รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. **แผนงานวิจัย**
2. **โครงการวิจัย**

   กิจกรรมที่

   กิจกรรมย่อย..... .....

3. **ชื่อการทดลองที่ (ภาษาไทย)** การถ่ายฝากเวคเตอร์ RNAi เพื่อยับยั้งการเสื่อมสภาพและการแสดงออกของยีน *DHS* ในพืชต้นแบบ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Transformation of RNAi Vector for *DHS* Gene Suppression and Expression in Model Plant

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

นางสาวอรุโณทัย ซาววา[1] นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ[1]

นายพยุงศักดิ์ รวยอารี[1] นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์[1]

---

5. **บทคัดย่อ**

RNAi คือ กระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างหนึ่ง ซึ่งพบทั้งในพืชและสัตว์ อาศัยการทำงานของชิ้นส่วน double strand RNA (dsRNA) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการต่างๆ แล้ว จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของ messenger RNA (mRNA) ทำให้ยีนนั้นๆ ถูกยับยั้งและไม่แสดงออกได้ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Deoxyhypusine Synthase* (*DHS*) ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเบญจมาศในพืชต้นแบบ ได้แก่ ยาสูบ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการถ่ายฝากเข้าต้นเบญจมาศต่อไป การโคลนยีน *DHS* ในเบญจมาศพันธุ์โมนาลิซ่า ได้ชิ้นส่วนยีนมีความยาว 919 เบส มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana sylvestris* ที่ค่า identity 91 85 และ 82 เปอร์เซ็นต์ สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 306 อะมิโน มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana tabacum* ที่ค่า identiry 88 79 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *DHS* จากเบญจมาศกับฐานข้อมูลแสดงการแยกกลุ่มอย่างชัดเจน อาจส่งผลให้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการสร้าง dsRNA ไม่คลายคลึงกับยีน DHS ในยาสูบได้ การสร้างเวคเตอร์ RNAi ได้ชุดยีน *DHSRNAi* ความยาว 1071 เบส ต่อเข้ากับเวคเตอร์ pCAMBIA3304 แล้วนำไปถ่ายเข้าใบยาสูบ ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนถูกนำไปทดสอบความทนต่อสภาวะเครียดบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ต้นยาสูบชุดควบคุมและต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* มีความทนต่อสภาวะเค็มไม่แตกต่างกัน แสดงว่า dsRNA จาก *DHSRNAi* ของเบญจมาศไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DHS* ในยาสูบได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHS* ในเบญจมาศและยาสูบมีความแตกต่างกันมาก จึงควรนำไปทดสอบในต้นเบญจมาศต่อไป

RNA interference is a regulatory mechanism of gene expression in plants and animals. The process is triggered by double-stranded RNA (dsRNA) and requires a conserved set of gene products, mRNA will be inhibited, and no gene expressed. This research is basic data aims to suppress DHS gene that related to senescence of chrysanthemum in plant model, is tobacco. The partial 919 bp of *DHS* gene was cloned from chrysanthemum "Monalisa". Nucleotide blast showed identity 88% 79% and 78% with *DHS* gene of *Senecio vernalis, Arabidopsis thaliana*, and *Nicotiana tabacum* respectively. The deduced amino acid showed 88% 79% and 78% homology with Deoxyhypusine Synthas from putative, *Senecio vernalis, Arabidopsis thaliana*, and *Nicotiana tabacum* respectively. Chrysanthemum *DHS* gene phylogeny presented out groups of other plants, dsRNA might be no homology with tobacco mRNA. The 1071 of *DHSRNAi* construct was cloned into pCAMBIA3304 and transformed by *Agrobacterium tumefaciens.* Transgenic and control tobacco were grown on MS with sodium chloride 2% and 2.5% (W/V). Results showed that transgenic and control tobacco no differentiation of salt tolerance. However, the dsRNA from *DHSRNAi* not mediated gene silencing in tobacco as nucleotide of chrysanthemum and tobacco no homology. Consequently, *DHSRNAi* will be study gene silencing especially in chrysanthemum.

6. คำนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มีบทบาทในการพัฒนาพันธุ์พืชมากขึ้น โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่นำมาการศึกษาหน้าที่ของยีนในพืช ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ ทำให้รวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม หนึ่งในเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ เทคนิค RNA interference (RNAi) คือ กระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมอย่างหนึ่ง ซึ่งพบทั้งในพืช สัตว์ และมนุษย์ โดยอาศัยการทำงานของชิ้นส่วน double strand RNA (dsRNA) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการต่างๆ แล้วจะมีผลไปยับยั้งการทำงานของ messenger RNA (mRNA) ทำให้ยีนนั้นๆ ถูกยับยั้งและไม่แสดงออกได้ การนำเทคโนโลยี RNAi ไปใช้ในพืช ส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งเน้นการนำ RNAi ไปเป็นเครื่องมือในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่จำเพาะ หรือตำแหน่ง promoters ของยีนนั้น เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้ลักษณะใหม่ๆที่ต้องการซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นหลังได้ การสร้าง dsRNA ในพืชมีหลายวิธี เช่น การสร้างพืชปรับปรุงพันธุ์ที่ผลิต sense RNA และ พืชปรับปรุงพันธุ์ที่ผลิต antisense RNA แยกต้นกัน แล้วนำทั้ง 2 ต้นมาผสมข้ามกัน ทำให้เกิดต้นพืชที่ผลิต dsRNA พบว่า ต้นพืชที่ผลิต dsRNA มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ดีกว่าต้นที่ผลิตเพียง sense หรือ anti-sense RNA เพียงอย่างเดียว (Wang et al, 2001) นอกจากนี้ วิธี hpRNA โดยการสร้างลำดับทั้ง sense และ antisense RNA ให้อยู่ใน promoter เดียวกันโดยมี intron คั่นกลางระหว่างลำดับ sense และ antisense ลำดับเหล่านี้จะสร้างเป็น hpRNA หลังจากผ่านกระบวนการถอดรหัส ซึ่งวิธีการใหม่นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในพืชได้ดีกว่า dsRNA โดยจะให้ผล 80-100% (Mallory et al, 2001) ดังนั้นจึงมีการนำวิธี hpRNA มาใช้กันอย่างแพร่หลาย

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยี RNAi ไปใช้ในพืช เช่น การเปลี่ยนแปลงกระบวนการ metabolism ของพืชในการผลิตสารต่างๆ ให้ลดหรือเพิ่มปริมาณสารบางชนิดที่พืชสร้างและเก็บสะสมไว้ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ของพืช เช่น ข้าวสายพันธุ์หนึ่งมี hpRNA ที่มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนของ *glutelin* ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในเมล็ดข้าว ทำให้เกิดข้าวสายพันธุ์ที่มีโปรตีน glutelin ต่ำ จึงมีการ ผลิตข้าวสายพันธุ์นี้มาใช้ในทางการค้า เป็นข้าวสำหรับผู้ป่วยโรคไตที่จำเป็นต้องควบคุมปริมาณโปรตีนในอาหาร (Meins, 2000) และมีการสร้างพืชกาแฟให้มีปริมาณคาเฟอีนน้อยลง โดยปรับปรุงพันธุกรรมให้สามารถสร้าง antisense hpRNA ของยีน *CaMxMt1* ที่มีส่วนในกระบวนการสร้างคาเฟอีน ซึ่ง antisense hpRNA จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi จึงมีผลยับยั้งการสร้างสารคาเฟอีนทำให้มีปริมาณลดลง (Ogita et al, 2003) นอกจากนี้ยังมีการใช้ RNAi เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรคในพืช เช่น การสร้างพืชยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ให้ต้านทานต่อ *tobamovirus* โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *TOM1* และ *TOM3* ที่สามารถถอดรหัสได้เป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส เมื่อยีนดังกล่าวถูกยับยั้งไวรัสจึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้นยาสูบจึงมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส *tobamovirus* ได้ (Asano et al, 2005) และไม้ผลยืนต้น พืชตระกูลถั่ว และพืชไม้ประดับหลายชนิดจะมียีน *iaam* และ *ipt* ที่ทำให้เกิดโรค Crown gall จากเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* จึงมีการใช้ RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค Crown gall ได้เช่นกัน (Dunoyer, 2006)

การเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 ระยะด้วยกัน คือระยะแรกเริ่มของการเจริญเติบโต (exponential phase) ระยะที่สองคือ linear phase เป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจนมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด และระยะสุดท้าย คือ senescence phase เป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตช้าสุดและจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีการเจริญเติบโตอีกเลย (อัตราการเจริญเติบโตมีค่าเท่ากับ 0) เมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (maturity) จากนั้นเซลล์ก็จะเสื่อมสภาพแล้วตายในที่สุด (นิตย์, 2541) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพและโปรแกรมการตายของเซลล์นั้นมีอยู่หลากหลาย ยีน *DHS* หรือ Deoxyhypusine Synthase (EC 2.5.1.46) ชื่อย่อพบในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต อยู่ในกลุ่ม eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) เป็นกระบวนการเริ่มต้นในการเปลี่ยนเป็น hypusine (N-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine) ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเซลล์และกระตุ้นให้เซลล์หมดอายุการใช้งานอย่างรวดเร็ว (Myung Hee *Park et al*. 1998) ซึ่งจะพบมากในช่วงการเสื่อมสภาพของพืช เมื่อมีปริมาณของ *DHS* เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นให้พืชเกิดการแก่ เซลล์เสื่อมสภาพ และตายในที่สุด ดังนั้นการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ *DHS* ในพืชจะช่วยยืดระยะการแก่ การหลุดร่วง หรือการเสื่อมสภาพของพืชได้ ทำให้พืชมีอายุยืน และมีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น จึงส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพเพิ่มขึ้น การศึกษาปริมาณ *DHS* แต่ละระยะการเจริญเติบโตของมะเขือเทศพบว่า เมื่อมะเขือเทศอายุมากขึ้นปริมาณ *DHS* ก็จะมากขึ้นตามไปด้วย และมีมากในระยะการเสื่อมสภาพของดอกและผล รวมถึงระยะที่เกิดสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมของใบมะเขือเทศ(Tzann-Wei wang *et al*. 2001)

การระงับการทำงานของ *DHS* ใน canola โดยใช้ antisense ถ่ายฝากเข้าไปโดยอะโกรแบคทีเรียมพบว่าระดับของ *DHS* ในใบลดลง และเลื่อนระยะการแก่ของใบ ทำให้ใบมีขนาดเพิ่มขึ้น 1.5-2 เท่า และได้ผลผลิตเมล็ดเพิ่มขึ้น 65 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังช่วยต้านทานสภาวะเครียดของ canola ด้วย (Tzann-Wei wang *et al*. 2005) นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของยีน *DHS* ใน *Arabidosis Thaliana* โดยใช้ At*DHS* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพ

ในการเจริญเติบโตทางลำต้นและการเจริญเติบโตในช่วงการสืบพันธุ์ได้ดียิ่งขึ้น (Duguay J *et al.* 2006) และ At*DHS* ยังสามารถยืดการสุกนิ่มของผลมะเขือเทศได้ (Tzann-Wei wang *et al*. 2005) ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะชะลอการเสื่อมสภาพของดอกเบญจมาศ จึงได้ศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *DHS* ของเบญจมาศในพืชยาสูบ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการถ่ายฝากเข้าต้นเบญจมาศต่อไป

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเลี้ยงเชื้อ
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ lamina flow
4. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
6. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ(SORVALL RC28C)
8. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส

<u>วิธีดำเนินการ</u>

1. การโคลนยีน *DHS* จากเบญจมาศ

1.1. การออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลของยีน *Deoxyhypusine Synthase (DHS)* จากฐานข้อมูล Genbank มา 3 accession คือ NM_001036762.1 (*Arabidopsis thaliana*) AJ242017.1 (*Nicotiana tabacum*) และ NM_001247566.1 (*Solanum lycopersicum*) นำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 accession เฉพาะ Open Reading Frame (ORF) โดยใช้โปรแกรม multiple sequence alignment ClustalW2 ใน European Bioinformatics Institute (EBI) (http://www.ebi. ac.uk/Tools /msa/clustalw2/) เพื่อการออกแบบไพรเมอร์

1.2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบเบญจมาศพันธุ์โมนาลิซ่าดอกสีเหลือง โดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen นำใบเบญจมาศปริมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol ผสมอยู่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าสารละลายโดยการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นดูดสารละลายลงไปใน 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 แล้วดูด

สารละลายดังกล่าวลงไปใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ RW_1 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 ไปวางลง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะอาร์เอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติม RNase free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มี RiboLock™ RNase Inhibitor ของบริษัท Fermentas ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.04 ยูนิตต่อไมโครลิตร

1.3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม (cDNA synthesis)

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

1.4 การเพิ่มปริมาณยีน *DHS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

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

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส

2. การสร้างเวคเตอร์ RNAi

2.1. การสร้างชุดยีน *DHS* ชนิด RNAi

2.1.1. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน

หาส่วนของยีน *DHS* ตรงส่วนอนุรักษ์โดยเทียบกับฐานข้อมูลที่ใกล้เคียงกับเบญจมาญมากที่สุด ได้ความยาว 250 เบส และใช้ intron จากฐานข้อมูลของเบญจมาศ *Chrysanthemum zawadskii* chloroplast petB gene, intron, isolate: population K01 หมายเลข accession AB234661.1 ความยาว 571 เบส เป็นตัวกั้นระหว่าง *DHS* sense และ *DHS* antisense เพื่อสร้างเป็น hpRNA ออกแบบไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ดังนี้

- ไพรเมอร์สำหรับชิ้นส่วนยีน *DHS* sense

  xba*DHS*siF1 = 5' GGG GTC TAG AAC TGT AAG TTT GAG GAT TGG ATT AT 3‘

  SiIn*DHS*R = 5’CTT AAT CTA TTT CAT ATA TTC CAT GTC GAC CAC AAG ACC TGG A 3’
- ไพรเมอร์สำหรับชิ้นส่วนยีน *DHS* antisense

  InAs*DHS*F = 5’ GGT GTT TTT GCT TGA GCT GAT GTC GAC CAC AAG ACC TGG A 3’

  sac*DHS*siR4 5' CCC CGA GCT CAC TGT AAG TTT GAG GAT TGG ATT AT 3'
- ไพรเมอร์สำหรับชิ้นส่วน *Chr*Intron

  การเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ครั้งที่ 1 จากดีเอ็นเอเบญจมาศ

  *Chr*IntronF = 5’ GGA ATA TAT GAA ATA GAT TAA G 3’

  *Chr*IntronR = 5’ CAG CTC AAG CAA AAA CAC CCA AAT A 3’

  การเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ครั้งที่ 2 จากชิ้นส่วนพีซีอาร์

  senIntron = 5’ AGG TCT TGT GGT CGA CAT GGA ATA TAT GAA ATA GAT TAA G 3’

  antIntron = 5’TCC AGG TCT TGT GGT CGA CAT CAG CTC AAG CAA AAA CAC C 3’

นำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทำพีซีอาร์ โดยเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

DNA template	4	ไมโครลิตร
5x Buffer	20	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	8	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25mM)	8	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Forward (10 μM)	4	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 μM)	4	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.4	ไมโครลิตร
Distilled water	51.6	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	100	ไมโครลิตร

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส

2.1.2. การเชื่อมต่อชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้เป็นชุดยีน *DHSRNAi*

เมื่อตรวจสอบชิ้นส่วนพีซีอาร์ถูกต้องแล้วนำชิ้นส่วนยีนที่ได้ทั้ง 3 ชิ้นมาเชื่อมต่อกันด้วยวิธีพีซีอาร์ตามปฏิกิริยาดังนี้

Purified *DHS* sense PCR product (~500ng)	10	ไมโครลิตร
Purified *DHS* sense PCR product (~500ng)	10	ไมโครลิตร
Purified *DHS* sense PCR product (~500ng)	10	ไมโครลิตร
5x Buffer	20	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	8	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25mM)	8	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.4	ไมโครลิตร
Distilled water	33.6	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	100	ไมโครลิตร

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 10 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส

2.2. การตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดแยกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

นำผลผลิตพีซีอาร์หยดลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยสีไซเบอร์กรีน ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อใส่ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Gel extraction kit (Qiagen) ตามขั้นตอนดังนี้ ชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดได้แล้วเติม Buffer QG 3 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ให้ผสมกันโดย vortex ทุกๆ 2-3 นาที เมื่อเจลละลายดีแล้วเติม Isopropanol ไป 1 เท่าของเจล ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงใน Column หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม Buffer QG 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ล้าง Column ด้วย Buffer PE 750 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง หมุนเหวี่ยงอีก 1 นาที(เพื่อให้แห้ง) ย้าย Column ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer EB ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่พีซีอาร์เวคเตอร์ แล้วตรวจสอบความถูกต้องของยีนด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.3. การตัดและเชื่อมต่อชุดยีน *DHSRNAi* เข้าสู่เวคเตอร์ pCAMBIA3304

นำชุดยีน *DHSRNAi* ที่อยู่บนพีซีอาร์เวคเตอร์ และเวคเตอร์ pCAMBIA3304 มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตามปฏิกิริยาดังนี้

