มมากขึ้น ดังภาพที่ 4 จากการทดสอบระดับไฮโกรมัยซินต่อการเจริญเติบโตของต้นหน้าวุ้นพบว่าระดับไฮโกรมัยซินที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการคัดเลือกหน้าวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีนต่อไป

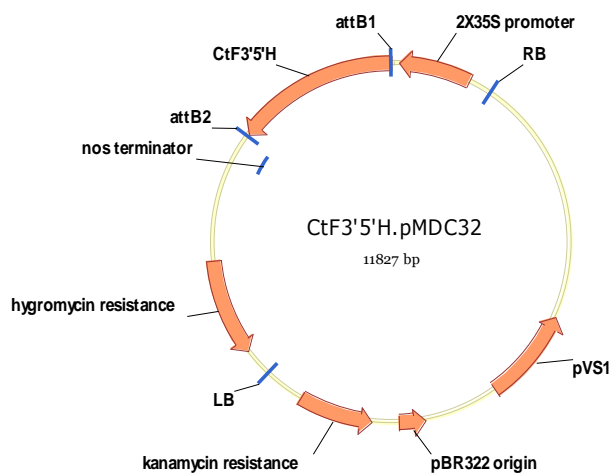


ภาพที่ 4. แคลลัสหน้าวุ้นหลังจากนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเป็นเวลา 12 เดือน

2. การถ่ายยีน F3' 5'H เข้าสู่ แคลลัสหน้าวุ้น

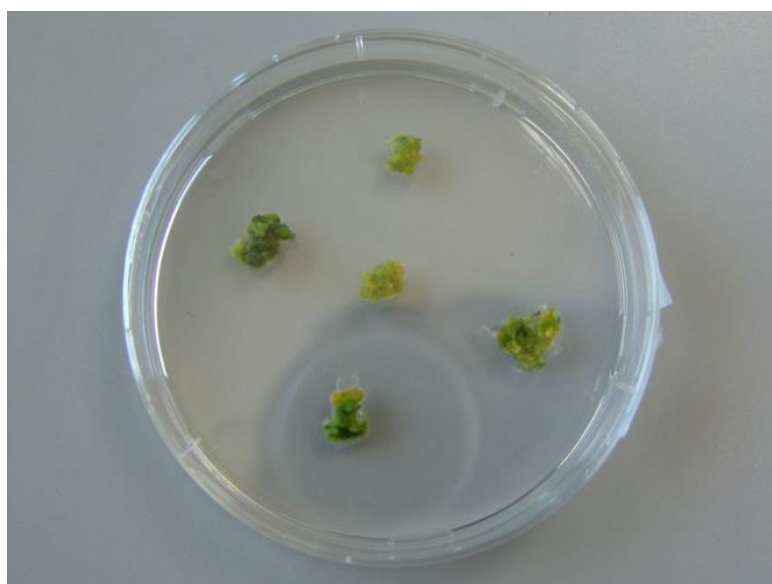
จากการเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียสำหรับนำมาใช้ในการถ่ายยีน โดยการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรีย LBA4404 ที่มีพลาสมิด *Ct F3'5'H.pMDC32* (กุหลาบ และ ประสาน 2555) มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP (peptone 10 g/l +Yeast extract 10 g/l , NaCl 5 g/l pH 7.0) ที่เติม Kanamycin 50 μ g/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำให้ได้ *Agrobacterium* LBA4404 ที่มี พลาสมิด *Ct F3'5'H.pMDC32* สำหรับนำไปใช้ถ่ายเข้าสู่หน้าวุ้น (ภาพที่ 5)

เมื่อทำการ spin down และ resuspend pellet bacteria ด้วย co-culture media ที่ประกอบด้วยอาหารเหลว สูตร MS ที่เติม NAA 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 2 mg/l ในอัตราส่วนเชื้อ *Agrobacterium* : อาหารเหลว เป็น 1 : 10 ทำให้ได้ OD.600 ประมาณ 0.8 ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสหน้าวุ้น

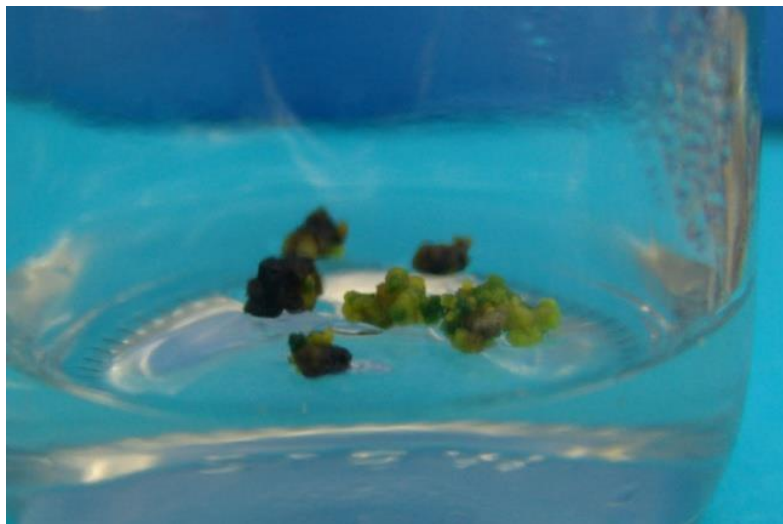


ภาพที่ 5. แสดงแผนที่ของยีน $F3'5'H$ ($Ct F3'5'H$) อยู่ใน เวกเตอร์ pMDC32

จากการถ่ายยีน f35h เข้าสู่แคลลัสหน้าวุ้นโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย โดยการนำแคลลัสหน้าวุ้นที่ได้จากการเลี้ยงใบหน้าวุ้นที่เตรียมไว้มา มาเลี้ยงเขยาร่วมกับ *Agrobacterium* แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 3 วัน ล้างใบด้วย cefotaxime เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตร MS ที่เติม cefotaxime 200 mg/ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม hygromycin 50 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าแคลลัสหน้าวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีนจะเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ ส่วนแคลลัสหน้าวุ้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี antibiotic ทำให้ได้แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน และผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin (ภาพที่ 6 และ 7) สำหรับนำไปเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์และทำการตรวจสอบต่อไป



ภาพที่ 6. แคลลัสหน้าวุ้นที่ผ่านการถ่ายยีนหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 7. แคลลัสหน้าวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีนและผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือก hygromycin เป็นเวลา 30 วัน (สีเขียว=แคลลัส ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วรอดชีวิต , สีน้ำตาล=แคลลัสที่ผ่านการตรวจสอบแล้วไม่รอดชีวิต)

สรุปผลการวิจัย

จากการนำยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ที่โคลนได้จากอัญชันสีน้ำเงินและนำเข้าสู่เวกเตอร์ ได้เป็น *CtF3'5'H.pMDC32* ซึ่งเป็นชุดยีนที่โคลนได้และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกแล้วในยาสูบ (โดยกุหลาบ และ ประสาน 2557) มาทำการถ่ายสู่หน้าวุ้นโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 สามารถถ่ายยีนสู่หน้าวุ้นพันธุ์ไซเนตและพันธุ์ราปิโต ได้แคลลัสหน้าวุ้นหน้าที่ได้รับการถ่ายยีน และผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin สำหรับนำไปเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์และทำการตรวจสอบต่อไป

เนื่องจากการทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณ ในปี 2559-2560 ไม่ได้รับสนับสนุนงบวิจัยต่อในปี 2561 จึงต้องยุติการทำงานวิจัยลง ไม่ได้ดำเนินการต่อตามแผนการดำเนินงานวิจัยในส่วนของ การเลี้ยง แคลลัสที่หน้าวุ้นที่ได้รับการถ่ายยีนและผ่านการคัดเลือกในอาหารคัดเลือก hygromycin ให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์รวมทั้งตรวจสอบต้นที่ได้รับยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ

การทดลองที่ 3.2

การโคลนยีนและการถ่ายยีนควบคุมการเกิดสีม่วง-น้ำเงินสู่กุหลาบ

Cloning and Transformation of Violet-blue Color Regulation Gene in Rose

กุหลาบ คงทอง

ประสาน สืบสุข

จีราพร แก่นทรัพย์

อำไพ สิ้นพัฒนานนท์

คำสำคัญ

ยีนควบคุมสีดอก, dihydroflavonol 4-reductase (DFR), กุหลาบ, Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H), ถ่ายยีน

บทคัดย่อ

การเกิดสีของดอกไม้ส่วนใหญ่ถูกควบคุมโดย ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ซึ่งจัดเป็นฟลาโวนอยชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดง จนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *DFR* จากดอกอัญชันสีน้ำเงินและกุหลาบสีแดง โดยทำการสืบค้นข้อมูลออกแบไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณยีน *DFR* จากดอกอัญชันและกุหลาบ พบว่ายีนที่โคลนได้มีขนาด 1,400 และ 1050 bp. ตามลำดับ ยีน *DFR* นี้สามารถนำมาใช้ในการสร้างชุดยีนร่วมกับยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้จากดอกอัญชัน ได้เป็นชุดยีน *DFR - F3'5'H* สำหรับถ่ายฝากสู่กุหลาบเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในอนาคตต่อไป

ABSTRACT

Flower color formation is mainly controlled by anthocyanin pigment synthesis gene, involved in flavonoid pathway leading to the production of the orange, red, blue or purple-colored anthocyanins. In this study, *DFR* was cloned from *Clitoria ternatea* and *Rosa hybrida*, generating 1400 bp *DFR* and 1050 bp *DFR*. The *DFR* cloned can be used to construct gene combination with the *F3'5'H* gene from *Clitoria ternatea*, generating *DFR - F3'5'H* gene cassetts for modification of flower colors in economic rose.

บทนำ

ประเทศไทยได้ผลิตไม้ดอกเพื่อใช้ภายในประเทศ และส่งออก มูลค่าที่สูง ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี และมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้น สืบเนื่องจากตลาดไม้ดอกเป็นตลาดที่มีผู้ค้าจำนวนมาก มีการแข่งขันสูง ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพเพื่อการผลิตไม้ดอกเพื่อส่งออกเป็นความจำเป็นที่ผู้ผลิตต้องเอาใจใส่ และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในทุกรูปแบบ ปัจจุบันลูกค้าให้ความสำคัญกับสีสันของดอกไม้เป็นอันดับแรก ผู้ผลิตจึงต้องสร้างความแปลกใหม่ในตัวสินค้า เพื่อรักษาและเพิ่มส่วนแบ่งการตลาดให้ได้มาก

ที่สุด ซึ่งวิธีสร้างความหลากหลายด้านสีดอกเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้ เป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิต และการส่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกต่างประเทศ ภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา แนวทางการสร้างสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นการนำการวิจัยทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ร่วมกับงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่ไม้ดอกที่สำคัญหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการส่งออกไม้ดอกในอนาคต

กุหลาบ (*Rosa hybrids*) เป็นดอกไม้ที่ได้รับความนิยมปลูกมากที่สุดชนิดหนึ่งของโลก ผู้คนนิยมปลูกเพื่อความสวยงาม ตกแต่งสวน, ประดับตกแต่งบ้าน, ประดับสถานที่, ปลูกเพื่อการพาณิชย์ อาทิ เพื่อนำไปสกัดน้ำหอม นำไปทำเป็นส่วนประกอบของสบา เป็นต้น กุหลาบเป็นไม้ตัดดอกที่มีการปลูกเป็นการค้ากันแพร่หลายทั่วโลกมานานแล้ว และเป็นไม้ตัดดอกที่มีการซื้อขายเป็นอันดับหนึ่งในตลาดประมุขอัลสเมีย ประเทศเนเธอร์แลนด์ ซึ่งเป็นตลาดประมุขไม้ดอก ที่ใหญ่ที่สุดของโลก เมื่อ พ.ศ. 2542 มีการซื้อขายถึง 1,672 ล้านดอก และมักจะมียอดขายสูงสุดในประเทศต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับไม้ดอกชนิดอื่น ๆ ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกุหลาบตัดดอกประมาณ 5,500 ไร่ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ตาก นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และกาญจนบุรี ตลาดของกุหลาบคุณภาพปานกลางถึงต่ำ (ตลาดล่าง) ในปัจจุบันถึงขั้นอิมิตัว ส่วนตลาดของกุหลาบที่มีคุณภาพสูง (ตลาดบน) ผลผลิตในประเทศยังไม่เพียงพอ และขาดความต่อเนื่อง ทำให้ยังต้องนำเข้าดอกกุหลาบจากต่างประเทศ เช่น เนเธอร์แลนด์ และมาเลเซีย เป็นต้นประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตกุหลาบคุณภาพสูงอย่างต่อเนื่อง หากแต่จะต้องผลิตในพื้นที่ที่เหมาะสม

กุหลาบเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพมากในอุตสาหกรรมไม้ดอก ปัจจุบันภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการผลิตกุหลาบ ซึ่งได้พัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา แม้ว่ากุหลาบทั่วโลกมีหลายสายพันธุ์ มีสีดอกหลากหลายและนักปรับปรุงพันธุ์สามารถทำการผสมพันธุ์เพื่อสร้างพันธุ์ที่มีดอกสวยงามแตกต่างกันไปโดยอาศัยเทคนิคการผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม แต่ไม่สามารถใช้เทคนิคดังกล่าวผสมพันธุ์ให้ได้กุหลาบที่มีสีดอกในโทนสีม่วงน้ำเงินได้ และในธรรมชาติสีดอกกุหลาบยังขาดโทนสีม่วงน้ำเงิน เนื่องจากดอกกุหลาบไม่มียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ส่งผลให้ไม่สามารถสังเคราะห์ delphinidin-based anthocyanin ซึ่งมีโทนสีม่วงน้ำเงินได้ ด้วยเหตุนี้นักวิจัยจึงสนใจและประยุกต์ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์กุหลาบให้มีดอกสีน้ำเงินอย่างต่อเนื่อง

แนวทางการสร้างกุหลาบสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งสามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่กุหลาบ หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างกุหลาบพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติแม้ว่าในต่างประเทศได้มีผู้รายงานผลความสำเร็จของการศึกษาการแสดงออกของยีนรวมทั้งการโคลนยีนที่ควบคุมสีดอกในวัฏจักรการสังเคราะห์ anthocyanin ในพืชหลาย

ชนิดแล้ว แต่ยีนที่ค้นพบมักจะนำไปจดสิทธิบัตร ผู้ไม่ใช่เจ้าของสิทธิบัตรจึงไม่สามารถนำยีนเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ได้

