รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย : วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิจัยพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ในสภาวะโลกร้อน

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การปรับปรุงและถ่ายฝากยีนทนทานสภาพแวดล้อม OsSKIPa สู่ถั่วเหลืองโปรตีนสูง โดยเทคนิค Ovary-drip

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Genetic Manipulation and Gene Insertion of OsSKIPa, a Multistress Tolerance Gene, to High Protein Soybean Using Ovary Drip Transformation.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายพงศกร สรรค์วิทยากุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางสุภาวดี ง้อเหรียญ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางสุมนา งามผ่องใส ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีนโดยตรงซึ่งเป็นเทคนิคใหม่จะมีประโยชน์อย่างมาก และที่นิยมมากขึ้นเรื่อยๆเพราะความกังวลที่เกิดจากการใช้เวคเตอร์ ยีนต่อต้านสารปฏิชีวนะต่างๆและยีนที่ไม่พึงประสงค์อื่นๆ ซึ่งจะติดมากับเวคเตอร์ แต่ linear gene cassette จะมีเพียงยีนที่เราต้องการเท่านั้นที่จะทำการถ่ายเข้าสู่พืช ในงานทดลองนี้ได้ดำเนินการศึกษาเพื่อจะทำการถ่ายยีนทนแล้ง OsSKIPa เข้าสู่ถั่วเหลืองโดยวิธี Ovary-drip และประสบความสำเร็จในการออกแบบและสังเคราะห์ linear gene cassette เพื่อใช้ในการดำเนินการทดลอง รวมถึงพัฒนาวิธีการ Ovary dip ในถั่วเหลืองพันธุ์ไทยแต่อย่างไรก็ดียังไม่พบ Insert จาก linear gene cassette ในถั่วเหลืองรุ่นลูกที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธีดังกล่าวซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมและอุณภูมิของประเทศไทยที่ไม่เหมาะสมต่อวิธีการดังกล่าวและทำให้ไม่เกิดการถ่ายยีนขึ้น

6. คำนำ

สิ่งที่แตกต่างระหว่างพืชกับสัตว์นั้นคือ พืชจำเป็นที่จะต้องปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงตลอดเวลาโดยการปรับตัวระดับโมเลกุลและทางสรีรวิทยา ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในกระบวนการปรับตัวนี้ คือยีนซึ่งอยู่กลุ่ม Transcription factor ใน*พืช (S. Yamaguchi et al. 2006, JK. Zhu 2002)* จากหลักฐานที่ผ่านมามีข้อบ่งบอกว่า กระบวนการสังเคราะห์ RNA มีส่วนเกี่ยวข้องกับ การปรับตัวของพืชต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย นอกจากนี้มีการค้นพบว่ามียีน 8 ยีน ที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์ RNA มีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ สภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย หรือ phytohormone abcisic acid เช่น โปรตีน

STABILIZED 1 เป็น Ortholog ของ PRP46 ใน Arabidopsis โปรตีนชนิดนี้ เป็น Splicing factor ของ Pre-mRNA ทำหน้าที่ตัด หรือเปลี่ยนสภาพ pre-mRNA ที่ไม่เสถียร (แต่ Pre-mRNA ตัวนี้สำคัญต่อการปรับตัวของพืชต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย (GH. Lee et al. 2006)

อย่างไรก็ตาม หน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราห์ RNA เหล่านี้ ยังไม่เป็นที่เปิดเผยแน่ชัดว่าเกี่ยวข้องอย่างไรกับกระบวนการปรับตัวของพืช แต่หลักฐานเหล่านี้เป็นหลักฐานสำคัญที่สนับสนุนว่า RNA metabolism มีส่วนสำคัญต่อการปรับตัว และการตอบสนองของพืชต่อปัจจัยที่ไม่เอื้ออำนวยต่างๆ หนึ่งในนั้นก็คือ ยีน OsSKIPa, ยีน OsSKIPa สังเคราะห์โปรตีนที่ชื่อว่า SKIP หรือ SKI interating protein มีรายงานว่า โปรตีน SKIP มีความสำคัญต่อ Cell viability ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด โปรตีน SKIP และ โฮโมลอกส์ Bx42 ได้ถูกค้นพบใน *Drosophila (H. Saumweber et al 1990)* และ ระบุเอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค two-hybrid screening (*R. Dahl et al. 1998*) โปรตีน SKIP ได้รับการระบุว่าเป็น transcriptional coregulator และ spliceosome component ในมนุษย์ *(JD. Figueroa et al. 2004, GM. Leong et al. 2004)*