Vector (~500ng)	10	ไมโครลิตร
10x Buffer fast digestion	3	ไมโครลิตร
XbaI enzyme	1	ไมโครลิตร
SacI enzyme	1	ไมโครลิตร
Distilled water	15	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	30	ไมโครลิตร

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส แล้วตัดชิ้นส่วนเวคเตอร์และชุดยีนมาทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการข้อที่ 2.2 แล้วนำมาการเชื่อมต่อชุดยีนเข้ากับเวคเตอร์ ตามปฏิกิริยาดังนี้

Vector (~30ng)	2	ไมโครลิตร
ชิ้นส่วนชุดยีน *DHSRNAi* (~50ng)	2	ไมโครลิตร
5x ligase reaction Buffer	4	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase, Invitrogen	1	ไมโครลิตร
Distilled water	11	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำพลาสมิดสายผสมที่ได้ไปถ่ายเข้าสู่ competent cell ของเชื้อ *E. coli* ต่อไป

2.4. การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli*

การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยใช้ calcium chloride เพื่อใช้ทำ transformatiom โดยดัดแปลงวิธีของ Inoue และคณะ (1990) มีวิธีการดังนี้คือ streak เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α บนอาหารแข็ง 2xYT บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วจึงนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมานำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาเติมลงในอาหารเหลว 2xYT ใหม่ปริมาตร 1% ของปริมาตรอาหารใหม่ (100 มิลลิลิตร) แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมง ให้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 จึงหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเดิมทิ้งไป จากนั้นละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็นปริมาตร 32 มิลลิลิตร และแช่เย็นไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน

10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลาย TB เดิมทิ้งไป ละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ อีกครั้ง ด้วยสารละลาย TB แช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร เมื่อตะกอนเซลล์ละลายหมดเติม DMSO ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆในที่เย็น แล้วแบ่ง competent cell ที่ได้ไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2.5. การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเติมพลาสมิดสายผสมปริมาตร 6 ไมโครลิตร ใน competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้ว heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นแช่น้ำแข็งทันทีนาน 3 นาที เอาออกมาเติมอาหารเหลว SOC ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำหลอดไปเขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.6. การสกัดพลาสมิดของดีเอ็นสายผสม (recombinant DNA)

คัดเลือกเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 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% acitic acid) ปริมาตร 225 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ แช่น้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ปริมาตร 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 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

3. การถ่ายยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม

3.1 การเตรียม electrocompetent cell ของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

เตรียม electrocompetent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ดัดแปลงตามวิธีของ Abdallah และคณะ (2004) ดังนี้ คือ streak เชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็ง 2xYT บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นานข้ามคืน บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วเติมเชื้อที่เลี้ยงไว้ลงในอาหารเหลว 2xYT ใหม่ ปริมาตร 10% ของปริมาตรอาหารใหม่ (อาหารใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะเติมเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง ให้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 ต่อจากนั้นหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการแช่เชื้อไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเดิมทิ้งไป แล้วละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ ด้วย glycerol 15 เปอร์เซ็นต์ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 ต่อ 20 ของปริมาตรเชื้อที่ใช้เตรียม และแช่เย็นไว้เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายเดิมทิ้งไป จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ให้หมดอย่างเบา ๆ ด้วย glycerol 15 เปอร์เซ็นต์ แช่เย็น ปริมาตร 1 ต่อ 50 ของปริมาตรเชื้อที่ใช้เตรียม สุดท้ายแบ่ง competent cell ที่ได้ไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.2 การถ่ายยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมด้วยวิธีอิเลคโตรโพเรชั่น (electroporation)

นำเวคเตอร์ RNAi*DHS*pCAMBIA3304 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลอดที่มี electrocompetent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วดูดใส่หลอดคิวเวทสำหรับส่งถ่ายกระแสไฟด้วยเครื่อง electro cell manipulator 600 (BTX San Diego, California) โดยตั้งค่าโหมด T เท่ากับ 2.5 กิโลโวลต์ ค่า resistance R เป็น R5 (129ohm) ค่า charging voltage เท่ากับ 1.44 กิโลโวลต์ หลังจากส่งถ่ายกระแสไฟแล้วให้ใส่ในอาหารเหลว LB ทันที แล้วนำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดเชื้อปริมาตร 200-400 ไมโครลิตร เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกเซลล์อะโกรแบคทีเรียมที่มีเวคเตอร์ RNAi*DHS*pCAMBIA3304 ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์

4. การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบและการทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด(ทนเค็ม)

4.1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบยาสูบ

ทำการเพาะเมล็ดใบยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ (*Nicotiana tabacum* L. ‘Burley’) โดยฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ แล้วเพาะบนอาหาร MS (Murashige และ Skoog, 1962) เมื่อเมล็ดเจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์ จึงทำการ subculture เพื่อเพิ่มจำนวนต้น

4.2. การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสำหรับการถ่ายยีน

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด RNAi*DHS*pCAMBIA3304 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนมีค่า OD_{600} ประมาณ 1.0 ถึง 1.5 แล้วนำออกมาเติม acetosyringone ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมล นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ต่ออีก 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางในอาหาร MS เหลวในอัตราส่วนของปริมาตรเชื้อในอาหารเหลว : ปริมาตรอาหาร MS เหลวเท่ากับ 1 : 50 สำหรับใช้ในการถ่ายยีน

4.3. การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปในเชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่เจือจางไว้ กรีดลงบนใบของยาสูบที่เพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ อายุประมาณ 1 เดือนหลังการ subculture โดยกรีดให้เป็นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 เซนติเมตร แล้วจึงนำชิ้นส่วนใบที่ตัดได้ จากนั้นวางลงบนจานอาหารสูตร MS โดยเรียงชิ้นส่วนใบให้เต็มพื้นที่บนจานอาหารประมาณ 20 ชิ้น เก็บจานอาหารไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน (cocultivation) จากนั้นจึงย้ายชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการ cocultivation ลงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, benzyladenine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, glufosinate 50 ppm. และ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางจานอาหารให้ได้รับแสง รอจนกระทั่งชิ้นส่วนใบเกิดแคลลัส นำแคลลัสที่ได้ย้ายลงในอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน รอจนกระทั่ง แคลลัสเจริญเป็นต้น จึงนำต้นที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ไปตรวจสอบการได้รับชุดยีน *DHSRNAi* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

4.4. การทดสอบความทนสภาวะเครียด(ความเค็ม)

ทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด (ความเค็ม) ของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *DHSRNAi* โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Random Design; CRD) เปรียบเทียบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *DHSRNAi* และชุดควบคุม (ไม่ได้รับการถ่ายยีน) ใช้ต้นยาสูบอายุประมาณ 3 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้น 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน แล้วบันทึกค่าความสูงต้นและค่าความสว่างของสีใบดัดแปลงตามวิธีของ Lukinac และคณะ (2009) โดยวัดค่าความสว่างสี ΔE_{RGB} จากการคำนวณค่า R G B ที่ได้จากโปรแกรม Photoshop มาคำนวณด้วยสูตร

$$\Delta E_{RGB} = \sqrt{\left[(\Delta R)^2 + (\Delta G)^2 + (\Delta B)^2\right]}$$

เมื่อ ΔR = ค่าสี $R_{\text{เริ่มต้น}}$ – ค่าสี $R_{\text{ตัวอย่าง}}$

ΔG = ค่าสี $G_{\text{เริ่มต้น}}$ – ค่าสี $G_{\text{ตัวอย่าง}}$

ΔB = ค่าสี $B_{\text{เริ่มต้น}}$ – ค่าสี $B_{\text{ตัวอย่าง}}$

ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้นตุลาคม 2555 สิ้นสุดกันยายน 2558 รวม 3 ปี

สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

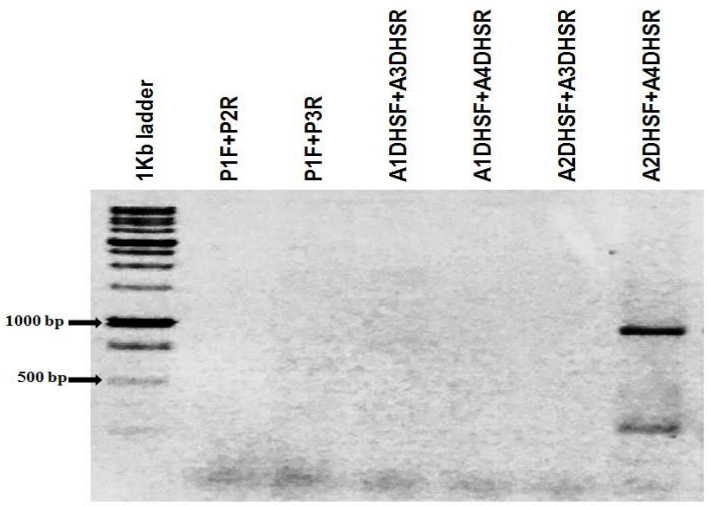
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีน *DHS* จากเบญจมาศ