สำหรับงานวิจัยนี้ได้เสนอการโคลนและการถ่ายยีนควบคุมสีดอกในวัฏจักรการสังเคราะห์ anthocyanin โดยทำการโคลนยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จาก mRNA ของดอกอัญชัน และกุหลาบ ซึ่งยีนนี้สามารถนำไปใช้นำมาใช้ในการสร้างชุดยีนร่วมกับยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H)* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างรงควัตถุที่ให้ดอกไม้มีสีม่วงหรือสีน้ำเงิน ที่โคลนได้จาก mRNA ของดอกอัญชันสีน้ำเงิน และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกในยาสูบซึ่งส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงสีดอก จากสีขาวอมชมพูเป็นชมพูม่วง (กุหลาบ และ ประสาน 2557) เพื่อสร้างชุดยีน *DFR - F3'5'H* สำหรับถ่ายฝากสู่กุหลาบเพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกกุหลาบ หรือเพื่อปรับปรุงพันธุ์กุหลาบให้มีดอกในโทนสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกในอนาคต

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การสืบค้นข้อมูลยีน และออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ *Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ของดอกอัญชันและดอกกุหลาบ ที่มีรายงานในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Vector NTI (ชนิดระบุระยะเวลาการใช้งาน) เพื่อโคลนยีน *DFR*

2. การโคลนชิ้นส่วนของยีน *DFR* จากดอกอัญชันและกุหลาบ

2.1 การสกัด Total RNA

นำตัวอย่างดอกอัญชันและกุหลาบในระยะเริ่มเกิดสีน้ำเงินและสีแดงตามลำดับ มาตัดดอกเป็นชิ้นเล็ก ๆ น้ำหนัก 100 มิลลิกรัมด้วยมีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อ และนำมาสกัด Total RNA ตามวิธีการของ Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma) นำสารละลาย Total RNA ที่ได้ไปหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจสอบคุณภาพ RNA ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย GelStar แล้วนำไปใช้หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อนำไปใช้ต่อไป

2.2 การสังเคราะห์สาย cDNA และเพิ่มปริมาณยีน *DFR* การสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ของยีน *DFR* ด้วยเทคนิค RT-PCR นั้น จะต้องทำการกำจัดดีเอ็นเอที่อาจจะปะปนอยู่ใน Total RNA ก่อน โดยใช้ DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology)

ทำการสังเคราะห์สาย cDNA จาก Total RNA ของดอกอัญชันและกุหลาบโดยใช้ SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology) ที่มี การเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา RNA/primer mixture ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย Total RNA 1 ไมโครลิตร, Oligo (dT) 20 primer 1 ไมโครลิตร, 10mM dNTP mix 1 ไมโครลิตร, DEPC-treated water 7 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 5 นาที และนำไปไว้ในน้ำแข็งทันทีอย่างน้อยเป็นเวลานาน 1 นาที ในระหว่างนั้นให้เตรียมส่วนผสม cDNA Synthesis mix ซึ่งส่วนผสมประกอบด้วย 10xRTbuffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 4 ไมโครลิตร, 0.1M DTT 2 ไมโครลิตร, RNaseOUT (40 U/ul) 1 ไมโครลิตร, SuperScript III RT (200 U/ul) 1 ไมโครลิตร

เติม cDNA Synthesis mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน RNA/primer mixture ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เวลานาน 50 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที เติม RNase H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที หลังจากนั้นสามารถนำปฏิกิริยา cDNA Synthesis ไปใช้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อไปใช้ทำพีซีอาร์ต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 0.4ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 uM Forward Primer (*DFR*) 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer (*DFR*) 2 ไมโครลิตร, cDNA Template 1ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, DEPC-treated water 11.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C	2 นาที	1 รอบ	
94 °C	1 นาที	}	35 รอบ
55 °C	1 นาที		
72 °C	2 นาที		
72 °C	10 นาที	1 รอบ	

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 2 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

2.3 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำชิ้นดีเอ็นเอของยีน *DFR* ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มาแยกด้วย 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย gel star (Cambrex) และตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Dark Reader transilluminators และตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เก็บชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้ที่ -20 °C เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์พาหะต่อไป

2.4 การเชื่อมต่อยีน *DFR* เข้ากับเวกเตอร์ และถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

การเชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ ใช้ pGEM-T Easy Vector System (Promega) โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 2x Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 2.5ไมโครลิตร, pGEM-T Easy Vector (50ng) 0.5ไมโครลิตร, PCR product 1.5 ไมโครลิตร T4 DNA ligase 0.5 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือนำปฏิกิริยาที่ได้ไปเก็บที่ 4 °C นานข้ามคืน นำสารละลายที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย โดยนำยีน *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าเชื้อ *Escherichia coli* JM109 (Promega) มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. ดูดสารละลายในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อชิ้นยีน *DFR* เข้ากับเวกเตอร์ (ligation) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในน้ำแข็ง
2. นำ competent cell JM109 ออกจากตู้ -80 °C มาไว้ในน้ำแข็งทำให้ละลายช้าๆ แล้วผสมให้เข้ากันโดยดีดหลอดเบาๆ
3. ดูดสารละลาย competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในปฏิกิริยา ligation ดีดหลอดเบาๆ และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
4. นำไป Heat-shock cell โดยแช่ใน water- bath ที่มีอุณหภูมิ 42 °C เวลา 50 วินาที และรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลานาน 2 นาที
5. เติมสารละลาย soc medium (อุณหภูมิห้อง) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร
6. นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 30 นาที
7. นำไป plate บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 100 ug/ml ampicillin 0.5 mM IPTG และ 50 mg/ml X-Gal แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.5 การคัดเลือกโคลนเป้าหมาย

นำโคลนของแบคทีเรียที่มีสีขาวไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR โดยใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มโคลนที่มีสีขาว นำไปใส่ในหลอดที่มีปฏิกิริยาของพีซีอาร์ที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 uM Forward Primer (M13F) 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer (M13R) 2 ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อ 12.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20 ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

- | | | | |
|-------|---------|-------|--------|
| 94 °C | 2 นาที | 1 รอบ | |
| 94 °C | 1 นาที | } | 35 รอบ |
| 55 °C | 1 นาที | | |
| 72 °C | 2 นาที | | |
| 72 °C | 10 นาที | 1 รอบ | |

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

2.6 การสกัดพลาสมิด

เลี้ยงเชื้อโคลนที่ได้ผ่านการตรวจสอบว่ามีเป้าหมายปรากฏอยู่ นำไปสกัด พลาสมิดด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยใช้ 1% Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำสารละลายที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้หาลำดับเบส

2.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *DFR*

นำพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน *DFR* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการหาลำดับเบสโดยใช้สารเคมีชุด ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit โดยเตรียมส่วนผสมต่างๆ ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้ 2.5X Sequencing Buffer 3 ไมโครลิตร, Terminator Ready Reaction Mix 2 ไมโครลิตร, 3.2 uM primer (T7 or SP6) 1 ไมโครลิตร, Plasmid Template 200 นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ 20 ไมโครลิตร

นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C	2 นาที	1 รอบ	} 35 รอบ
94 °C	10 วินาที	}	
55 °C	5 วินาที		
60 °C	4 นาที		
60 °C	10 นาที		

นำสารละลายของปฏิกิริยาไปทำความสะอาดก่อนนำเข้าวิเคราะห์หาลำดับเบส นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer นำลำดับเบสของยีน *DFR* ที่โคลนได้จากดอกอัญชันและกุหลาบไปเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI โดยใช้โปรแกรม Blast เพื่อตรวจสอบกับยีนที่มีผู้รายงานมาก่อน

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 รวม 2 ปี

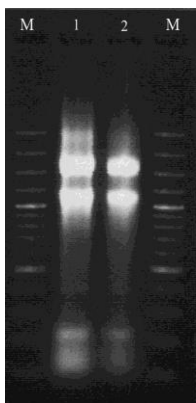
สถานที่ดำเนินการวิจัย

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. โคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน

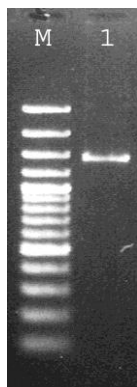
จากการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับยีน *DFR* จากฐานข้อมูล NCBI นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมือนกันโดยใช้โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ ทำให้ได้ไพรเมอร์ของยีน *DFR* คือ Primer: CT_DFR_F และ CT_DFR_R สำหรับนำมาใช้เพิ่มปริมาณยีนจาก cDNA ของดอกอัญชัน สามารถทำการสกัด mRNA จากดอกอัญชันสีน้ำเงินและสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ของดอกอัญชันด้วยเทคนิค RT-PCR และได้ชิ้นยีนจากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR มีขนาดประมาณ 1400 bp. ดังภาพที่ 1 และ 2 ได้โคลนเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อเข้ากับ เวกเตอร์ โดยการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ พร้อมทั้งถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรีย ภาพที่ 3.



ภาพที่ 1. แสดงแถบ RNA ที่สกัดได้จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน

M = 100 base plus markers

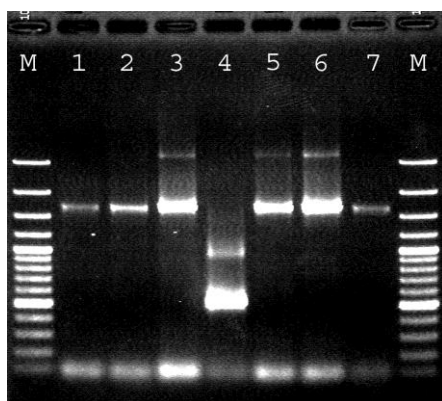
1,2 = RNA



ภาพที่ 2. แสดงแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน DFR (CtDFR-attB1) ที่เพิ่มปริมาณได้จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน

M = 100 base plus , DNA markers

1 = ชิ้นส่วนของยีน DFR ที่เพิ่มปริมาณได้ ขนาด 1400 คู่เบส



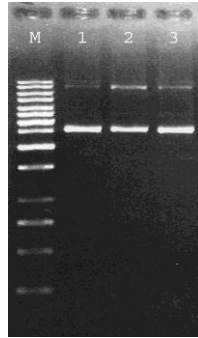
ภาพที่ 3. แสดงผลการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนยีน DFR (CtDFR-attB1) กับเวกเตอร์ pDORN221 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13

M = 100 base plus , DNA markers

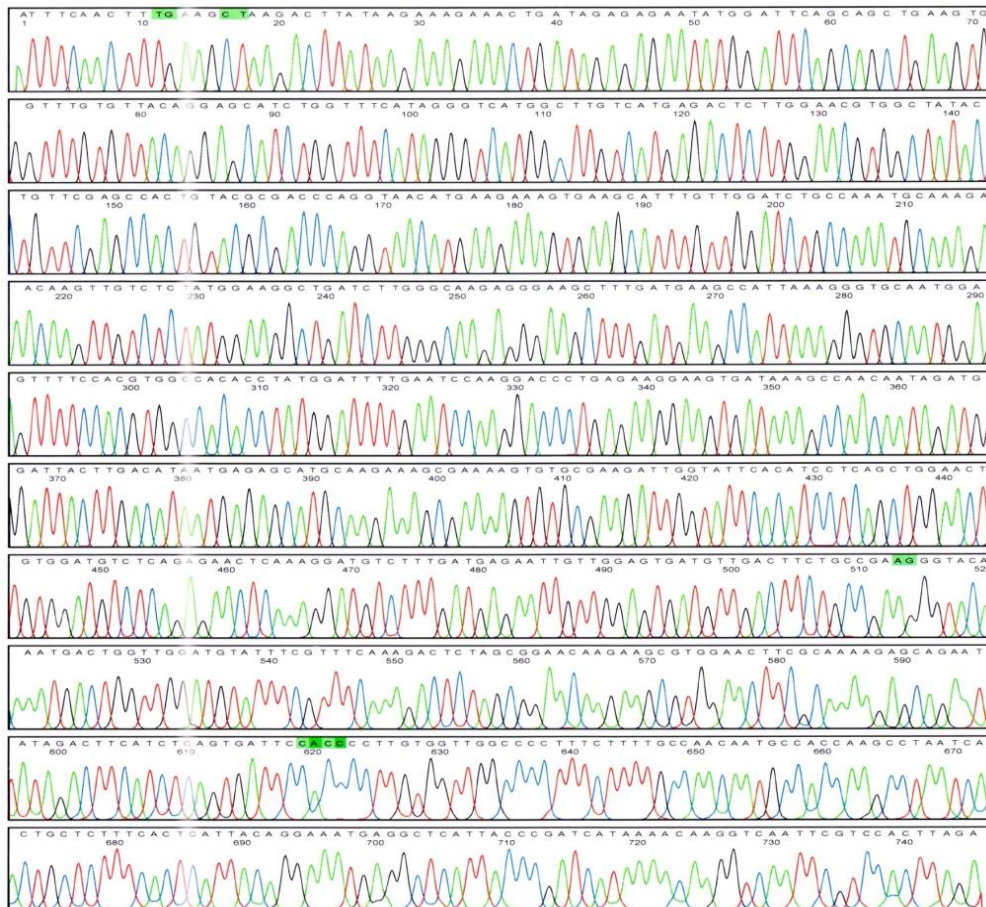
1-3,5-7 = แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากโคลนที่มี pDORN221Vector ที่คาดว่ามียีน CtDFR-attB1 แทรกอยู่

4 = แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากโคลนที่ไม่มีการเชื่อมต่อของยีน

จากการสกัดพลาสมิดได้พลาสมิดจากโคลนเป้าหมาย เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ทราบลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกอัญชัน (ดังภาพที่4และ5 ตามลำดับ) จากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกอัญชันกับฐานข้อมูลที่มีการเผยแพร่ที่อยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blast-N พบว่าลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้มีลำดับเบสเหมือนกับยีน DFR ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI คิดเป็น100% กับ accession AB185901 ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 4. แสดงพลาสมิด CtDFR-plasmid ที่สกัดได้จากโคลนเป้าหมาย
 1-3 = CtDFR- plasmid
 M = 1 kb , DNA markers



ภาพที่ 5. แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกอัญชันโดยใช้ไพรเมอร์ M13F

Sequences producing significant alignments:

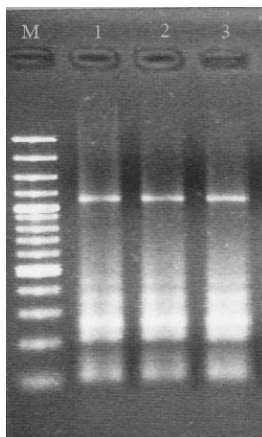
Select: All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Clitoria ternatea ctDFR mRNA for dihydroflavonol 4-reductase, complete cds, clone: pBSCDFR20	1447	1447	100%	0.0	100%	gi 133874181 AB185901.1
<input type="checkbox"/> Glycine max DFR2 mRNA for dihydroflavonol 4-reductase 2, complete cds, allele: W4	879	879	93%	0.0	86%	gi 591984821 AB872212.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Glycine max dihydroflavonol 4-reductase (LOC732626), transcript variant X1, mRNA	875	875	95%	0.0	85%	gi 955377857 XM_003550340.3
<input type="checkbox"/> Glycine max DFR2 mRNA for dihydroflavonol 4-reductase 2, complete cds, allele: w4-1p	874	874	93%	0.0	86%	gi 591984863 AB872215.1
<input type="checkbox"/> Glycine max DFR2 mRNA for dihydroflavonol 4-reductase 2, complete cds, allele: w4, strain: 222-A-3	874	874	93%	0.0	86%	gi 591984849 AB872214.1
<input type="checkbox"/> Soybean clone JCVI-FLGm-19119 unknown mRNA	872	872	95%	0.0	85%	gi 255637893 BT094981.1

ภาพที่ 6. แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน ctDFR ในฐานข้อมูล NCBI มีความเหมือนกัน 100% กับ accession AB185901

2. โคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จากดอกกุหลาบสีแดง

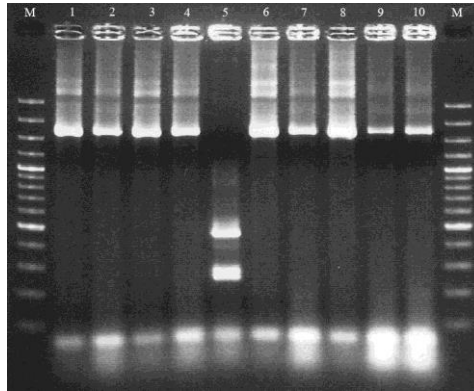
จากการสืบค้นข้อมูลและออกแบบไพรเมอร์ในการโคลนยีน Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จาก cDNA ของดอกกุหลาบสีแดง โดยการค้นหาคำค้นที่เกี่ยวกับยีน DFR จากฐานข้อมูล NCBI และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมือนกันโดยใช้โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ของยีน DFR คือไพรเมอร์ RH_DFR_F และ RH_DFR_R สำหรับนำมาใช้เพิ่มปริมาณยีนจาก cDNA ของดอกกุหลาบ สามารถทำการสกัด mRNA จากดอกกุหลาบและสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ของดอกกุหลาบด้วยเทคนิค RT-PCR และได้ชิ้นยีนจากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR มีขนาดประมาณ 1050 bp. ดังภาพที่ 7 ได้โคลนเป้าหมายที่มีชิ้นดีเอ็นเอเชื่อมต่อกับ เวกเตอร์ โดยการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์พร้อมทั้งถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรีย ภาพที่ 8 จากการสกัดพลาสมิดและนำมาตรวจสอบความถูกต้องของโคลน ได้พลาสมิดจากโคลนเป้าหมายที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 7. แสดงแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน DFR (RHDFR-attB1) ที่เพิ่มปริมาณได้จากดอกกุหลาบ

M = 100 base plus , DNA markers

1 = ชิ้นส่วนของยีน DFR ที่เพิ่มปริมาณได้ ขนาด 1050 คู่เบส

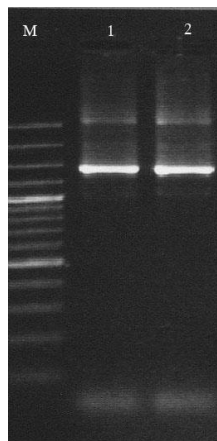


ภาพที่ 8. แสดงผลการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนยีน DFR (RHDFR-attB1) กับเวกเตอร์ pDORN221 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13

M = 100 base plus , DNA markers

1-4,6-10 = แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากโคลนที่มี pDORN221Vector ที่คาดว่ามียีน RHDFR-attB1 แทรกอยู่

5 = แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากโคลนที่ไม่มีการเชื่อมต่อของยีน

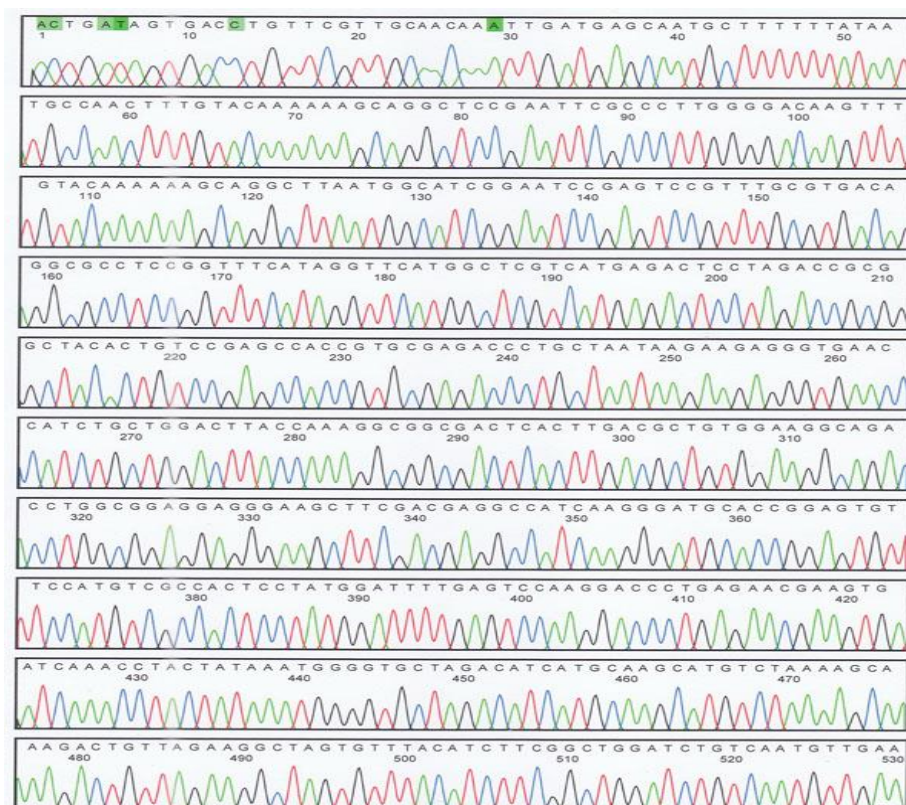


ภาพที่ 9 แสดงพลาสมิด RHDfR-plasmid ที่สกัดได้จากโคลนเป้าหมาย

1-2 = RHDfR- plasmid

M = 1 kb , DNA markers

เมื่อนำพลาสมิดจากโคลนเป้าหมายที่ผ่านการตรวจสอบไปวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ทราบลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกกุหลาบ (ดังภาพที่10) และจากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกกุหลาบกับฐานข้อมูลที่มีการเผยแพร่ที่อยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blast-N พบว่าลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้มีลำดับเบสเหมือนกับยีน DFR ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI คิดเป็น 99% กับ accession KM203111 ดังภาพที่11



ภาพที่ 10. แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน DFR ที่โคลนได้จากดอกกุหลาบโดยใช้ไพรเมอร์ M13F

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Rosa hybrid cultivar RhDFR mRNA for dihydroflavonol 4-reductase, complete cds, cultivar: Noblesse	1940	1940	100%	0.0	100%	AB490072.1
<input type="checkbox"/> Rosa multiflora cultivar Duohua dihydroflavonol 4-reductase mRNA, complete cds	1929	1929	100%	0.0	99%	KP137549.1
<input type="checkbox"/> Rosa hybrida mRNA for dihydroflavonol 4-reductase, complete cds	1917	1917	100%	0.0	99%	D85102.1
<input type="checkbox"/> Rosa hybrid cultivar dihydroflavonol 4-reductase mRNA, complete cds	1873	1873	100%	0.0	99%	AY780885.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rosa rugosa dihydroflavonol 4-reductase 1 mRNA, complete cds	1857	1857	100%	0.0	99%	KM203111.1
<input type="checkbox"/> Rosa rugosa clone dq01 dihydroflavonol 4-reductase (dfr) mRNA, partial cds	1851	1851	99%	0.0	99%	KT809350.1
<input type="checkbox"/> Rosa chinensis dihydroflavonol 4-reductase (DFR) mRNA, complete cds	1834	1834	100%	0.0	98%	KF734592.1
<input type="checkbox"/> Fragaria vesca cultivar Alexandria dihydroflavonol 4-reductase (DFR) mRNA, complete cds	1397	1397	100%	0.0	91%	KC894050.1

ภาพที่ 11. แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน RH DFR ในฐานข้อมูล NCBI มีความเหมือนกัน 99% กับ accession KM203111

สรุปผลการวิจัย

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin จัดเป็นฟลาโวนอยชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดงจนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน จากการโคลนยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* จากดอกอัญชันสีน้ำเงินและดอกกุหลาบสีแดง ได้ชิ้นยีนขนาด 1,400 และ 1050 bp. ตามลำดับ ยีนที่ได้นี้สามารถนำมาสร้างเป็นชุดยีนร่วมกับยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้จากดอกอัญชัน

สีน้ำเงิน (กุหลาบ และ ประสาน,2557) สำหรับใช้ถ่ายฝากสู่กุหลาบ หรือไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

เนื่องจากการทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณ ในปี 2559-2560 ไม่ได้รับสนับสนุนงบวิจัย ต่อในปี 2561 จึงต้องยุติการทำงานวิจัยลง ได้ทำแค่ส่วนของโคลนยีน DFR จาก mRNA ของดอกอัญชันที่มีสีน้ำเงิน และโคลนยีน DFR จาก mRNA ของดอกกุหลาบที่มีสีแดง ไม่ได้ดำเนินการต่อตามแผนการดำเนินงานวิจัยในส่วนของ การสร้างชุดยีน ที่ประกอบด้วยยีน F3' 5'H ที่โคลนได้จากอัญชันสีน้ำเงิน (เป็นยีนที่โคลนได้ และได้ผ่านการทดสอบการแสดงออกแล้วในยาสูบ โดยกุหลาบ และ ประสาน 2557) โดยชุดยีนประกอบด้วยชุดยีน ที่มียีน DFR จากดอกกุหลาบที่ออกแบบให้มีการขัดขวางการทำงานของยีน DFR ในดอกกุหลาบพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้เทคนิค RNAi ควบคู่กับการเพิ่มการแสดงออกของยีน DFR จากดอกอัญชันสีน้ำเงิน และยีน F3'5'H จากดอก ออัญชันสีน้ำเงิน ในเวลาเดียวกัน รวมทั้งไม่ได้ดำเนินการต่อตามแผนการดำเนินงานวิจัยในส่วนของ การนำชุดยีนฝากถ่ายเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียและนำไปใช้ถ่ายเข้าสู่กุหลาบ

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัยของโครงการ

1. โครงการวิจัยนี้ได้ข้อมูลวิธีการและเทคนิคการสร้าง Phage-scFv library ซึ่งเป็นชนิด Naïve library เพราะสร้างจาก B-cell (ม้าม) ของหนูที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนใดๆมาก่อน เทคนิคการตรวจสอบการกลายของยีน เทคนิคการโคลนยีน เทคนิค RNA interference และเทคนิคการถ่ายยีนแบบ Over expression เข้าสู่พืช ได้แก่ ยาสูบ อะราบิโดพซิส และหน้าวัว
2. ได้ข้อมูลและยีน *CpeIF4E* และ *CpRDR6* ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไวรัสจุดวงแหวนจากมะละกอ ยีน *NAGS* ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำจากมะเขือเทศ ยีน *ERD15* และ *PIS* ที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดและการทนแล้งของพืช ยีน *GmPR1* ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคจากถั่วเหลือง ยีน *CRT* และ *CaM* ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในข้าวโพด และ ยีน *DFR* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสีดอกจากดอกอัญชันสีน้ำเงินและกุหลาบสีแดง
3. ได้แคลลัสหน้าวัวหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีน และผ่านการตรวจสอบในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin สำหรับนำไปเลี้ยงเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การสร้าง Phage-scFv library มีแอนติบอดีค่อนข้างหลากหลาย ดังนั้น สามารถใช้ Phage-scFv library จากงานวิจัยนี้ ในการค้นหา Phage-scFv ที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดใหม่ๆ ได้ทันที โดยไม่ต้องผลิต Phage-scFv library ใหม่ ทำให้ลดเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน ซึ่งส่งผลให้การพัฒนางานวิจัยที่ใช้แอนติบอดีมีความรวดเร็วขึ้น
2. นักวิชาการ อาจารย์ นักศึกษา และนักวิจัยมะละกอ สามารถนำข้อมูลยีน *CpRDR6* และ *CpeIF4E* ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลลำดับอะมิโนเอซิด และเครื่องหมายโมเลกุลที่ทำให้ความแตกต่างของมะละกอที่อยู่ในกลุ่มอ่อนแอและต้านทาน ไปศึกษาและพัฒนาต่อ เพื่อค้นหาความสัมพันธ์ต่อความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนในมะละกอต่อไป
3. การโคลนยีน *NAGS* ที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาวะขาดน้ำ และการสร้างชุด cassette ยีน ซึ่งชุดยีนที่ได้อยู่ในรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีความสมบูรณ์ (pCAMBIA2300 – *SINAGS*) สามารถนำชุดยีนที่นำไปศึกษาการแสดงออกของยีนในพืชต้นแบบ เพื่อศึกษาข้อมูลของยีนในด้านต่างๆ ก่อนที่จะนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจ เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด เป็นต้น เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้
4. การโคลนยีน *GmPR1* จากถั่วเหลืองสายพันธุ์ไทย เป็นยีนที่มีคุณสมบัติในการต้านทานการรุกรานจากเชื้อโรค สามารถใช้สร้างชุดยีนถ่ายฝากสู่ถั่วเหลืองเพื่อผลิตถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทานโรคสูง และชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080* ที่ได้จากถั่วเหลืองมีคุณสมบัติในการควบคุมการแสดงออกของยีนให้แสดงออกมากเฉพาะส่วนใบ ดอกและราก สามารถนำไปต่อยอดโดยใช้กับยีนชนิดอื่นหรือพืชชนิดอื่นได้
5. การสร้าง pRNA+ERD15 คอนสตรัคส์ ซึ่งเป็นชนิด inphRNAi ที่สามารถนำไปใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนทานต่อสภาวะขาดน้ำหรือลักษณะ (traits) ที่สำคัญอื่นๆ ได้