การโคลนยีน *DHS* จากเบญจมาศจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์แบบ Degenerate เนื่องจากยังไม่มีรายงานการโคลนยีนดังกล่าวในเบญจมาศ การทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้แล้วตามรายงานของ Ober และ Harmann (1999) จำนวน 3 เส้น ได้แก่ P1F P2R และ P3R ร่วมกับไพรเมอร์ที่ออกแบบเองโดยใช้ข้อมูลยีน *Deoxyhypusine Synthase (DHS)* จากฐานข้อมูล Genbank มา 3 accession คือ NM_001036762.1 (*Arabidopsis thaliana*) AJ242017.1 (*Nicotiana tabacum*) และ NM_001247566.1 (*Solanum lycopersicum*) มาออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 4 เส้น ได้แก่ A1DHSF A2DHSF A3DHSR และ A4DHSR (ตารางที่ 1) เมื่อนำไพรเมอร์ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน *DHS* ในเบญจมาศ โดยการจับคู่ดังนี้ P1F+P2R P1F+P3R A1DHSF+A3DHSR A1DHSF+A4DHSR A2DHSF+A3DHSR และ A2DHSF+A4DHSR พบว่ามีเพียง 1 คู่ไพรเมอร์ คือ A2DHSF+A4DHSR (A2DHSF: 5'-ARG GNT AYG AYT TYA AYM AAG G-3' ร่วมกับ A4DHSR: 5'-AAR GCW ATR GTK GCA TCA CAR T-3') เท่านั้น ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *DHS* ในเบญจมาศได้ (ภาพที่ 1) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนที่ได้มีความยาว 919 เบส (ภาพที่ 2) สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 306 อะมิโน (ภาพที่ 3) เมื่อนำไป blast กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHS* ในเบญจมาศ มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana sylvestris* ที่ค่า identity 91 85 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนของยีน DHS มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana tabacum* 88 79 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แบบ degenerate ที่ใช้ในการโคลนยีน *DHS*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เบส	เอกสารอ้างอิง
P1F	5'-ARG ARG AYT TYA THA ART GYY TNG-3'	24	Ober และ Harmann (1999)
P2R	5'-GCY TCR TCN GGW CKN GMR CC-3'	20	Ober และ Harmann (1999)
P3R	5'-CCC CAN SWN ACN GCY TCR TC-3'	20	Ober และ Harmann (1999)
A1DHSF	5'-ATG TTY CAA GCH TCH AAY CTY GG-3'	23	Degenerate primer design
A2DHSF	5'-ARG GNT AYG AYT TYA AYM AAG G-3'	22	Degenerate primer design
A3DHSR	5'-AAA NGT YTC AGC NAC MAR YA-3'	20	Degenerate primer design
A4DHSR	5'-AAR GCW ATR GTK GCA TCA CAR T-3'	22	Degenerate primer design



ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *DHS* ด้วยไพรเมอร์จากตารางที่ 1 บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

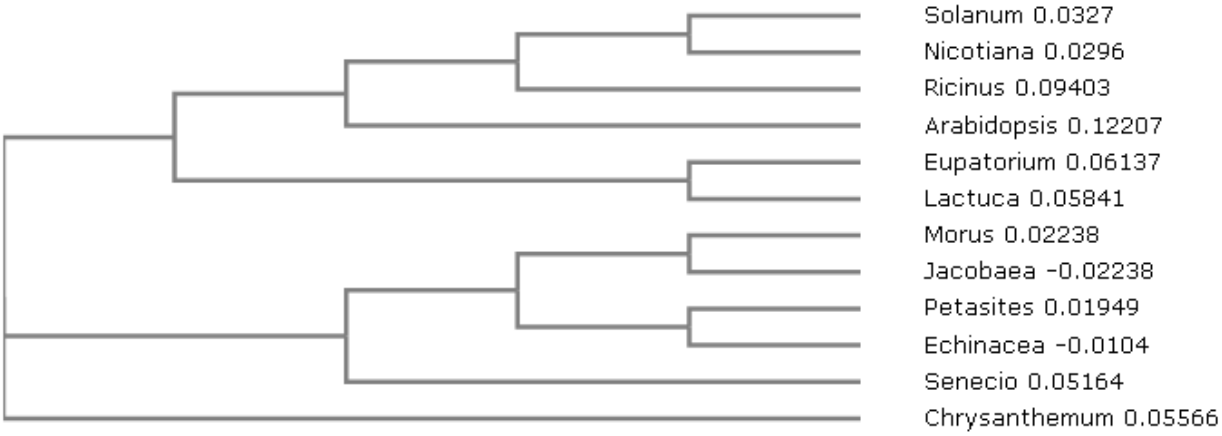
```
AGGGTATGATTTTAACCAAGGGGTCAATCATTCTGAGCTTCTTAAATCCATGGTTTCCACTGGCTTTCAAGCTTCTA
ATCTTGGTGATGCTATTCATATTGTTAATCAAATGCTAGATTGGAGGCTTTCACATGAAAAATTAGCAGAAGATTGC
AGTGAGGAAGAGAAGAATCCAACATACAGAGAGTCTGTCAAGTGCAAAATATTCCTTGGTTTCACTTCAAACCTCAT
TTCCTCTGGTGTCCGAGACATTATTCGGTATCTAGTCCAACATCATATGGTGGAAGTGATTGTGACAACAACTGGTG
GGATTGAGGAAGATCTAATAAAATGCCTTGCAAACACATATAGAGGTGAATTTTCTCTACCTGGCGCTGCATTGCGT
TCGAAAGGACTAAATCGTATTGGTAACTTGTTGGTGCCTAATGATAACTACTGTAAGTTTGAGGATTGGATTATCCC
AATATTTGACCAAATGTTGGAAGAACAAAAAACAAAGAATGTATTATGGACACCGTCAAAAGCGATAGCGCGTTTGG
GGAAGGAAATTAACGACGAGAGTTCATATCTATATTGGGCATATAAGAACGATATTCCCGTCTTCTGTCCCGGCTTG
ACAGATGGATCTCTTGGGGACATGTTATATTTCCATTCGTTTCGCAATCCAGGTCTTGTGGTCGACATAGTACAAGA
TATAAGGGCTATCAACGGTGAGGCTGTGCATGCAAACCCTAGGAAGACTGGAATGATAATTCTAGGAGGGGGGTTGC
CAAAACATCACATCTGCAACGCGAATATGATGCGTAATGGTGCAGATTATGCTGTTTTCATCAACACAGCCCAAGAA
TTTGATGGTAGTGATTCAGGTGCTCGTCCTGATGAAGCTGTCTCATGGGGGGAAAATACGTGGTTCTGCTAA
```

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *DHS* ที่โคลนได้จากเบญจมาศ ความยาว 919 เบส

```
  1 GYDFNQGVNH SELLKSMVST GFQASNLGDA IHIVNQMLDW RLSHEKLAED CSEEEKNPTY
 61 RESVKCKIFL GFTSNLISSG VRDIIRYLVQ HHMVEVIVTT TGGIEEDLIK CLANTYRGEF
121 SLPGAALRSK GLNRIGNLLV PNDNYCKFED WIIPIFDQML EEQKTKNVLW TPSKAIARLG
181 KEINDESSYL YWAYKNDIPV FCPGLTDGSL GDMLYFHSFR NPGLVVDIVQ DIRAINGEAV
241 HANPRKTGMI ILGGGLPKHH ICNANMMRNG ADYAVFINTA QEFDGSDSGA RPDEAVSWGE
301 NTWFC*
```

ภาพที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนยีน *DHS* ที่โคลนได้จากเบญจมาศ ความยาว 306 อะมิโน

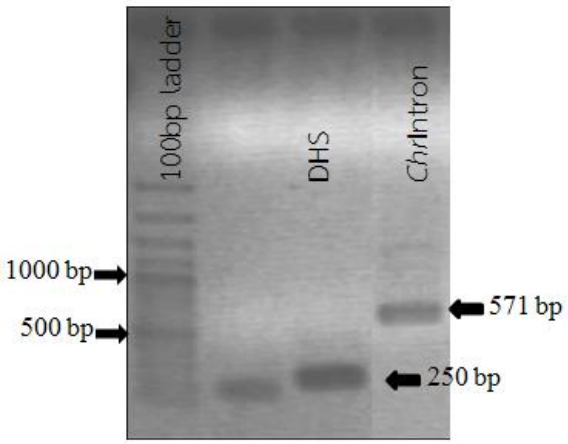
การนำนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHS* จากเบญจมาศมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับฐานข้อมูล พบว่า ยีน *DHS* แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *Solanum* sp. *Nicotiana* sp. *Ricinus* sp. *Arabidopsis* sp. *Eupatorium* sp. *Lactuca* sp. กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Morus* sp. *S.Jacobaea Petasites* sp. *Echinacea* sp. *Senecio* sp. และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ *Chrysanthemum* sp. (ภาพที่ 4) ซึ่งเบญจมาศได้แยกออกจากกลุ่มอื่น (out group) อย่างชัดเจน แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเบญจมาศมีความคล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่นต่ำ ดังนั้นการสร้าง dsRNA อาจส่งผลให้ไม่คล้ายคลึง (homologue) กับยีน *DHS* เป้าหมายในยาสูบได้



ภาพที่ 4 แผนผัง Phylogenatic tree ของยีน *DHS* จากเบญจมาศกับฐานข้อมูล GenBank

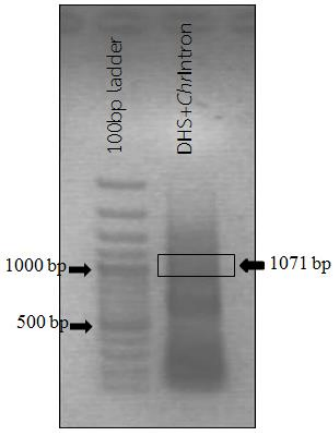
2. การสร้างเวคเตอร์ RNAi

กระบวนการ RNA silencing หรือ RNA interference (RNAi) คือ กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างหนึ่ง ซึ่งมีการยับยั้งการแสดงออกของยีนหลังการถอดรหัสพันธุกรรม (Post-Transcriptional Gene Silencing : PTGS) ไม่ให้เกิดการแปลรหัส (Translation) ไปเป็นโปรตีนต่อไปได้ สามารถเกิดขึ้นได้ในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตทุกชนิดรวมถึงเชื้อรา ซึ่งกระบวนการเกิด RNAi เป็นการทำงานของ Dicer ที่จดจำตำแหน่งของ siRNA, hpRNA หรือ dsRNA เป็นต้น สามารถส่งถ่ายสัญญาณแบบ cell- to-cell และทางท่ออาหาร (Mlotshwa *et.al.,* 2002) ดังนั้นการสร้างเวคเตอร์ RNAi สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือเมื่อมีการถอดรหัสนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอมาเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอแล้ว ชุดยีนที่ออกแบบต้องสร้าง siRNA, hpRNA หรือ dsRNA ขึ้นมาได้ เพื่อให้กระบวนการ RNAi ในพืชเริ่มทำงาน การทดลองนี้จึงได้นำยีน *DHS* ความยาว 250 เบส และส่วนของ *Chr*Intron ความยาว 571 เบส จากเบญจมาศ (ภาพที่ 5) เพื่อสร้างชุดยีนให้เป็นแบบ hpRNA เมื่อมีการถ่ายยีนสำเร็จ พืชจะสามารถสร้าง dsRNA จากชุดยีน *DHSRNAi* ได้



ภาพที่ 5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *DHS* และ *Chr*Intron จากดีเอ็นเอเบญจมาศ บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

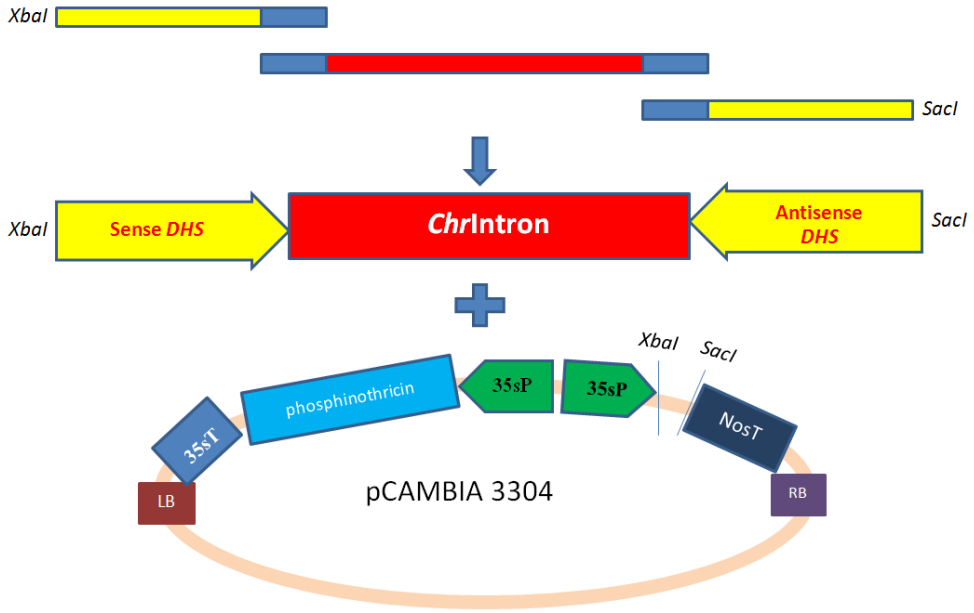
การสร้างชุดยีนแบบ hpRNA ได้ประยุกต์ใช้วิธีพีซีอาร์ในการสร้างชุดยีน *DHSRNAi* ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์ต้องมีส่วนปลายของชิ้นส่วนยีนที่ต้องการต่อออกไปจากไพรเมอร์เดิม 19-25 เบส ดังนั้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้น คือ *DHS* senese จากเดิมความยาว 250 เบส จะได้ความยาวประมาณ 275 เบส *Chr*Intron จากเดิมความยาว 571 เบส จะได้ความยาวประมาณ 620 เบส และ *DHS* antisense จากเดิมความยาว 250 เบส จะได้ความยาวประมาณ 275 เบส เมื่อนำมาเชื่อมต่อกันด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วจะได้ความยาว 1071 เบส จึงทำการตัดคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่ให้ขนาดประมาณ 1071 เบส (ภาพที่ 6) นำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปโคลนเข้าพีซีอาร์เวคเตอร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าการเชื่อมต่อชิ้นยีนทั้ง 3 ชิ้น ความยาว 1071 เบส มีส่วนของ *DHS* sense *Chr*Intron และ *DHS* antisense ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ชุดยีน *DHSRNAi* ถูกต่อเข้ากับเวคเตอร์ pCAMBIA3304 (ภาพที่ 8) แล้วตรวจสอบความถูกต้องของชุดยีนหลังจากการต่อด้วยการตัดด้วยเอ็นไซม์ *XbaI* และ *SacI* อีกรอบ ได้ผล คือ มีเวคเตอร์ pCAMBIA3304 ขนาด 3304 เบส และ *DHSRNAi* ขนาด 1071 เบส (ภาพที่ 9) ดังนั้นชุดยีน *DHSRNAi* ที่ได้จะเป็นแบบ hpRNA มีส่วนประกอบเริ่มจากโปรโมเตอร์คือ 35s Promoter ต่อด้วย *DHS* senese *Chr*Intron *DHS* antisense และ nos terminator (ภาพที่ 10) เมื่อมีการถอดรหัสจะได้อาร์เอ็นเอที่สร้าง dsRNA ได้ สามารถนำไปถ่ายยีนเข้าสู่พืชต่อไป



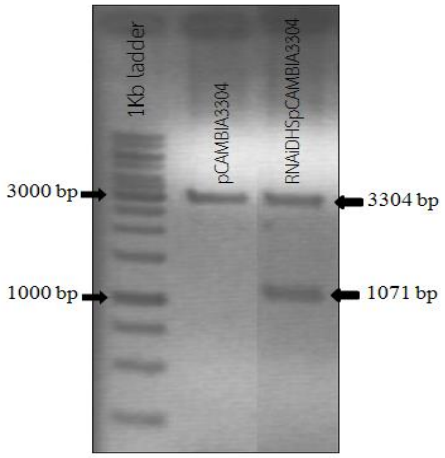
ภาพที่ 6 ชิ้นส่วนยีนที่ต่อกันด้วยวิธีพีซีอาร์ และการตัดชิ้นส่วนยีน *DHS* แบบ sense, antisense และ *Chr*Intron ที่เชื่อมต่อกัน บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