6. การสร้างคอนสตรักส์ของยีน PIS ซึ่งเป็นยีนทนแล้งในพืช เข้าสู่เวกเตอร์ โดยวิธีการสังเคราะห์ ยีน ทำให้ประหยัดเวลาในการโคลนนิ่งและการคัดเลือกโคลน งานต่อไปคือการออกแบบยีน PIS หรือยีนทางการเกษตรอื่นๆจากพืชใหม่ๆ เพื่อหาหน้าที่ของยีนและทดสอบการถ่ายฝากเข้าสู่เพื่อพัฒนาพืชทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อไป อีกทั้งสามารถถ่ายทอด หรือเผยแพร่เป็นผลงานทางวิชาการ ให้แก่กลุ่มเป้าหมายที่เป็นนักวิชาการด้านโมเลกุลชีววิทยาด้านพืช และนักปรับปรุงพันธุ์ได้ รวมทั้ง ผลงานที่ได้จากการวิจัยสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับยีนที่มีลักษณะสำคัญทางการเกษตรอื่นๆ ได้โดยวิธีเดียวกันนี้

7. การโคลนยีน *CRT* และ *CaM* ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มสามารถยีนที่ได้ไปศึกษาการแสดงออกของยีนในพืชต้นแบบ เพื่อศึกษาข้อมูลของยีนในด้านต่างๆ ก่อนที่จะนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจ เช่น ถั่วเหลือง อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด เป็นต้น เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะเครียดจากการขาดน้ำและความเค็มสูงได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้

8. หน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)* เพื่อปรับแต่งสีดอกที่เป็นของกรมวิชาการเกษตรสำหรับนำไป สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างความหลากหลายของสีดอกในหน้าวัว

9. ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *DFR (dihydroflavonol 4-reductase gene)* จากอัญชัน และกุหลาบ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างชุดยีนนำไปปรับแต่งสีดอกไม้โดยวิธีการถ่ายยีน เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอก

บรรณานุกรม

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุพืช : ถั่วเหลือง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 156 หน้า.
- กุหลาบ คงทอง และ ประสาน สืบสุข. 2555. การโคลนยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H)* จาก อัญชันและพิทูเนีย. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ.
- กุหลาบ คงทอง และ ประสาน สืบสุข. 2557. การโคลนยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H)* จาก อัญชันและพิทูเนีย. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัยประจำปี 2557 รอบ 6 เดือน. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ.
- กุหลาบ คงทอง และ ประสาน สืบสุข. 2557. การโคลนยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3'5'H)* จาก อัญชันและพิทูเนีย. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัยประจำปี 2557 รอบ 6 เดือน. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ.
- จิ่งแท้ ศิริพานิช, จันท์จรัส เรียวเดชะ, จันทริภา ธนะโสภณ, อำไพวรรณ ภราดรนิววัฒน์, นันทวัน บุญประภัสร์ และ เปรม ณ สงขลา. 2552. มะละกอไทย สถานภาพด้านสายพันธุ์ ระบบการผลิต และการตลาด. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 136 น.
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 13(1): 9-13.
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 13(1): 9-13.
- วัฒนา สวรรยาธิปติ. 2531. การปลูกมะละกอ. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 42 น.
- สถานการณ์ไม้ดอกไม้ประดับปี 2550-2551. Available from: http://www.gardencentre.co.th/thai/love_suan/kasat. Accessed: 3 July 2014.
- สถาพร จิตตपालพงศ์, ศรารวรรณ ธนศิลป์, ธีระพล ศิริณฤมิตร และ ไพฑูล แก้วหอม. 2557. การพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บโค (*Boophilus microplus*) ในประเทศไทย. ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (ออนไลน์). แหล่งที่มา:
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2560. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 215 หน้า.
- สิริกุล วะสี. 2542. มะละกอ. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 45 น.
- หน่วยพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2557. http://www.rdi.ku.ac.th/GMOS/GMOs2/2_1/index4.htm. 4/6/2014 หน้าวิว. Available from: <http://www.ku.ac.th/e-magazine/apr50/agri/anthurium.htm>. Accessed: 3 July 2014.
- Aida R., Iwahori S., Kano Murakami Y., Shinkai S., Sugiyama N. and Sakiyama R. 1998. Gene silencing in transgenic torenia and its applications for breeding. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 67(6): 1200-1202.
- Aida R., Iwahori S., Kano Murakami Y., Shinkai S., Sugiyama N. and Sakiyama R. 1998. Gene silencing in transgenic torenia and its applications for breeding. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 67(6): 1200-1202.

- Aida, R, Kishimoto S, Tanaka Y and Shibata. M. 2000. Modification of flower color in torenia (*Torenia fourieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant. Science. Limerick.* 153(1): 33-42.
- Aida, R, Kishimoto S, Tanaka Y and Shibata. M. 2000. Modification of flower color in torenia (*Torenia fourieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant. Science. Limerick.* 153(1): 33-42.
- Akashi, K., C. Miyake and A. Yokota. 2001. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* 508: 438 – 442.
- Alexander, D., R. M. Goodman, M. Gut-Rella, C. Glascock, K. Waymann, L. Friedrich, D. Maddox, P. Ahl-Goy, T. Luntz and E. Ward. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *PNAS.* 90: 7327–7331.
- Bartley, G.E. and P.E. Scolnik. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7:1027-1038.
- Biolley, J.P, Jay.M, Forkmann, G. 1994. Pigmentation patterns of modern rose mutants throw light on the flavonoid pathway in *Rosa x Hybrida*. *Phytochemistry* 36: 1189-1196.
- Brugliera F., Gina Barri-Reweell, Timothy A. Holton and John G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* 19(4), 441-451.
- Brugliera F., Gina Barri-Reweell, Timothy A. Holton and John G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* 19(4), 441-451.
- Buaboocha, T. 2009. Effect of transgenic expression in rice of a calmodulin on salt stress response. ResearchGate.
- Caldovic, L., H. Morizono, Y. Daikhin, I. Nissim, R. J. McCarter, M. Yudkoff and M. Tuchman. 2004. Restoration of ureagenesis in N-acetylglutamate synthase deficiency by N-carbamyl glutamate. *J. Ped.* 145(4): 552 – 554.
- Carrington, J.C., S.M. Cary, T.D. Parks and W.G. Dougherty. 1989. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO Journal.* 8: 365-370.
- Castagnola, A.S. and J.L. Jurat-Fuentes. 2012. Bt Crops: Past and Future. Chapter 15 in [*Bacillus Thuringiensis* Biotechnology], Ed. Estibaliz Sansinenea. Springer, Mar 2, 2012. pp 283-304.
- Cattvelli, L., Rizza, F., Badeck, F-W., Mazzucotelli, E., Mastrangelom A,N., Francia, E., Mare, C., Tondelli, A., Stanca, A.M. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* 105 (1), 1-14.
- Chen F., P. M. Hayes, D. M. Mulrooney and A. Pan. 1994. Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. *The Plant Cell.* Vol. 6: 835-843.
- Christine, B., Y. N. Abdiche, D. M. Stone, S. Collier, K. C. Lindquist, A. C. Pinkerton, J. Pons and R. Arvind. 2012. Exploring the Dynamic Range of the Kinetic Exclusion Assay in

- Characterizing Antigen-Antibody Interactions. PLoS one. 7. e36261. DOI: 10.1371/journal.pone.0036261.
- Cogoni C, Macino G. (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399: 166-169.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U., and Macino, G. 1996. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 15: 3153-3163.
- Denecke, J., B. Ek, M. Caspers, and K. M. C. Sinjorgo. 1993. Analysis of sorting signals responsible for the accumulation of soluble reticuloplasmids in the plant endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* 44: 213 - 221.
- Devi, s. 1952. Studies in the order Parietales. III. Vascular anatomy of the flower of *Carica papaya* L. with special reference to the structure of the gynoecium. *Indian Acad. Sci. Proc.* 36. 59-69.
- Dougherty, W.G. and J.C. Carrington. 1988. Expression and function of potyviral gene products. *Annual Review of Phytopathology.* 26: 123-143.
- Dresselhaus, T, C. Hagel, H. Lorz and E. Kranz. 1996. Isolation of a full-length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of in vitro zygotes of maize. *Plant Mol. Biol.* 31: 23 - 34.
- Edupuganti, S. R., O. P. Edupuganti and R. O’Kennedy. 2013. Generation of anti-zearalenone scFv and its incorporation into surface plasmon resonance-based assay for the detection of zearalenone in sorghum. *Food Control.* 34: 668-674.
- Eric T. Johnson, Sunhyo Ryu, Hankuil Yi, Byongchul Shin, Hyeonsook Chong and Giltso Choi. 2001. Alteration of single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *The Plant Journal* 25(3): 325-333.
- Froehlich, J.E., Wilkerson, c.g., Ray, W.K., Mc Andrew, R.S. Osteryoung, K.W., Gage, D.A., & Phinney, B.S. (2003). Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research*, 2(4), 413-425.
- Garet, E., A.G. Cabado, J.M. Vieites and Á. González-Fernández. 2010. Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin. *Toxicon.* 55: 1519-1526.
- Gonsalves, D., J.Y. Suzuki, S. Tripathi and S.A. Ferreira. 2008. Papaya Ringspot Virus. *Encyclopedia of Virology (Third Edition).* Pages 1-8
- Gordon, A. J., B. J. Thomas and P. H. S. Reynolds. 1992. Localization of Sucrose Synthase in Soybean Root Nodules. *New Phytol.* 122:35-44.
- Grzela R., L. Strokowska, J.P. Andrieu, B. Dublet, W. Zagorski and J. Chroboczek. 2006. Potyvirus terminal protein Vpg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Science Direct, Biochimie* 88. 887-896.

- Guimarães-Dias F¹, Neves-Borges AC, Viana AA, Mesquita RO, Romano E, de Fátima Grossi-de-Sá M, Nepomuceno AL, Loureiro ME, and Alves-Ferreira M. 2012. Expression analysis in response to drought stress in soybean: Shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. *Genet Mol Biol.* Jun; 35(1 (suppl)):222-32.
- Hezky, L. 2008. Challenges of Plant Breeding early in 21th century. *Hungarian Agricultural Research.* 4 Pages.
- Holton, T.A. and Cornish. E.C. 1995. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083.
- Holton, T.A. and Cornish. E.C. 1995. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
http://www.rdi.ku.ac.th/kufair50/animal/05_animal/05_animal.html. 3 มิถุนายน 2557.
<http://www.sut.ac.th/iat/biotech/montarop/phd,24/6/57>.
https://en.wikiversity.org/wiki/Gene_transcriptions/Distal_promoters
- Hubert, A., Y. Mitani, T. Tamura, M. Boicu and I. Nagy. 2014. Protein complex purification from *Thermoplasma acidophilum* using a phage display library. *J. Microbiological Methods.* 98: 15–22.
- Isabel, G., I. Arenas, I. Benite, J. M. Rios, B. Becerril, R. Grande, J. C. Almagro, A. Bravo and M. Sobero'n. 2006. Specific Epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the Sequential Interaction with Cadherin and Aminopeptidase-N Receptors in *Manduca sexta*. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M604721200>.
- Jia, X. Y., C. Y. Xu, R. L. Jing, R. Z. Li, X. G. Mao, J. P. Wang and X. P. Chang. 2008. Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (CRT) gene involved in drought-stressed responses. *Journal of Experimental Botany.* 59(4): 739 – 751.
- Jorgensen, R.A. 2003. Sense cosuppression in plants: Past, present, and future. In *RNAi: A guide to gene silencing* (ed.G.J. Hannon). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 5–22.
- Kalamaki M. S., D. Alexandrou, D. Lazari., G. Merkouropoulos, V. Fotopoulos, I. Pateraki, A. Aggelis, A. Carrillo-Lopez, M. J. Rubio-Cabetas and A. K. Kanellis. 2009. Over-expression of a tomato *N*-acetyl-L-glutamate synthase gene (*SINAGS1*) in *Arabidopsis thaliana* results in high ornithine levels and increased tolerance in salt and drought stresses. *Journal of Experimental Botany.* 60(6): 1859 – 1871.
- Kariola, T., Brader, G., Helenius, E., Li, J., Heino, P., & Palva, E.T. (2006). EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15, a negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142-1559.
- Kawaguchi R. and J. Bailey-Serres. 2002. Regulation of Translational initiation in plants. *Plant Biology* 5. 460-465.

- Keim, P., T.C. Olson and R.C. Shoemaker. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet. Newsl.* 15: 150-152.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (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 Molecular Biology*, 25-791.
- Klee, H. J., M.B. Hayford, K.A. Kretzmer, G.F. Barry and G.M. Kishore. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *The Plant Cell*. 3: 1187–1193.
- Kneller E.L.P., A.M. Rakotondrafara and W.A. Miller. 2006. Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Science Direct, Virus Research* 119. 63-75.
- Kumar, R. 2014. Role of MicroRNAs in Biotic and Abiotic stress responses in crop plants. *Appl. Biochem. Biotechnol.* [Epub ahead of print].
- Kwiatkowski, B. A., A. G. Zielinska-Kwiatkowska, A. Migdalski, and L. A. Kleczkowski. 1995. Cloning of two cDNAs encoding calnexin-like and calreticulin-like proteins from maize (*Zea mays*) leaves: identification of potential calcium-binding domains. *Gene*. 165: 219 – 222.
- Levitt, 1980. Responses of plants to environment stresses. Academic Press. Vol 2. : 607 pages.
- Levitt, J., 1980. Responses of Plants to environmental stresses. Vol. 1, Acad. Press, 496 Pages.
- Li, Z. and S. Komatsu. 2000. Molecular cloning and characterization of calreticulin, a calcium-binding protein involved in the regeneration of rice cultured suspension cells. *Eur. J. Biochem.* 267: 737 – 745.
- Lines R, Persley D, Dale J, Drew R, Bateson M (2002) Genetically engineered immunity to Papaya ringspot virus in Australian papaya cultivars. *Mol. Breeding* 10:119-129.
- Liu, D., K.G.Raghothama, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. 1994. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *PNAS*. 91: 1888–1892.
- Liu, H., X. Zheng, X. Shi, L. Yu, P. Jia, J. Wang, J. He, W. Lan, H. Liu and Z. Wu 2014. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against infectious haematopoietic necrosis virus from mouse phage display library. *J. Virological Methods*. 205 : 61–67.
- Liu, H., X. Zheng, F. Zhang, L. Yu, X. Zhang, H. Dai, Q. Hua, X. Shi, W. Lan, P. Jia, L. Yuan and H. Liu. 2013. Selection and characterization of single-chain recombinant antibodies against spring viraemia of carp virus from mouse phage display library. *J. Virological Methods*. 194:178–184.
- Liu, X., Zhai, H., Zhao, Y., Sun, B., Liu, C., Yang, A., and Zhang, J. 2013. Overexpression of the phosphatidylinositol synthase gene (*ZmPIS*) conferring drought stress tolerance by altering membrane lipid composition and increasing ABA synthesis in maize. *Plant Cell and Environment*. 36(5): 1037-1055.

- Lius, S., R.M. Manshardt, M.M.M. Fitch, J.L. Slightom, J.C. Sanford and D. Gonsalves. 1997. Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. *Molecular Breeding*. 3: 161-168.
- Luara, M. K., A. A. Lukowiak, S. F. Garczynski, R. J. McNall, P. Youngman and M. J. Adang. 1998. Phage Display of a Biologically Active *Bacillus thuringiensis* Toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8):2995-3003.
- Mallory, A C.,L. Ely,T. H. Smith, R. Marathe, R. Anandalakshmi, M. Fagard, H. Vaucheret, Gail 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 Signal. *The Plant Cell*, Vol. 13, 571–583.
- Marouane Melloul, Driss Iraqi, Sripada M Udupa Gilles Erba, My Abdelaziz El Alaoui, Mohammed Ibriz & Elmostafa El Fahime. 2014. Analysis of mRNA Levels of Ten Genes Under Water Stress in *Triticum turgidum subsp. Durum*. *Journal of Plant Studies*; Vol. 3, No. 1. :65-79.
- McCudden, C.R. and Powers-Lee, S.G. 1996. Required Allosteric Effector Site for N-Acetylglutamate on Carbamoyl-Phosphate Synthetase I. *J. Bio. Chem.* 271(30): 18285 – 18294.
- McKendrick L., V.M. Pain and S.J. Morley. 1999. Translation initiation factor 4E. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31. 31-35.
- McKenzie, M. J., V. Mett and P. E. Jameson. 2000. Modified ELISA for the detection of neomycin phosphotransferase II in transformed plant species. *Plant Cell Reports*. 19 : 286–289
- Meijer, A.J., C. Lof, I.C. Ramos, A.J. Verhoeven. 1985. Control of ureagenesis. *Eur. J. Biochem.* 148: 189 – 196.
- Menegazzi, P., F. Guzzo, B. Baldan and P. Mariani. 1993. Purification of calreticulin-like protein(s) from spinach leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1130-1135.
- Mlotshwa, S., Voinnet O., Mette M. F., Matzke M., Vaucheret H., Ding S.W., Pruss G. and B. Vicki Vance. 2002. RNA Silencing and the Mobile Silencing Signal. *The Plant Cell*. S289–S301.
- Napoli C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*. 2: 279-89.
- Nelson, D. E., B. Glaunsinger and H. J. Bohnert. 1997. Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 114: 29 – 37.
- Newsted, W. J., R. N. Chibbar and F. George. 1991. Effect of Low Temperature Stress on the Expression of Sucrose Synthetase in Spring and Winter Wheat Plants. Development of a

- Monoclonal Antibody Against Wheat Germ Sucrose Synthetase. *Biochem. Cell Biol.* 69: 36-41.
- Nieto C., F. Piron, M. Dalmais, C.F. Marco, E. Moriones, M.L. Gomez-Guillamon, V. Truniger, P. Gomez, J. Garcia-Mas M.A. Aranda and A. Bendahmane. 2007. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biology* 7:34. 1-9.
- Nieto C., M. Morales, G. Orjeda, C. Clepet. A. Monfort, B. Sturbois, P. Puigdomenech, M. Pitrat, M. Caboche, C. Dogimont, J. Garcia-Mas, A. Aranda and A. Bendahmane. 2006. An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal* 48. 452-462.
- Pereira, S., H. Maruyama, D. Siegel, P. Van Belle, D. Elder, P. Curtis and D. Herlyn. 1997. A model system for detection and isolation of a tumor cell surface antigen using antibody phage display. *J. Immunological Methods.* 203:11-24.
- Purcifull, D.E., Edwardson J.R., Hiebert E. and D. Gonsalves (1984) *Papaya ringspot virus*. In: Coronel RE (Ed) CMI/AAB Description of Plant Viruses, no. 292. (Vol 2), Wageningen University, the Netherlands. 8 pp.
- Qu F., Ye X., and T. J. Morris. 2008. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *PNAS*, vol. 105, no. 38. 14732–14737.
- Rai, A., Suprasanna, P., D'Souza, SF., and Kumar, V. 2012. Membrane Topology and Predicted RNA-Binding Function of the 'Early Responsive to Dehydration (ERD4). *Plant Protein.* 7(3). 1-11.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* 22, 326–330.
- Riechmann, J.L., S. Lain and J.A. Garcia. 1992. Highlight and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology.* 73: 1-16.
- Sanford, JC and Johnston SA. 1985. The concept of parasite – derived resistance : Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theo Biol* 113: 395 – 405.
- Schneider, H., W. Chaovapong, D. J. Matthews, C. Karkaria, R. T. Cass, H. Zhan, M. Boyle, T. Lorenzini, S. G. Elliott, and L. B. Giebel. 1997. Homodimerization of Erythropoietin Receptor by a Bivalent Monoclonal Antibody Triggers Cell Proliferation and Differentiation of Erythroid Precursors. *Blood*, 89: 473-482.
- Shargool, P. D., J. C. Jain and G. McKay. 1988. Ornithine biosynthesis, and arginine biosynthesis and degradation in plant cells. *Phytochemistry.* 27: 1571 – 1574.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany.* 58-221.

- Sinha, M., R.P. Singh, G.S. Kushwaha, N. Iqbal, A. Singh, S. Kaushik, P. Kaur, S. Sharma and T.P.Singh, (2014). Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal*. 19 pages.
- Slocum, R. D. 2005. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiol Biochem*. 43: 729 – 745.
- SoyBase. <http://soybase.org>.
- Soybean Upstream Regulatory Element (SURE). http://www.igece.org/SystemsBiologyCenter/Soybean/Soybean_files/SURE.html. Accessed on April 10, 2014.
- Storey, W.B. 1976. The botany and sex relationships in papaya. I. Papaya production in Hawaiian Islands. *Hawaii Agric. Exp. Sta. Bull.* 85 : 5-22.
- Sun D., S. Hongyan, C. Jianfei, S. Da, Z. Qinghe, Z. Hong, L. Shengwang , W. Yunfeng, Q. Huaji and F. Li. 2012. Generation of a Mouse scFv Library Specific for Porcine Aminopeptidase N Using the T7 Phage Display System. *J. Virological Methods* 182: 99-103.
- Sun Q, Kong D, Miao C, Duan Q, Yang T, Ye A, Di Z, Gong W. 2014. Variations in global temperature and precipitation for the period of 1948 to 2010. *Environ Monit Assess*. May 16. [Epub ahead of print].
- Sun Q, Kong D, Miao C, Duan Q, Yang T, Ye A, Di Z, Gong W. 2014. Variations in global temperature and precipitation for the period of 1948 to 2010. *Environ Monit Assess*. May 16. [Epub ahead of print].
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008). "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis". *Biotechniques* 44 (5): 619-626.
- Wang, M.B., Wesley, S.V., Finnegan, E.J., Smith, N.A. and Waterhouse, P.M. 2001. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA*. 7: 16-28.
- Wang, Y., X. Zhang, C. Zhang, Y. Liu and X. Liu. 2012. Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries. *Toxicon*. 60:1290–1297.
- Wittich, P.E. and D. Vreugdenhil. 1998. Localization of sucrose synthase activity in developing maize kernels by in situ enzyme histochemistry. *J. Experimental Botany*, 49:1163–1171
- Wyatt, S.E., P.L. Tsou and D. Robertson. 2002. Expression of the high capacity calcium-binding domain of calreticulin increase bioavailable calcium stores in plant. *Transgenic Res*. 11: 1–10.
- Xie Z., Fan B., Chen C. and Z. Chen. 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *PNAS*, vol. 98, no. 1. pp 16516–6521.
- Yeh, S. D., Gonsalves, D., Wang, H. L., Namba, R., and Chui, R. J. 1988. Control of papaya ringspot virus by cross protection. *Plant Disease*. 72: 375-380.

- Yokota, A., S. Kawasaki, M. Iwano, C. Nakamura, C. Miyake and K. Akashi. 2002. Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Ann Bot.* 89: 825 – 832.
- Zhai, S.M., Gao, Q., Xue, H.W., Sui, Z.H, Yue, G.D, Yang, A.F., and Zhang, J.R. 2012. Overexpression of the phosphatidylinositol synthase gene from *Zea mays* in tobacco plants alters the membrane lipids composition and improves drought stress tolerance. *Planta*; 235(1):69-84.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การสกัดพลาสมิด

โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะตามที่ระบุสำหรับพลาสมิดหรือดีเอ็นเอลูกผสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปสกัดพลาสมิดตามวิธีการดังต่อไปนี้

1. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
2. เติม Lysis Solution ลงในสารละลายข้อ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แลวกลับ หลอดเบาๆ 4-6 ครั้ง เพื่อผสมให้เข้ากัน
3. เติม Neutralization Solution ลงในสารละลายข้อ 2 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แลวกลับ หลอดเบาๆทันที 4-6 ครั้ง
4. นำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ใช้ไมโครไปเปตดูดสารละลายใสในข้อ 4 ใส่ลงใน GeneJET™ spin column
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง
7. ล้าง GeneJET™ spin column ด้วย Wash Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แลว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวทิ้ง
8. ล้าง GeneJET™ spin column ด้วย Wash Solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แลว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
9. เทของเหลวในข้อ 8 ทิ้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำ ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ออกจาก Column
10. นำ GeneJET™ spin column ไปวางในหลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ GeneJET™ spin column เพื่อละลาย ดีเอ็นเอออกมา บ่ม 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

ภาคผนวก ข

การตรวจขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

1. เตรียม agarose gel 0.8 % ใน 1X TBE buffer
2. อุณหภูมิให้เจลละลาย รอให้เย็นพอที่มือจับได้
3. เทลงในถาดสำหรับเตรียมเจล แลวาง comb รอให้เจลแข็งประมาณครึ่งชั่วโมง วางถาดเจลลงใน chamber เท 1xTBE ให้ท่วมเจล แลวจึงดึง comb ออก
4. load ดีเอ็นเอตัวอย่างเปรียบเทียบกับ DNA/*Hind* III marker
5. แยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ ตั้งเวลา 30 นาที
6. แกะเจลออกจากถาดนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide 0.5 M เป็นเวลา 5 นาที เพื่อย้อมสีแถบดีเอ็นเอ
7. นำเจลลงแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างสีส่วนเกินออก เป็นเวลา 10 นาที
8. ตรวจการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอบนเจลโดยใช้เครื่อง Gel Document

ภาคผนวก ค

การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis : SDS-PAGE)

การเตรียมเจล

- ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้าด้วยกันคั่นด้วย spacers ล็อคให้แนบติดกันด้วย clamp แล้วขัน สกรูให้แน่นวางลงใน casting stand
- เตรียมสารละลายเจล 8% โดยผสมสารต่อไปนี้ ตามลำดับ คนเบาๆ ให้เข้ากัน แต่ยังไม่ต้องเติม TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) กับ ammonium persulfate

น้ำปราศจากไอออน	4.6	มิลลิลิตร
30% acrylamide monomer solution	2.7	มิลลิลิตร
1.5 M Tris buffer pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	6	ไมโครลิตร
- เติม TEMED กับ ammonium persulfate แล้วเขย่าวนเบาๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ
- ใช้ไปเปิดชุดสารละลายเจลใส่ลงในถาดที่มุ่มแผ่นแก้ว จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
- เตรียม stacking gel monomer โดยผสมสารต่อไปนี้

น้ำปราศจากไอออน	2.7	มิลลิลิตร
30% acrylamide monomer solution	0.67	มิลลิลิตร
1.0 M Tris buffer pH 6.8	0.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	0.04	มิลลิลิตร
TEMED	4	ไมโครลิตร
- เทน้ำที่ปิดหน้าเจลออก ซับให้แห้งด้วยกระดาษ
- ดูดสารละลายเจลใส่ลงระหว่างแผ่นแก้ว เสียบ comb เพื่อให้เกิดช่อง (well)
- ทิ้งไว้จนกว่าเจลจะแข็ง ใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที
- เอา comb ออก ระวังอย่าให้เจลขาด เติม Tank buffer ลงใน chamber

การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

- ใส่สารตัวอย่างที่ผสมกับ 2x sample buffer แล้วหยอดลงในแต่ละช่องของเจล
- ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เสียบปลั๊กต่อกับเครื่องจ่าย กระแสไฟฟ้า
- ตั้งกระแสไฟฟ้าไว้ที่ 120 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง สำหรับเจล 1 แผ่น
- ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อ tracking dye ลงมาถึงด้านล่าง
- นำแผ่นแก้วออกจาก chamber เอา spacers ออก แล้วใช้ spatula งดแผ่นแก้วเบาๆ เจลจะติดอยู่ที่แผ่นแก้วข้างหนึ่ง ค่อยๆ เทเจลลงในถาดย้อม

การเตรียมสีย้อม PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas, USA)

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในเจล นำไปเข้า microwave ด้วยไฟแรง นาน 1 นาที เขย่าต่อ 5 นาที เหน้ที่ทิ้ง
2. ทำซ้ำข้อ 1 จำนวน 3 ครั้ง
3. เติม PageBlue™ Protein Staining Solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปเข้า microwave ด้วยไฟแรง นาน 30 วินาที เขย่าต่อ 20 นาที เทสารละลายทิ้ง
4. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน active site ของยีน CpRDR6

>RDR01

```
AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTT
GTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
CATAATATCACAATTTGGATGGGAAGTTCAGTACCCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGCCTCTCATCTACCTATGCTA
CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
TGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTT
GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
GTTCTTGGACAAGATTTTACGCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTGTACCTTACTTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACAT
GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAAT
AGTGGCCGCAATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTT
CATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGA
TTTGTGGTGATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCCATCCAGGGGATATAAGAAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATT
GCCTTGTTTTCCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGA
AAATCTTGTTCACCCAGCAAAAGAAGCTGGACTCCTATGGATAGACTCCGTCCTCCCTC
```