ACTGTAAGTTTGAGGATTGGATTATCCCAATATTTGACCAAATGTTGGAAGAACAAAAAACAAAGAATGTATTATGG
ACACCGTCAAAAGCGATAGCGCGTTTGGGGAAGGAAATTAACGACGAGAGTTCATATCTATATTGGGCATATAAGAA
CGATATTCCCGTCTTCTGTCCCGGCTTGACAGATGGATCTCTTGGGGACATGTTATATTTCCATTCGTTTCGCAATC
CAGGTCTTGTGGTCGACATggaatatatgaaatagattaagaaatatttgaactatgattcatacttaatatgcaaa
cctcgtggccggactccaaaaagattccaagaatttagaaaagaaatataaattgtttcttctttcaaatgtatgct
tattttgactcaaagacaactctttcttcggatttttggttattatctattcgtggaataagggatgatccgcgggt
tcttactcagggaatctttgggcttaacttagtatttttattgaatcatcgtggttctagtatgaatctggggtttt
aatcgattcatagggtcttaacaagagaattcctatcaataataaatcaaaaaatacaaaaacaaataaaagaaaga
aatagggaagagaggattcaagaggcccgtaaggatcaagataaagacgactgagccaacttgatattttggtatta
tcaccacaaagaagaactttcggatttttttgattcatatcttcagagcagattgaatcggaaagcaataagtttct
ttctattacatatccgttccgaccagtatttgggtgtttttgcttgagctgATGTCGACCACAAGACCTGGATTGCG
AAACGAATGGAAATATAACATGTCCCCAAGAGATCCATCTGTCAAGCCGGGACAGAAGACGGGAATATCGTTCTTAT
ATGCCCAATATAGATATGAACTCTCGTCGTTAATTTCCTTCCCCAAACGCGCTATCGCTTTTGACGGTGTCCATAAT
ACATTCTTTGTTTTTTGTTCTTCCAACATTTGGTCAAATATTGGGATAATCCAATCCTCAAACTTACAGT

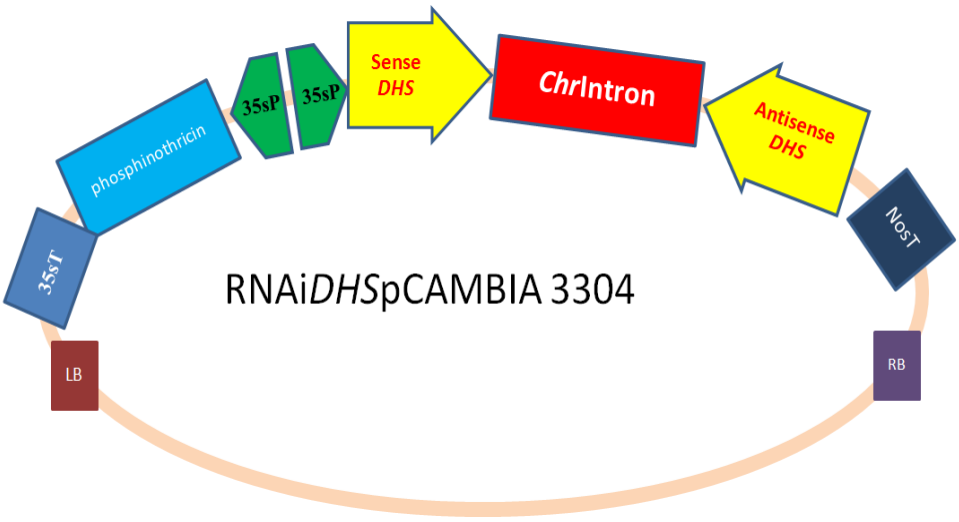
ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน *DHSRNAi* ที่มี *Chr*Intron ตรงกลางขนาดความยาว 1071 เบส



ภาพที่ 8 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน *DHSRNAi* เข้าสู่เวคเตอร์ pCAMBIA3304



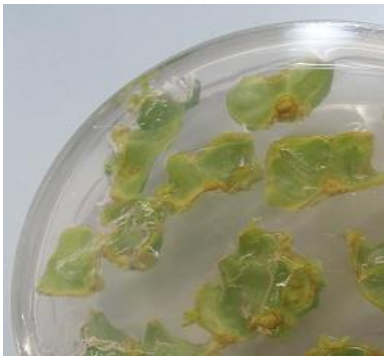
ภาพที่ 9 การตรวจสอบเวคเตอร์ RNAi*DHS*pCAMBIA 3304 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI* และ *SacI* บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์



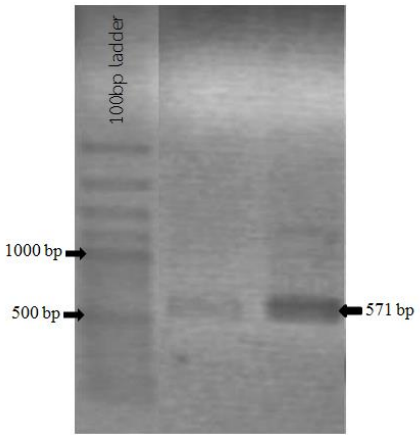
ภาพที่ 10 เวคเตอร์ RNAi*DHS*pCAMBIA 3304

3. การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบและการทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด(ความเค็ม)

ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจะคัดเลือกบนอาหารที่มีสาร glufosinate เนื่องจากเวคเตอร์ pCAMBAI3304 มียีนคัดเลือก *phosphinothricin* ที่ต้านทานต่อสาร glufosinate การทดสอบความต้านทานปริมาณสารที่ใช้ คือ 10,50 และ 100 ppm พบว่า ทุกความเข้มข้นสามารถทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตาย โดยความเข้มข้นที่ 50 และ 100 ppm เริ่มแสดงอาการเหลืองทั้งใบในระยะเวลา 3 วัน แต่ 10 ppm เริ่มแสดงอาการหลังจาก 4 วัน จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 50 ppm ในการคัดเลือก การเกิดแคลลัสบนอาหารคัดเลือก MS ที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, benzyladenine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร glufosinate 50 ppm และ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบแคลลัสสามารถเจริญบนอาหารคัดเลือก เมื่อ 2 สัปดาห์ นำแคลลัสที่ได้ย้ายลงในอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน รอจนเจริญเป็นต้น (ภาพที่ 11) นำไปตรวจสอบชุดยีน *DHSRNAi* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *Chr*IntronF + *Chr*IntronR ตรวจสอบเฉพาะชิ้น *Chr*Intron ได้ความยาวของชิ้นยีน 571 เบส (ภาพที่ 12) จากต้นยาสูบทั้งหมด 6 ต้น มียีน *DHSRNAi* จำนวน 2 ต้น จึงนำไปเลี้ยงขยายเพื่อทดสอบความทนต่อสภาวะเครียดต่อไป



ภาพที่ 11 ภาพการเกิดแคลลัสหลังจากการถ่ายยีน และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน



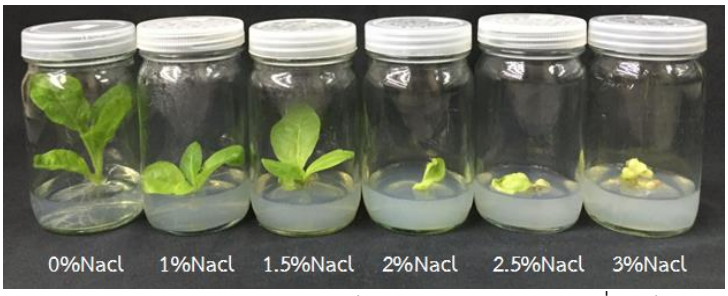
ภาพที่ 12 การตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยไพรเมอร์ *Chr*IntronF + *Chr*IntronR ความยาว 571 เบส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

การควบคุมการแสดงออกยีน *DHS* ในพืช มีรายงานว่าเมื่อยีนถูกยับยั้งการแสดงออกภายหลังจากการถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ ไม่สามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีนได้ ทำให้พืชมีการเสื่อมสภาพของพืชน้อยลง ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่ดีและสามารถทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ ได้ (Tzann-Wei wang *et al*. 2005) การทดลองนี้จึงได้ทดสอบการสร้างสภาวะเครียด (ความเค็ม) ในต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนอายุ 2 สัปดาห์ โดยการเพิ่มปริมาณสารโซเดียมคลอไรด์ลงไปในอาหาร MS ที่ความเข้มข้น 1-3 เปอร์เซ็นต์ (W/V) พบว่าต้นยาสูบเริ่มแสดงอากาศใบซีดในสัปดาห์แรก และไม่มีการเจริญเติบโตหลังจากอยู่บนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 14 วัน (ภาพที่ 13) เมื่อวัดความสูงต้นที่อายุ 21 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยความสูงต้นสูงสุดในอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมากได้แก่ 1.5 2 1 3 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.9 5.0 4.8 4.7 3.8 และ 3.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ดังนั้น การเปรียบเทียบความทนเค็มของต้นยาสูบชุดควบคุม (ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน) และต้นที่มียีน *DHSRNAi* จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแสดงอาการเสื่อมสภาพชัดเจน และให้ค่าเฉลี่ยของความสูงแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความสูงต้นยาสูบปกติ(ไม่ได้รับการถ่ายยีน) อายุ 21 วัน บนอาหาร MS ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-3 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	ค่าเฉลี่ยความสูงต้น (เซนติเมตร)
MS+NaCl 0 เปอร์เซ็นต์	5.9ab
MS+NaCl 1 เปอร์เซ็นต์	4.7abc
MS+NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์	5.0b
MS+NaCl 2 เปอร์เซ็นต์	4.8b