>RDR02

```
AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTT
GTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
CATAATTTCCCAATTTGGATGGGAAGTTCAGTACCCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGCCTCTCATCTACCTATGCTA
CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
TGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTT
GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
GTTCTTGGACAAGATTTTACGCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTGTACCTTACTTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACAT
GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAAT
AGTGGCCGCAATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTT
CATCCAGGTCTCCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGA
TTTGTGGTGATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCCATCCCGGGATATAAGAAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATT
GCCTTGTTTTCCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGA
AAATCTTGTTCACCCAGCAAAAGAAGCTGGACTCCTATGGATAGACTCCGTCCTCCCTC
```

>RDR03

```
AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAAGACTATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTT
GTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTTGTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
CATAATATCCCAATTTGGATGGGAAGTTCAGTACCCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGCCTCTCATCTACCTATGCTA
CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
TGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTT
GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
GTTCTTGGACAAGATTTTACGCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTGTACCTTACTTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACAT
GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAAT
AGTGGCCGCAATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTT
CATCCAGGTCTCCAGTCCATCCCTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGG
ATTTGTGGTGATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCCATCCCGGGATATAAGAAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTG
ATTTGCCTTGTTTTCCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGAT
GAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAAGAAGCTGGACTCCTATGGATAGACTCCGTCCTCCCTC
```

>RDR04

```
GGGGGGGACTTTTCATAGGGTCTTAGAAGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTA
ATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTTCAAAAGAGTGAA
GACTATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTT
```

TTTGTGAAGACAAGAACATATCCGTCCATAATATCACAAATGGATGGGGAAGTTCCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGG
 GCCAGTGTCTTTTCATCTACCTATGCTACAAATAGAGTTCCATCCTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTT
 CTCTGATGGTATGGTACTATTTTCCATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATGGACATGAACAACCCCTCAGCTTTTTCAG
 ATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCTTAAAGAGTTGATGGAATCAGACTGTCAGTGGCCAGCATGAACAAATFCA
 CGTCAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTGAGCCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTGAGCGTAAA
 TGTTCAGATGAAGTGTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTC
 CTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGCCCATAAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGG
 CTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGATTTTGTTCCTTCTGGAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACT
 GGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGTCTCCAGTCCATCCTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATC
 CAAAGAAATCTAGAAGTGTAAAAGGATTTGTGGTGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATG
 CCCTGATCTACATCATTGTGTGATTGCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGG
 GGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTCCACCCAGCAAAAAGAGCTGGACTCCTATGATATTTATCTATCCCTATCC

>RDR05

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
 CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTT
 GTGTGGGGCAAAAATATTTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTTGAGGGACCGTTTGTCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
 CATAATTTCCCAAATTTGGATGGGGAAGTTCCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTA
 CAATAGAAGTTCCATCCTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTTGGTACTATTTTACA
 TGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT
 GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
 GTTCTTGGACAAGATTTGAGCCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTGAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
 GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAT
 AGTGGCCCAATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
 GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGT
 CATCCAGGCTCCAGTCCATCCTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGTAAAAGGA
 TTTGTGGTGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATT
 GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGA
 AAATCTTGTTCACCCAGCAAAAAGAGCTGGACTCCTATGATT

>RDR06

AGGATATTTTCATAGGGTCTTGAAGAATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTT
 TGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGAC
 TATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGGCAAAAATATTTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTT
 GCTGAAGACAAGACATATCCGTCATAATATCACAAATTTGGATGGGGAAGTTCCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCC
 AGTGTCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTCCATCCTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTTCTC
 TGATGGTATTGGTACTATTTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATT
 AGATACGCTGGCTGCAAGGGGTTGTGACTTGTGGCCATCAAAGGTTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGT
 CTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTGAGCCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTGAGCGCTAAATGT
 TCCAGATGAAGTGTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTT
 GCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGATGCAAGGTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTT
 CAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTTGTTCCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGC
 AGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTTCCAGTCCATCCTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAA
 AGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCAATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCC
 CTGATCTACATCATTGTGTGATTGCTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATGATGGGGA
 TCTTTATTTTGTACCTGGGATGAAAATCTTGTTCACCCAGCAAAAAGAGCTGGACTCCTATGATAGATCCGCAATCCCCATTG

>RDR07

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
 CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTT
 GTGTGGGGCAAAAATATTTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTTGAGGGACCGTTTGTCTTGGTTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
 CATAATTTCAAATTTGGATGGGGAAGTTCCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTA
 CAATAGAAGTTCCATCCTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTTGGTACTATTTTACA
 TGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT
 GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
 GTTCTTGGACAAGATTTGAGCCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTGAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
 GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAT
 AGTGGCCCAATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
 GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGT
 CATCCAGGCTCCAGTCCATCCTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGTAAAAGGA
 TTTGTGGTGTATAGCGAAGAAATCCTTGTTCACCCAGCAAAAAGAGCTGGACTCCTATGATAGATCCGCAATCCCCATTG

>RDR08

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
 CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTT
 GTGTGGGGCAAAAATATTTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTTGAGGGACCGTTTGTCTTGGTTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATTTCCGTC
 CATAATTTCCCAAATTTGGATGGGGAAGTTCCTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTA
 CAATAGAAGTTCCATCCTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTTGGTACTATTTTACA
 TGATCTTACAATGGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT
 GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
 GTTCTTGGACAAGATTTGAGCCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTGAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
 GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAT
 AGTGGCCCAATAATGTTGAGTGCAGGTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
 GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGT
 CATCCAGGCTCCAGTCCATCCTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGTAAAAGGA
 TTTGTGGTGTATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATT

GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGA
AAATCTTGTTCCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCCTATGATAGAGCTCATCCTTTATCAACG

>RDR09

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTGACTAATGGGTTAAATTT
GTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
CATAAATACACAAATGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTA
CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
TGATCTTACAATGGAAGTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT
GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACCTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
GTTCTTGGACAAGATTTTACGCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTTGTACCTTACTTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAAT
AGTGGCGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGGGTTGATGGGCTGCTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGT
CATCCAGGTTCCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGA
TTTGTGGTGATAGCGAAGATCCTTGTCTTTCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATT
GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGA
AAATCTTGTTCCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCCTATGATAGAGCTCGTCTCCCGC

>RDR10

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTGACTAATGGGTTAAATTT
GTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
CATAAATACACAAATGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCATCTACCTATGCTA
CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
TGATCTTACAATGGAAGTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT
GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACCTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
GTTCTTGGACAAGATTTTACGCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTTGTACCTTACTTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAAT
AGTGGCGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGT
CATCCAGGTTCCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGA
TTTGTGGTGATAGCGAAGATCCTTGTCTTTCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATT
GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGA
AAATCTTGTTCCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCCTATGGATAGAGCTGCATCACTCGC

>RDR11

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTGACTAATGGGTTAAATTT
GTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
CATAAATTCACAAATGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCATCTACCTATGCTA
CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
TGATCTTACAATGGAAGTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT
GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACCTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
GTTCTTGGACAAGATTTTACGCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTTGTACCTTACTTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAAT
AGTGGCGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGT
CATCCAGGTTCCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGA
TTTGTGGTGATAGCGAAGATCCTTGTCTTTCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATT
GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATCTTTATTTTGTACCTGGGATGA
AAATCTTGTTCCACCCAGCAAAGAAGCTGGACTCCTATGGATAGAGCTGCATCACTCGC

>RDR12

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTGACTAATGGGTTAAATTT
GTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
CATAAATACACAAATGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCATCTACCTATGCTA
CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
TGATCTTACAATGGAAGTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT
GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACCTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGCTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
GTTCTTGGACAAGATTTTACGCTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTTGTACCTTACTTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAAT
AGTGGCGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAAGGCCAGTGT
CATCCAGGTTCCAGTCCATCACTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGA
TTTGTGGTGATAGCGAAGATCCTTGTCTTTCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTGTGTGATT
GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACACAAATGAAGCTTCTGGGAGCG

>RDR13

AGATATAATGATGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTCTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTGACTAATGGGTTAAATTT
GTGTGGGGGAAAAATATCTTTTCTAGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTC
CATAAATACACAAATGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTTCATCTACCTATGCTA
CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGTCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
TGATCTTACAATGGAAGTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT

GTGGCTTGTGGCCATCAAAAGGTGATGGAATCAGACTGCTACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCACGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTT
 GTTCTTGGACAAGATTTTACGCTGTTTCTGAAACAGGCAGATTTTACCTTACTTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGGGACAT
 GATGGAGTCTATGATTTTCAAATACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAT
 AGTGGCGCCATAATGTTTGAAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCAGCTTTGGG
 GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAAGTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGT
 CATCCAGTCTCCAGTCCATCCTACAAAATTTGCTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGTAAAAGGA
 TTTGTGGTGATAGCGAAGATCCTTGTCTTCCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATT
 GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGG

>RDR14

ATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGT
 TCAAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAAATATTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCG
 TTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATACAAAATTTGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGT
 GCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTTTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCCATCACTAGAGGTCATTTTGGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAA
 ATGGATATGCTTCTTCTGATGTTATTTGGTACTATTTTCAATGGAAGTTTGGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACACCCACCC
 CTCAGCTTTTTCAGATTAGATACCGTGGCTGCAAGGGGTTGTGGCTTTGTTGGCCATCAAAGGTTGATGGAAATCAGACTGTCACTGAGGCCACG
 ATGAACAAATTCACGCTTAACCTATGCTATCTTGGAGATTTGTTTCTTGGACAAGATTTTACGCTTGGTTTCTGAAACAGGCAGATTTGTACCTTAC
 TTTACAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAATTAACAAGATGTTGAGGACCCAGATGTTGC
 ATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGCTAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTG
 AGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTCTTCTGGAAGGTGTTGATGGGCT
 GCTTGGATGAAGTGGCAGTATAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGCTCCAGTCTCCATCACTACAATAATGCTTTTCGAAACATGGTTCTAG
 GTTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCCATCCAGGGGATATAAGAATTTCT
 GAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTGTTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGA
 CGACCTTGATGGGGATCTT

>RDR15

TGTGTCTGATAGATTTTAAAGGGTCACTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTG
 AAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAA
 AATATTTCTTTTACCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTCTGTGTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCAC
 AAATTTGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTT
 CCATCACTAGAGGTCATTTTGGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTCATGATCTTACAA
 TGGAGTTGTGGGAAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTTGTGGCTTGTGG
 GCCATCAAAGGATGGAAATCAGACTGTCACTGAGGCCACCGTTCATCCAGGCTCCAGTCTCACTGAAACAAATTCAGCTTACCATGCTATCTTGGAGATTTGTCTTGGACA
 AGATTTACGCTGTTTCTTGAACAGGCAGATTTGTACCTTACTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTA
 TGATTTTCAAATTAACAAGATGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGCT
 AATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAG
 AAGGCAAGGATTTTGTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGTTGGATGGACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGCTC
 CCAGTCCATCACTACAATAATGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGAT
 AGCGAAGAAATCCTTGTCTTCCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTC
 CCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATC

>RDR16

AGATATAATGATGTTCTGATAGATTTTAAAGGGTCACTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTG
 CCTCCATAGTGAAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAA
 ATATTTCTTTTACGCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTCTGTGTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCAC
 AATAATATCAAAATTTGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTTCTCATCTACCTATGCTA
 CAATAGAAGTTCATCACTAGAGGTCATTTTGGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTACA
 TGATCTTACAATGGAAGTTGTGGGAAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTT
 GTGGCTTGTGGCCATCAAAGGTTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCACCGTTCATCCAGGCTCCAGTCTCACTGAAACAAATTCAGCTTACCATGCTATCTTGGAGATTT
 GTTCTTGGACAAGATTTACGCTGTTTCTTGAACAGGCAGATTTGTACCTTACTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACAT
 GATGGAGTCTATGATTTTCAAATTAACAAGATGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAAT
 AGTGGCGCCATAATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGG
 GCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTTTGTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGTTGGATGAAGTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGCTC
 CATCCAGGCTCCAGTCCATCCTACAAAATTTGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGA
 TTTGTGGTGATAGCGAAGATCCTTGTCTTCCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATT
 GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGGGGATC

>RDR17

GTGCTGATAGATTTTAAAGGGTCACTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGA
 AGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAA
 ATATTTCTTTTACGCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTCTGTGTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCAC
 AATTTGGATGGGGAAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGCCAGTGTCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
 CATCACTAGAGGTCATTTTGGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTTCAATGATCTTACAAT
 GGAAGTTGTGGGAAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAGGGGTTGTGGCTTGTGG
 CCATCAAAGGTTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCACCGTTCATCCAGGCTCCAGTCTCACTGAAACAAATTCAGCTTACCATGCTATCTTGGACAA
 GATTTACGCTGTTTCTTGAACAGGCAGATTTGTACCTTACTTTACGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTAT
 GATTTTCAAATTAACAAGATGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGCAGGCTA
 ATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCTCCGGGAGA
 AGGCAAGGATTTTGTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGTTGGATGAAGTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGCTC
 CAGTCCATCACTACAATAATGCTTTTTCGAAACATGGTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATA
 GCGAAGAAATCCTTGTCTTCCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTTTC
 CCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGATGG

>RDR18

TTTTTAAAGGGTCACTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGGACCTAACAT
 CAAATTTGCCCCCAAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAAATATTCTTTTCT

AGCCTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCCTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACAATTTGGATGGGG
 AAGTTCACCTGACCAGAACTGTCGCAAGGTGCTGCAAGGATGGGCGAGTCTTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCACTAGAGG
 TCAATTTTGGAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTCAATGGAAGTTGTGGA
 GAACTCAAAATGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTCAAAAGGT
 GATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCAGTCTAACCATGCTATCTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGCCTG
 GTTTCCTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAAT
 ACACAAAATGGTTGAGGACCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGGCCATAATGTTGAGTGCA
 GGTTTAACTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTT
 TTGTTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACT
 ACAAATTTGCTTTTCGAACATGTTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAGAATCTAGAAGTGGTAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAATCCT
 TGCTTTCATCCAGGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTCCTCCAGAAAGGTG
 ATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGTATGGGATCTTTATTTTGTCACTGGGATGA

>RDR19

GTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGA
 AGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAA
 ATATTTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCCTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACA
 AATTGGATGGGGAAGTTCACCTGACCAGAACTGTTGCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
 CATCACTAGAGGTCATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAAT
 GGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGG
 CCATCAAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAA
 GATTTTCAGCCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTAT
 GATTTTCAAATTAACAAAATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGGCCATA
 ATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGCTCCGGGAGA
 AGGCAAGGATTTGTTGCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTGATGAAGTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTC
 CAGTCCATCACTACAAAATGCTTTTCGAACATGTTTCTAGGTTTCTGAAATCAAAGAATCTAGAAGTGGTAAAGGATTTGTGGTGATA
 GCGAAGAATCCTTGTCTTCCATCCAGGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTCCT
 CCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGTATGGGATCTTTATTTTGTCC

>RDR20

TGTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGA
 AAGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAA
 ATATTTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCCTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACA
 AATTGGATGGGGAAGTTCACCTGACCAGAACTGTTGCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
 CCATCACTAGAGGTCATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAA
 TGGAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGG
 CCATCAAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAA
 GATTTTCAGCCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTAT
 GATTTTCAAATTAACAAAATGGTTGAGGACCCAGATGTTGACTTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGGCCATA
 AGATTTTCAGCCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTA

>RDR21

GTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGA
 AGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAA
 ATATTTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCCTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACA
 AATTGGATGGGGAAGTTCACCTGACCAGAACTGTTGCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
 CATCACTAGAGGTCATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAAT
 GGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGG
 CCATCAAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAA
 GATTTTCAGCCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTAT
 GATTTTCAAATTAACAAAATGGTTGAGGACCCAGATGTTGACTTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGGCCATA
 ATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTG

>RDR22

AGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGAAGGACCTAA
 CATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAAATATTCTTT
 TCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCCTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACAATTTGGATG
 GGAAGTTTCACCTGACCAGAACTGTTGCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTCATCACTAG
 AGTCAATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGT
 GGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAA
 GGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGC
 CTGGTTTCTTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAA
 ATTACACAAGATGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGGCCATAATGTTGAGT
 GCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGCTCCGGGAGAAGGCAAGGA
 TTTTGTTCCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATC
 ACTACAAAATTTGCTTTTCGAACATGTTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAGAATCTAGAAGTGGTAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAAT
 CTTGTCTTTCATCCAGGGATATAAGAAATCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCCTTGTTCCTCCAGAAAG
 GTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGTATGGG

>RDR23

GTGCTGATAGATTTTTAAGGGTCACCTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCTCCATAGTGA
 AGGACCTAACATCAAATTTGCCCCCAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTCTGACTAATGGGTTAATTTGTGTGGGCGAAA
 ATATTTCTTTTCTAGCCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCCTTCTGCTTGGTTCTTTGCTGAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCACA
 AATTGGATGGGGAAGTTCACCTGACCAGAACTGTTGCAAGTGGGCTGCAAGGATGGGCCAGTGTCTCTCATCTACCTATGCTACAATAGAAGTTC
 CATCACTAGAGGTCATTTTGAAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAAT
 GGAAGTTGTGGAGAACTCAAATTTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGG
 CCATCAAAAGGTGATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCAGCATGAACAAATTCAGTCTAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAA
 GATTTTCAGCCTGGTTTCTGAACAGGCAGATTGTTACCTTACTTTTCAGCGCTAAATGTTCCAGATGAAGTGTGTTGGGACATGATGGAGTCTAT

GATTTTCAAATTACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGGCCATA
 ATGTTGAGTGCAGGTTTTAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAAAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCCTCCGGGAG
 AAAGGCAAGGATTTTGTCTCTTGGAAAAGTGGTTTGATGGGCTTGTGGGATGAACTGGGCAGTACTAGAAACAAGGCCAGTGGTTTCAT
 CCAGGGTCTCCAGTCCATCACTTACAAAATTGCTTTTCCGAAAACATGGTTCTAGGTTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTTGTAAGGAA
 TTTGTGGTGATAGCGAAGAAATCCTTGTCTTCCATCCAGGGGATATAAGAATTTCTCGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATT
 GCCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTGATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTT

>RDR24

TTTTTAAGGGTACCTTTTATGGATGAAGGTATGCAGACGATTAATTTGAATGTTCTGAACTATTATGTTGCCCTCCATAGTGAAGGACCTAACAT
 CAAATTTCTGCCCCCAAAAACGACGGTGTCAAAGAGTGAAGACTATTTCTGACTAATGGGTTTAAATTTGTGTGGGCGAAAATATCTTTTCT
 AGCCTTTTTCATCCAACCAATTGAGGGACCGTCTGCTTGGTCTTTGCTGAAAGACAAGAACATATCCGTCATAATATCAAAAATGGATGGGG
 AAGTTCACTGACCGAAACGTTGCCAAGTGTGCTGCAAGGATGGGCCAGTCTTCTCAATACCTATGCTACAATAGAAGTTCCATCACTAGAGG
 TCAATTTTGTAGCTTAAAGAAATCAAGAGAAATGGATATGCTTCTCTGATGGTATTGGTACTATTTACATGATCTTACAATGGAAGTTGTGGA
 GAACTCAAATTGGACATGAACAACCCACCTCAGCTTTTCAGATTAGATACGCTGGCTGCAAAGGGGTTGTGGCTTGTGGCCATCAAAGGT
 GATGGAATCAGACTGTCACTGAGGCCACGATGAACAAAATTCACGTTCAACCATGCTATCTTGGAGATTTGTTCTTGGACAAGATTTTCAGCCTG
 GTTCTCTGAACAGGAGATTTGTTACCTTACTTTCAGCGTAAATTTCCAGATGAAGTGTTTTGGGACATGATGGAGTCTATGATTTTCAAAT
 ACACAAGATGGTTGAGGACCCAGATGTTGCATTTGAGGTTCTCCTTGCATCATGTTCTGAACAAGGGAATAGTGGCCATAATGTTGAGTGCA
 GGTTTTAAATCCTCTAACAGAACCTCATCTGAGAGGCATGTTGGCTTCAATAAGAGCAGCACAGCTTTGGGGCCTCCGGGAGAAGGCAAGGATTT
 TTGTTCTTCTGGAAGGTGGTTGATGGGCTGCTTGGATGAACTGGCAGTACTAGAACAAGGCCAGTGTTCATCCAGGTCTCCAGTCCATCACT
 ACAAAAATGCTTTTCCGAAACATGTTTCTAGGTTTCTGAGATCCAAAGAAATCTAGAAGTGGTAAAAGGATTTGTGGTGATAGCGAAGAAATCCT
 TGTCTTCACTCCAGGGGATATAAGAATTTCTGAAGCTGTTGATGCCCTGATCTACATCATTTGTGTGATTGCTTGTTTTCCCCAGAAAGGTG
 ATAGGCCCCACAAAATGAAGCTTCTGGGAGCGACCTTGA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CpeIF4E*

>eIF01

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTTTTGCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTTCTGGTTTGATAAATTTCTGTCGCAAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTTGATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATGCTTCAAACATAAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGTATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCGTGAATGTGACAGGCCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTT
 ACGAGGATGCAAGAAGCTTGGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCGGTATGAAA

>eIF02

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTTTTGCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTTCTGGTTTGATAAATTTCTGTCGCAAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTTGATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATGCTTCAAACATAAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGTATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCGTGAATGTGACAGGCCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTT
 ACGAGGATGCAAGAAGCTTGGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCGGTATGAAA

>eIF03

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTTTTGCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTTCTGGTTTGATAAATTTCTGTCGCAAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTTGATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATGCTTCAAACATAAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGTATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCGTGAATGTGACAGGCCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTT
 ACGAGGATGCAAGAAGCTTGGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCGGTATGAAA

>eIF04

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTTTGTCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTTCTGGTTTGATAAATTTCTGTCGCAAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTTGATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATGCTTCAAACATAAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGTATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCGTGAATGTGACAGGCCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTT
 ACGAGGATGCAAGAAGCTTGGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCGGTATGAAA

>eIF05

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTTTGTCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTTCTGGTTTGATAAATTTCTGTCGCAAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTTGATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATGCTTCAAACATAAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGTATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTCGTGAATGTGACAGGCCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTT
 ACGAGGATGCAAGAAGCTTGGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCGGTATGAAA

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACCTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTGTGCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTCTGGTTTGATAAATTCTCTGCCAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTGTATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATTGCTTCAAACATAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCCCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGCATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTGCTGAATGTCAGAGGCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTCC
 ACGAGGATGCAAAGAAGCTTGAGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCCGGTATGAAA

>eIF22

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACCTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTTTTGTCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTCTGGTTTGATAAATTCTCTGCCAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTGTATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATTGCTTCAAACATAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCCCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGCATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTGCTGAATGTCAGAGGCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTCC
 ACGAGGATGCAAAGAAGCTTGAGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCCGGTATGAAA

>eIF23

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACCTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTGTGCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTCTGGTTTGATAAATTCTCTGCCAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTGTATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATTGCTTCAAACATAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCCCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGCATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTGCTGAATGTCAGAGGCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTCC
 ACGAGGATGCAAAGAAGCTTGAGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCCGGTATGAAA

>eIF24

ATGGTAGTAGAAGGAACCCCAAACCTATCATCCACATCCGTCGCGGAAGACAAACCCCAATCCCAATACCGCGAACCCCTAATTCTAGACCTCGTG
 GCGACGAGGAAGACGAGGGGCCGGAGGAAGGGGAGATTGTGGATGAGGATGAATCCAAGAGATCATCAGCCGTGTGCTCCAGCCGCATCCTCT
 CGAGCATCCATGGACATTCTGGTTTGATAAATTCTCTGCCAAATCCAAGCAAGCCACATGGGGTAGCTCTATGCGATCCGTGTATACGTTCCGA
 ACTGTTGAGGAGTTCTGGAGCCTTTACAATAATATACATCATCCAAGCAAGTTGGCTGTTGGAGCAGACTTTTATTGCTTCAAACATAAAATTG
 AACCAAAATGGGAGGACCCCTGTTTGTGCTAATGGAGGAAAATGGACTATGAATTTCCAAAGAGGAAAATCTGATACCTGTTGGTTGTATACGTT
 GCTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGCATCATGGAGATGAAATTTGCGGAGTTGTGCTGAATGTCAGAGGCAGGCAAGAGAAGATAGCCTTATGG
 ACCAAAAATGCTGCAAAACGAGGCTGCTCAGATGAGCATTGGGAAGCAGTGAAGGAATTTCTTGATTACAATGACACCATGGGGTTCATATTTCC
 ACGAGGATGCAAAGAAGCTTGAGAGAGCTGCTAAGAATCGCTCTCCCGGTATGAAA

Solanum lycopersicum N-acetyl-glutamate synthase mRNA, complete cds
 Sequence ID: FJ543466.1 Length: 2226 Number of Matches: 1

Range 1: 133 to 1944 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3263 bits(3618)	0.0	1811/1812(99%)	0/1812(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGTCAGCTTCACCGCAACGCCTTGTGCTCCAGTTATTAACAATGTAAGCTACCAATT			60
Sbjct 133	ATGTCAGCTTCACCGCAACGCCTTGTGCTCCAGTTATTAACAATGTAAGCTACCAATT			192
Query 61	TTGCTCCGACGGATGTTGGACAACTCCAGTTGAAAATAGTTCCAAAGGAGCGAAAG			120
Sbjct 193	TTGCTCCGACGGATGTTGGACAACTCCAGTTGAAAATAGTTCCAAAGGAGCGAAAG			252
Query 121	TTGTTATCATTAAAGGTTAATTTTCGAAGAGATTGCAATTAGTGGCGTGTATATGGG			180
Sbjct 253	TTGTTATCATTAAAGGTTAATTTTCGAAGAGATTGCAATTAGTGGCGTGTATATGGG			312
Query 181	GAACGAAAGTGCAGCTGGTTTTCCGACGTGAGCAGTGCATAAAAAGATGACTTATTC			240
Sbjct 313	GAACGAAAGTGCAGCTGGTTTTCCGACGTGAGCAGTGCATAAAAAGATGACTTATTC			372
Query 241	ATTGGGTTTTTCGAGAAGCTGGCCTTATTTCTGCGCATAGAGGAAGCACTTTTGT			300
Sbjct 373	ATTGGGTTTTTCGAGAAGCTGGCCTTATTTCTGCGCATAGAGGAAGCACTTTTGT			432
Query 301	GTTTTAATCTCAGTGAATTTGTATAGTCTCATTGGATCATCTTCTTATGGACATC			360
Sbjct 433	GTTTTAATCTCAGTGAATTTGTATAGTCTCATTGGATCATCTTCTTATGGATATC			492
Query 361	TCGTCCTTCATGGCTGGGAATCAAGTTTGTCTTGTACCCGGAACATGATCCAAATT			420
Sbjct 493	TCGTCCTTCATGGCTGGGAATCAAGTTTGTCTTGTACCCGGAACATGATCCAAATT			552
Query 421	GATAGGTTTCTGGCTGAAAGAGGAAGTGAAGCCAAAGTATGATAGCCGCTACAGAGTAACA			480
Sbjct 553	GATAGGTTTCTGGCTGAAAGAGGAAGTGAAGCCAAAGTATGATAGCCGCTACAGAGTAACA			612
Query 481	GACCCTGATTCAGTGGCTGCAATGGATGACGCTGGAAGAAATTCGCTTATGATAGAG			540
Sbjct 613	GACCCTGATTCAGTGGCTGCAATGGATGACGCTGGAAGAAATTCGCTTATGATAGAG			672
Query 541	GCAAAGTTGCTCCGGGGCCATTCGACTGGTCCCGCGCATGGAGAAAATAGTCGC			600
Sbjct 673	GCAAAGTTGCTCCGGGGCCATTCGACTGGTCCCGCGCATGGAGAAAATAGTCGC			732
Query 601	TGGCATGATGGTGTAGTGTGCTAGCGGTAATTTCTAGCAATGAAGGAAGAGGAGTT			660
Sbjct 733	TGGCATGATGGTGTAGTGTGCTAGCGGTAATTTCTAGCAATGAAGGAAGAGGAGTT			792
Query 661	GTAGAAGAACTGATTATGCAGCGACTGGTGAAGTAAAGAAGATAGACGTTTCTCGCATT			720
Sbjct 793	GTAGAAGAACTGATTATGCAGCGACTGGTGAAGTAAAGAAGATAGACGTTTCTCGCATT			852
Query 721	CGTGAGAGACTTGATCAGGATAGCATTGTGTATTAAGCAATCTTGATATCCAGCTCT			780
Sbjct 853	CGTGAGAGACTTGATCAGGATAGCATTGTGTATTAAGCAATCTTGATATCCAGCTCT			912
Query 781	GGAGAAGTTTGAAGTGCACACATATGAAGTTGCTACAGCTTGGCTTGGCTCTAGGA			840
Sbjct 913	GGAGAAGTTTGAAGTGCACACATATGAAGTTGCTACAGCTTGGCTTGGCTCTAGGA			972
Query 841	GCAGAGAACTGATTTGTATTATAGATGGTCCAATTCGGATGAGTCTGGCCGCTTATT			900
Sbjct 973	GCAGAGAACTGATTTGTATTATAGATGGTCCAATTCGGATGAGTCTGGCCGCTTATT			1032
Query 901	CCTTCTTGACTCTTCAAGATGCTGACATGCTGGTTCGCAACGAGCAGACAAAGTGG			960
Sbjct 1033	CCTTCTTGACTCTTCAAGATGCTGACATGCTGGTTCGCAACGAGCAGACAAAGTGG			1092
Query 961	GCAGCAGCTAATTATGTAAAAGCTGTCAGTCAAGAGGACTTCAATTGTTAGGTCACAAT			1020
Sbjct 1093	GCAGCAGCTAATTATGTAAAAGCTGTCAGTCAAGAGGACTTCAATTGTTAGGTCACAAT			1152
Query 1021	GGTCTAATGGATCAATCTCTCCTACAATATGAATGGGTTAGCCAAAATACAGTGT			1080
Sbjct 1153	GGTCTAATGGATCAATCTCTCCTACAATATGAATGGGTTAGCCAAAATACAGTGT			1212
Query 1081	TTTCAGAATGGTGTGGTTTTGACAATGGGAATGGGCTTTGGTCTAGTGAGCAGGGTTT			1140
Sbjct 1213	TTTCAGAATGGTGTGGTTTTGACAATGGGAATGGGCTTTGGTCTAGTGAGCAGGGTTT			1272
Query 1141	GCCATTGAGGACAGAGAGGTTAAGTCGACTAAATGGTATCTTTCAGAGTATAGTCGCA			1200
Sbjct 1273	GCCATTGAGGACAGAGAGGTTAAGTCGACTAAATGGTATCTTTCAGAGTATAGTCGCA			1332
Query 1201	GCTGCTTTCGCTGTCAGAGGAGGTTTCAACGAGTTCACCTGCTGGATGGTACTATTGGT			1260
Sbjct 1333	GCTGCTTTCGCTGTCAGAGGAGGTTTCAACGAGTTCACCTGCTGGATGGTACTATTGGT			1392
Query 1261	GGAGTTTACTAAAAGGAATGTTCCAAAAGATGGAGTTGGGACAAATGGTAGCTAGTGAT			1320
Sbjct 1393	GGAGTTTACTAAAAGGAATGTTCCAAAAGATGGAGTTGGGACAAATGGTAGCTAGTGAT			1452
Query 1321	CTTTATGAAGGAACACGAATGGCTCGGCTGTCAGATATCCCGAGATCAACAATATTA			1380
Sbjct 1453	CTTTATGAAGGAACACGAATGGCTCGGCTGTCAGATATCCCGAGATCAACAATATTA			1512
Query 1381	CAACCTTAGAAGAGTCTGGAACATTGATCAGAAGGAGCGAGGAAGAGCTTGTGGAGCA			1440
Sbjct 1513	CAACCTTAGAAGAGTCTGGAACATTGATCAGAAGGAGCGAGGAAGAGCTTGTGGAGCA			1572
Query 1441	CTGCATTATTATTGTTGGAGAGAGAAGCCATGTTATAGCTTGTGCTGCTCTCTTT			1500
Sbjct 1573	CTGCATTATTATTGTTGGAGAGAGAAGCCATGTTATAGCTTGTGCTGCTCTCTTT			1632
Query 1501	CCTTACTTTGAAGAAAATGTGGAGAGGTTGCTGCTATTGCCGTTTCTCCTGATTGCTGT			1560
Sbjct 1633	CCTTACTTTGAAGAAAATGTGGAGAGGTTGCTGCTATTGCCGTTTCTCCTGATTGCTGT			1692
Query 1561	GGCCAGGACAAAGGACAAATTAAGTACATCGAAGAAAGGCATCATCCCTTGGGA			1620
Sbjct 1693	GGCCAGGACAAAGGACAAATTAAGTACATCGAAGAAAGGCATCATCCCTTGGGA			1752
Query 1621	TTGCAAAATGTTTCTGCTTACAACCTCGCACAGCTGATTGGTTTGTGAGGCGCGGTTTT			1680
Sbjct 1753	TTGCAAAATGTTTCTGCTTACAACCTCGCACAGCTGATTGGTTTGTGAGGCGCGGTTTT			1812
Query 1681	TCTGAATGTTCTATCGACCGTATACCAAGCTCaataaaggaaaaaGATCAATCTCTCGT			1740
Sbjct 1813	TCTGAATGTTCTATCGACCGTATACCAAGCTCaataaaggaaaaaGATCAATCTCTCGT			1872
Query 1741	AGTCAAAGTACTACATGAAGAAGCTGCTACCTGATAGAAGTGGTATACGCTTTGACAAAC			1800
Sbjct 1873	AGTCAAAGTACTACATGAAGAAGCTGCTACCTGATAGAAGTGGTATACGCTTTGACAAAC			1932
Query 1801	CCCTTTTCATAA	1812		
Sbjct 1933	CCCTTTTCATAA	1944		

ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ของมะเขือเทศที่ accession number FJ543466.1 กับ ลำดับเบสของยีน NAGS ที่โคลนได้

Zea mays calreticulin (CRT) mRNA, complete cds

Sequence ID: [AF190454.1](#) Length: 1545 Number of Matches: 3

Range 1: 78 to 1340		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2188 bits(2426)	0.0	1243/1263(98%)	0/1263(0%)	Plus/Plus	
Query	1	ATGGCGATCCGCAAGGGGTCTTCGTACGCCGTCGCGGCACCTTCTCGCGCTCGCCTCTGTG			60
Sbjct	78	ATGGCGATCCGCAAGGGGTCTTCGTACGCCGTCGCGGCACCTTCTCGCGCTCGCCTCTGTG			137
Query	61	GCCGCCGTCGCAAGGGAGGTCTTCTCCAGGAGAAGTTCGAAGATGGCTGGGAAAGTAGG			120
Sbjct	138	GCCGCCGTCGCAAGGGAGGTCTTCTCCAGGAGAAGTTCGAAGATGGCTGGGAAAGTCGG			197
Query	121	TGGGTCAAGTCTGAGTGAAGAAGGATGAGAACATGGCTGGTGAATGGAACACACCTCG			180
Sbjct	198	TGGGTCAAGTCCGAGTGAAGAAGGATGAGAACATGGCTGGTGAATGGAACACACATCT			257
Query	181	GGAAAATGGAATGGAGATGCCGAGGACAAAGGTATTCAAACCTCCGAGGATTACAGGTTT			240
Sbjct	258	GGAAAATGGAATGGAGATGCCGAGGACAAAGGTATTCAAACCTCCGAGGATTACAGGTTT			317
Query	241	TATGCCATTTACGCCGAATACCCTGAGTTCAGCAACAGGATAAGACCCTGGTGTGTCAG			300
Sbjct	318	TATGCCATTTACGCCGAATACCCTGAGTTCAGCAACAGGATAAGACCCTGGTGTGTCAG			377
Query	301	TTCTCTGTGAAGCACGAGCAGAAGCTTGACTGCGGTGGTGGCTACGTCAAGTTGCTGGGT			360
Sbjct	378	TTCTCTGTGAAGCACGAGCAGAAGCTTGACTGCGGTGGTGGCTACGTCAAGTTGCTGGGT			437
Query	361	GGTGTGTAGACCAGAAGGAATTTGGTGGAGACACATCTTACAGCATTATGTTTGGACCA			420
Sbjct	438	GGTGTGTAGACCAGAAGGAATTTGGTGGAGACACATCTTACAGCATTATCTCTCGCCCA			497
Query	421	GATATCTGTGGGTACAGCACCAAGAAGGTTTCACTATCCTGACCAAGGATGGCAAAAAC			480
Sbjct	498	GATATCTCTCGGTACAGCACCAAGAAGGTTTCACTATCCTGACCAAGGATGGCAAAAAC			557
Query	481	CACTTGATCAAGAAGGATGTGCCTTGTGAGACTGATCAGTTGACTCATGTTTACACCTTG			540
Sbjct	558	CACTTGATCAAGAAGGATGTGCCTTGTGAGACTGATCAGTTGACTCATGTTTACACCTTG			617
Query	541	ATCATCCGTCCTGATGCAACATACAGCATTCTCATTGATAATGAAGAGAAGCAAACTGGC			600
Sbjct	618	ATCATCCGTCCTGATGCAACATACAGCATTCTCATTGATAATGAAGAGAAGCAAACTGGC			677
Query	601	AGCATCTACGAGCATTGGGATATTCTTCCCCTAAGAAAATCAAGGACCCAGAGGCTAAG			660
Sbjct	678	AGCATCTACGAGCATTGGGATATTCTTCCCCTAAGAAAATCAAGGACCCAGAGGCTAAG			737
Query	661	AAGCCTGAGGACTGGGATGACAAGGAGTACATTCTGACCCTGAGGACAAGAAGCCAGAG			720
Sbjct	738	AAGCCTGAGGACTGGGATGACAAGGAGTACATTCTGACCCTGAGGACAAGAAGCCAGAG			797
Query	721	GGCTATGATGATATCCCAAGGAAATTCCTGACCCTGATGCTAAGAAGCCTGAGGACTGG			780
Sbjct	798	GGCTATGATGATATCCCAAGGAAATTCCTGACCCTGATGCTAAGAAGCCTGAGGACTGG			857
Query	781	GACGATGAGGAAGATGGTGAATGGACTGCCCTACCATTCCCAACCCAGAATACAAGGGA			840
Sbjct	858	GACGATGAGGAAGATGGTGAATGGACTGCCCTACCATTCCCAACCCAGAATACAAGGGA			917
Query	841	CCATGGAAACAAAAGAAAATCAAGAACCAGAACTACCAGGTAATGGAAGACACCTATG			900
Sbjct	918	CCATGGAAACAAAAGAAAATCAAGAACCAGAACTACCAGGTAATGGAAGACACCTATG			977
Query	901	ATTGACAACCCAGATTTTAAAGGATGATCCATACATTTACGCCTTCGACAGCTTGAAGTAC			960
Sbjct	978	ATTGACAACCCAGATTTTAAAGGATGATCCATACATTTACGCCTTCGACAGCTTGAAGTAC			1037
Query	961	ATTGGCATTGAGCTGTGGCAGGTTAAATCGGGCACTCTGTTCGACAACATCATCATCACT			1020
Sbjct	1038	ATTGGCATTGAGCTGTGGCAGGTTAAATCGGGCACTCTGTTCGACAACATCATCATCACT			1097
Query	1021	GATGACCCTGCGTTGGCCAAGACTTTTGCAGAGGAGACCTGGGGCAAGCACAAGGAGGCA			1080
Sbjct	1098	GATGACCCTGCGTTGGCCAAGACTTTTGCAGAGGAGACCTGGGGCAAGCACAAGGAGGCA			1157
Query	1081	GAAAAGGCTGCTTTTGTATGAGGCCGAGAAAAGGAAGAAGAGGATGCCGCCAAGGGT			1140
Sbjct	1158	GAAAAGGCTGCTTTTGTATGAGGCCGAGAAAAGGAAGAAGAGGATGCCGCCAAGGGT			1217
Query	1141	GGGGATGATGAGGATGATGACCTAGAGGATGAGGAAGACGATGAGAAGGCAGACGAGGAC			1200
Sbjct	1218	GGGGATGATGAGGATGATGACCTAGAGGATGAGGAAGACGATGAGAAGGCAGACGAGGAC			1277
Query	1201	AAGGCCGACTCTGATGCCGAGGATGGCAAGGATTCTGATGATGAGAAGCAGCAGGAGCTC			1260
Sbjct	1278	AAGGCCGACTCTGATGCCGAGGATGGCAAGGATTCTGATGATGAGAAGCAGCAGGAGCTC			1337
Query	1261	TAG 1263			
Sbjct	1338	TAG 1340			

ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน *calreticulin (CRT)* ของข้าวโพดที่ accession number AF190454.1 กับ ลำดับเบสของยีน *CRT* ที่โคลนได้

Zea mays Calmodulin (CALM1), mRNA

Sequence ID: [NM_001111985.2](#) Length: 882 Number of Matches: 3Range 1: 117 to 566 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
780 bits(864)	0.0	443/450(98%)	0/450(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCGGACCAGCTCACCGACGAGCAGATCGCGGAGTTCAAGGAGGCCTTCAGCCTCTTC	60		
Sbjct 117	ATGGCGGACCAGCTCACCGACGAGCAGATCGCGGAGTTCAAGGAGGCCTTCAGCCTCTTC	176		
Query 61	GATAAGGATGGCGACGGCTGCATCACTACCAAGGAGCTTGGAAACGGTGATGCGCTCCCTT	120		
Sbjct 177	GATAAGGATGGCGACGGCTGCATCACTACCAAGGAGCTTGGAAACGGTGATGCGCTCCCTT	236		
Query 121	GGCCAGAACCCTACCGAGGCAGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCCGATGGC	180		
Sbjct 237	GGCCAGAACCCTACCGAGGCAGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTCGATGCGGATGGC	296		
Query 181	AATGGGACCATCGACTTCCCGGAGTTCCTGAACCTGATGGCGAGGAAGATGAAGGACACG	240		
Sbjct 297	AATGGGACCATCGACTTCCCGGAGTTCCTGAACCTGATGGCGAGGAAGATGAAGGACACG	356		
Query 241	GACTCGGAGGAGGAGCTCAAGGAGGCCTTCCGCGTCTTTGACAAGGACCAGAACGGTTTC	300		
Sbjct 357	GACTCAGAGGAGGAGCTCAAGGAGGCCTTCCGCGTCTTCGACAAGGACCAGAACGGTTTC	416		
Query 301	ATCTCAGCTGCCGAGCTCCGCCATGTCATGACCAACCTTGGCGAGAAGCTGACTGACGAG	360		
Sbjct 417	ATCTCGGCTGCCGAGCTCCGCCATGTCATGACCAACCTTGGCGAGAAGCTGACCGACGAG	476		
Query 361	GAGGTCGATGAGATGATCCGTGAGGCCGACGTCGACGGCGACGGCCAGATCAACTACGAG	420		
Sbjct 477	GAGGTCGACGAGATGATCCGTGAGGCCGACGTCGACGGCGACGGCCAGATCAACTACGAG	536		
Query 421	GAGTTCGTCAAGGTTATGATGGCCAAGTGA	450		
Sbjct 537	GAGTTCGTCAAGGTTATGATGGCCAAGTGA	566		

ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน *calmodulin* (*CaM*) ของข้าวโพดที่ accession number NM001111985.2 กับ ลำดับเบสของยีน *CaM* ที่โคลนได้