MS+NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์	3.5c
MS+NaCl 3 เปอร์เซ็นต์	3.8c
95% Confidence Interval	*
Std. Error	0.5



ภาพที่ 13 การทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด (ทนเค็ม) ของต้นยาสูบปกติที่ใช้เป็นชุดควบคุม อายุ 21 วัน บนอาหาร MS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-3 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

การทดสอบความทนเค็มของต้นยาสูบอายุ 3 สัปดาห์ บนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ใบยาสูบแสดงลักษณะซีดลงเริ่มจากโคนใบขึ้นไป และเริ่มแสดงอาการชัดเจนเมื่ออายุ 14 วัน (ตารางที่ 3) การวัดค่าความสว่างสีของใบนั้นเมื่อค่าเพิ่มขึ้นหมายความว่าใบยาสูบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้น จากการวัดค่าความสว่างสีมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 และ 21 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าความสว่างสีในวันที่ 7 ซึ่งการเลี้ยงต้นยาสูบบนอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมแสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีเมื่อ 7 14 และ 21 วัน ที่ 57.84 66.97 และ 129.62 ตามลำดับ ต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* แสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีที่ 36.15 53.00 และ 106.16 ตามลำดับ สำหรับต้นยาสูบบนอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมแสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีเมื่อ 7 14 และ 21 วัน ที่ 21.33 64.90 และ 143.16 ตามลำดับ ต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* แสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีที่ 28.62 53.36 และ 110.23 ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าความสว่างสีในชุดควบคุมและมียีน *DHSRNAi* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยความสูงของต้นพบว่าต้นยาสูบทั้งชุดควบคุมและมียีน *DHSRNAi* ในทุกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ วันที่ 7 14 และ 21 มีการเพิ่มขึ้นที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) แสดงว่ายาสูบทั้ง 2 ชนิด ตอบสนองต่อความเค็มไม่ต่างกัน

ตารางที่ 3 ภาพเปรียบเทียบต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่ยีน *DHSRNAi* อายุ 7-14 วัน หลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ 2 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (%)		จำนวนวันหลังเติมโซเดียมคลอไรด์		
		7 วัน	14 วัน	21 วัน
2 เปอร์เซ็นต์	ยาสูบชุดควบคุม			
	ยาสูบที่มียีน DHSRNAi			
2.5 เปอร์เซ็นต์	ยาสูบชุดควบคุม			
	ยาสูบที่มียีน DHSRNAi			

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยความสว่างสีใบและความสูงต้นยาสูบ

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	จำนวนวัน	ต้นยาสูบ	ค่าเฉลี่ย		
			ค่าความสว่างสีใบ (ΔE_{RGB})		ความสูงต้น (เซนติเมตร)
Ms+NaCl 2.0 เปอร์เซ็นต์	7	ชุดควบคุม	57.84a	*a	3.82a
		มียีน *DHSRNAi*	36.15a		5.02a
	14	ชุดควบคุม	66.97a	*b	4.78a
		มียีน *DHSRNAi*	53.00a		5.80a
	21	ชุดควบคุม	129.62a	*c	5.80a
		มียีน *DHSRNAi*	106.16a		4.20a
Ms+NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์	7	ชุดควบคุม	21.33a	*a	5.78a
		มียีน *DHSRNAi*	28.62a		4.36a
	14	ชุดควบคุม	64.90a	*b	4.38a
		มียีน *DHSRNAi*	53.36a		4.76a
	21	ชุดควบคุม	143.16a	*c	4.70a
		มียีน *DHSRNAi*	110.23a		6.10a
95% Confidence Interval			*		*
Std. Error			10.70		0.35

เมื่อต้นยาสูบชุดควบคุมและต้นที่มียีน *DHSRNAi* มีความทนทานต่อสภาวะเค็มและการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการทำงานของยีน *DHS* ในรูปแบบเวคเตอร์ RNAi เมื่อสร้าง dsRNA แล้วไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ *DHS* ในยาสูบได้ เนื่องจากการทำงานของกระบวนการ RNAi เริ่มจาก DCLs หรือ dsRNA-specific endonuclease สามารถจดจำและตัด dsRNA ที่สร้างได้จาก *DHSRNAi* ออกเป็นสายสั้นๆ เรียกว่า small interference RNA (siRNA) มีความยาวประมาณ 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 (Qu *et.al*, 2008) แต่ยีน *DHS* ที่ได้จากเบญจมาศมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างจากยาสูบมากและมีลักษณะเป็นกลุ่มแยกออกมาจากพืชชนิดอื่นๆ นิวคลีโอไทด์มีจึงความแตกต่างกัน เมื่อถูกตัดเป็น siRNA เพียงแค่ 21-25 เบส จึงไม่ที่มีความคล้ายคลึง (homologue) กับ *DHS* ของ mRNA เป้าหมายในยาสูบ และจากข้อมูลการ blast ยีน *DHS* ที่ได้จากเบญจมาศกับฐานข้อมูลจะเห็นว่าตรงกับ *N. sylvestris* แต่การทดลองนี้ได้ใช้ต้นยาสูบ *N. tabacum* และไม่พบความเหมือนกับ *N. tabacum* แสดงว่ายีน *DHS* ที่ได้จากเบญจมาศมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากยาสูบ *N. tabacum* มาก ดังนั้น dsRNA จาก *DHSRNAi* ของเบญจมาศจึงไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DHS* ในยาสูบได้

9. สรุป

การถ่ายฝากเวคเตอร์ RNAi เพื่อยับยั้งการเสื่อมสภาพและการแสดงออกของยีน *DHS* ในพืชต้นแบบ พบว่า การโคลนยีน*DHS* ในเบญจมาศ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์แบบ degeneration P1F+P2R P1F+P3R ตามรายงานของ Ober และ Harmann (1999) แต่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยไพร์เมอร์ A2DHSF: 5'-ARG GNT AYG AYT TYA AYM AAG G-3' และ A4DHSR: 5'-AAR GCW ATR GTK GCA TCA CAR T-3' ได้ชิ้นส่วนยีนที่ได้มีความยาว 919 เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 306 อะมิโน เมื่อนำไป blast กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana sylvestris* ที่ค่า identity 91 85 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนของยีน DHS มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana tabacum* 88 79 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHS* จากเบญจมาศมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับฐานข้อมูล พบว่ายีน *DHS* แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *Solanum* sp. *Nicotiana* sp. *Ricinus* sp. *Arabidopsis* sp. *Eupatorium* sp. *Lactuca* sp. กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Morus* sp. *S.Jacobaea Petasites* sp. *Echinacea* sp. *Senecio* sp. และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ *Chrysanthemum* sp. ซึ่งเบญจมาศได้แยกออกจากกลุ่มอื่น (out group)

อย่างชัดเจน แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเบญจมาศมีความคล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่นต่ำ การสร้าง dsRNA อาจส่งผลให้ไม่คล้ายคลึง (homologue) กับยีน *DHS* เป้าหมายในยาสูบได้

การสร้างเวคเตอร์ RNAi จากยีน *DHS* ความยาว 250 เบส และส่วนของ *Chr*Intron ความยาว 571 เบส จากเบญจมาศ ให้เป็นแบบ hpRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ สามารถเชื่อมต่อได้ชุดยีน *DHSRNAi* ความยาว 1071 เบส เมื่อต่อเข้ากับเวคเตอร์ pCAMBIA3304 ได้ชุดยีน *DHSRNAi* ที่มีส่วนประกอบเริ่มจากโปรโมเตอร์คือ 35s Promoter ต่อด้วย *DHS* senese *Chr*Intron *DHS* antisense และ nos terminator การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบได้ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DHSRNAi* จำนวน 2 ต้น จึงนำไปเลี้ยงขยายแล้วทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด (ความเค็ม) ของต้นยาสูบอายุ 3 สัปดาห์ บนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ใบของยาสูบแสดงลักษณะซีดลงเริ่มจากโคนใบขึ้นไป และเริ่มแสดงอาการชัดเจนเมื่ออายุ 14 วัน การวัดค่าความสว่างสีมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 และ 21 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าความสว่างสีในวันที่ 7 ซึ่งการเลี้ยงต้นยาสูบบนอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมแสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีเมื่อ 7 14 และ 21 วัน ที่ 57.84 66.97 และ 129.62 ตามลำดับ ต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* แสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีที่ 36.15 53.00 และ 106.16 ตามลำดับ สำหรับต้นยาสูบบนอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมแสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีเมื่อ 7 14 และ 21 วัน ที่ 21.33 64.90 และ 143.16 ตามลำดับ ต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* แสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีที่ 28.62 53.36 และ 110.23 ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าความสว่างสีในชุดควบคุมและมียีน *DHSRNAi* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยความสูงของต้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อต้นยาสูบชุดควบคุมและต้นที่มียีน *DHSRNAi* มีความทนทานต่อสภาวะเค็มและการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการทำงานของยีน *DHS* ในรูปแบบเวคเตอร์ RNAi เมื่อสร้าง dsRNA แล้วไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ *DHS* ในยาสูบได้ ซึ่งยีน *DHS* ที่ได้จากเบญจมาศมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างจากยาสูบมาก และมีลักษณะเป็นกลุ่มแยกออกมาจากพืชชนิดอื่นๆ นิวคลีโอไทด์จึงมีความแตกต่างกันมาก เมื่อถูกตัดเป็น siRNA เพียงแค่ 21-25 เบส จึงไม่ที่มีความคล้ายคลึง (homologue) กับ *DHS* ของ mRNA เป้าหมายในยาสูบ ดังนั้น dsRNA จาก *DHSRNAi* ที่ได้จากเบญจมาศจึงไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DHS* ในยาสูบได้ จึงควรนำไปศึกษาในเบญจมาศเท่านั้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

สามารถนำเอาเทคนิคการสร้างเวคเตอร์ RNAi ไปสร้างเวคเตอร์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน การควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ รวมถึงการยับยั้งการทำงานของยีนทีไม่ต้องการในพืชได้ และสามารถนำเอาเวคเตอร์ *DHSRNAi* ที่ได้จากการทดลองนี้ไปถ่ายยีนเข้าเบญจมาศต่อไป

11. คำขอบคุณ(ถ้ามี)

ขอขอบพระคุณ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาการสร้างเวคเตอร์ *DHSRNAi* และเอื้อเฟื้อเวคเตอร์ pCAMBIA3304 สำหรับการทดลองนี้

12. เอกสารอ้างอิง

นิตย์ ศกุนรักษ์. 2541. สรีรวิทยาของพืช. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 218 หน้า

Abdallah, M., A. H. Fahmy, K. S. Abdalla and W. S. Maaty. 2004. Transformation of a High Molecular Weight (HMW) glutenin subunit Dy10 gene into maize. Arab J. Biotech. 7(2): 165-172.

Asano, M., Satoh, R., Mochizuki, A., Tsuda, S., Yamanaka,T., Nishiguchi, M., Hirai, K., Meshi, T., Naito, S. and Ishikawa, M. 2005. Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. FEBS Letters 579(20): 4479-4484.

Duguay J, Jamal S, Liu Z, Wang TW, Thompson JE. (2006) Leaf-specific suppression of deoxyhypusine synthase in Arabidopsis thalina enhances growth without negative pleiotropic effects. Plant Physiol. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=Abstract&list_uids=16600425&query_hl=3&itool=pubmed_docsum

Dunoyer, P. 2006. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent Agrobacterium tumefaciens infections. Nat Genet 38: 258–263.

Inoue, H., H. Nojima., and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene. 96: 23-28.

Lukinac J., S. Jokie, M. Planinie, D. Magdic, M. Bilic, S. Tomas, D. Velie and A. Bucic-Kojic. 2009. An application of image analysis and colorimetric methods on color change of dehydrated asparagus (Asparagus maritimus L.). Agric. conspec. sci. Vol. 74 No. 3. pp. 233-237.

Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V.B. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile silencing signal. Plant Cell 13:571-583.

Meins, F. Jr. 2000. RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. Plant Mol Biol 43: 261-273.

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.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3): 473-497.

Myung Hee Park, Young Ae Joe and Kee Ryeon Kang. (1998). Deoxyhypusine Synthase Activity Is Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry. 273: 1677-1683.

Ober, D. and T. Hartmann. 1999. Deoxyhypusine Synthase from Tobacco. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No.45. pp. 32040-32047**.**

Ogita, S., Uefuji, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. 2003.. Producing decaffeinated coffee plants. Nature 423: 823.

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.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3th ed.

Tzann-Wei Wang, Chun-Guang Zhang, Wendy Wu, Linda M. Nowack, Ewa Madey, and John E.Thompson. (2005). Antisence Suppression of Deoxyhypusine Synthase in Tomato Delays Fruit Softening and Alters Growth and Development. Plant Physiology. 138: 1372-1382.

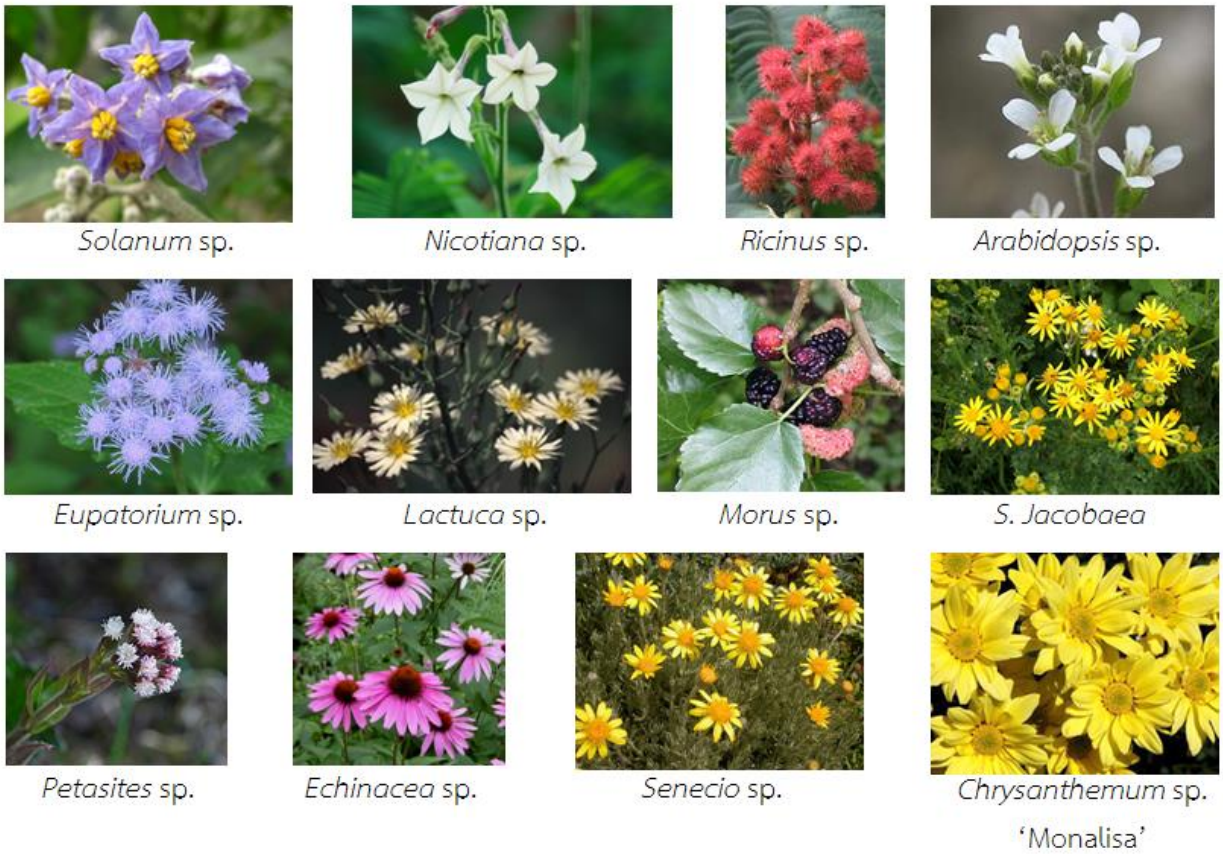
Tzann-Wei Wang, Lily Lu, Denis wang, and John E. Thompson. (2001). Isolation and Characterization of Senescence-induced cDNAs Encoding Deoxyhypusine Synthase and Eucaryotic Translation Initiation Factor 5A from Tomato. The Journal of Biological Chemistry. 276:17541-17549

Tzann-Wei wang, Wendy Wu, Chun-Guang Zhang, Linda M.Nowack, Zhongda Liu and John E. Thompson.(2005). Antisense suppression of deoxyhypusine synthase by vacuum-infiltration of *Agrobacterium* enhances growth and seed yield of canola**.** Physiologia Plantarum**.** Vol. 124 Page 493

Vol 1–3.

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.

15. ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 ภาพลักษณะดอกของพืชที่ใช้ฐานข้อมูลยีน *DHS* จาก GenBank มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Phylogenetic tree

---

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