โฮโมลอกส์ทั้งหมดของ SKIP ที่ได้รับการวิจัย ประกอบด้วยโดเมน SNW/SKIP มี Signature เป็นรหัสเปปไทน์ S-N-W-K-N ซึ่งอาจจะมีความสำคัญต่อหน้าที่พื้นฐานของโปรตีน ตัวอย่างเช่น เป็น Cofactor ใน Transcription และ Splicing (*Folk P. et al. 2004*) อย่างไรก็ตาม หน้าที่อื่นๆ ของ โฮโมลอกส์ SKIP แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เช่น โฮโมลอกส์ Bx42 ใน *Drosophila melanogaster* มีหน้าที่ร่วมในส่วนของ ecdysone-stimulated transcription *(C. Wieland et al.1994)* และ การถ่ายทอด Notch signal *(D. Negeri et al. 2002)* นอกจากนี้ โปรตีน SKIP ยังจำเป็นต่อการพัฒนาระบบประสาท *(AI. Ivanov et al. 2004)* และเนื้อเยื่ออื่นๆอีกด้วย *(D. Negeri et al. 2002)* ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โปรตีน PRP45 เป็นโปรตีนซึ่งประกอบด้วยโดเมน SNW/SKIP มีความจำเป็นต่อ cell viability *(M. Albers et al. 2003)* โฮโมลอกส์ ของ SKIP CeSKIP (Skp-1) ใน *Caenorhabditis elegans* (หนอนจำพวกหนึ่ง) ได้ถูกระบุว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญใน transcription complexe ของ RNA Polymerase II และ *C. elegans* ไม่สามารถขาดโปรตีนตัวนี้ได้ในการดำรงชีวิตอยู่ *(M. Kostrouchova et al. 2002)* สำหรับในพืชนั้น โฮโมลอกส์ ของ Ski-interacting protein (SKIP) ในข้าว (*Oryza sativa L.*) มีความเกี่ยวข้องโดยจำเป็นกับ cell viability และการปรับตัวต่อสภาวะความเครียดในข้าว *(Xin Hou. et al. 2009)*

สำหรับการถ่ายยีนในถั่วเหลืองนั้น วิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบันคือ การเหนี่ยวนำการถ่ายยีนโดย Agrobacterium ใน cotyledonary nodes และ การใช้ gene gun particle bombardment ใน embryogenic cultures (Sato et al. 1993, Droste et al. 2002, Paz et al. 2004; 2006, Xue et al. 2006) อย่างไรก็ตามเทคนิคที่กล่าวมานั้นมีวิธีการที่ซับซ้อนและต้องการความเชี่ยวชาญ โดยเฉพาะในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเหลืองซึ่งทำได้ยาก (Bent 2000, Mello-Farias and Chaves 2008). การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนสู่พืชโดยตรงด้วยประอัตราความสำเร็จสูงและไม่ต้องผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเป็นประโยชน์

อย่างมาก เทคนิคดังกล่าวอาจช่วยแก้ปัญหาด้านข้อจำกัดของ Genotype specificity ปัญหาจากการแปรผันทางพันธุกรรมซึ่งเป็นผลมาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการลดลงของภาวะเจริญพันธุ์ (Hu and Wang, 1999)

เทคนิคการถ่ายยีน โดยใช้ Agrobacterium เป็นตัวเหนี่ยวนำในเซลล์สืบพันธุ์ของพืช (ดอก) หรือการถ่ายยีนแบบ in planta floral-dip เป็นที่นิยมใช้และประสบความสำเร็จในการใช้ในพืชต้นแบบ Arabidopsis thaliana และพืชตระกูลถั่ว Medicago truncatula (Clough and Bent. 1998, Trieu et al. 2000, Bent 2006, Zhang et al. 2006) โดยเทคนิคการใช้ Agrobacterium เพื่อการถ่ายยีนแบบ in planta floral-dip นั้นกระทำโดยการแช่ เซลล์สืบพันธุ์ซึ่งพัฒนาเต็มที่แล้วลงในสารละลาย Agrobacterium ซึ่งมี Plasmid DNA อยู่ภายใน โดยมีเป้าหมายที่เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียรวมถึง Ovary (Ye et al. 1999, Bechtold et al. 2000, Bent 2000, Desfeux et al. 2000) อัตราความสำเร็จในการถ่ายยีนใน Arabidopsis thaliana มีค่าอย่างน้อย 1% และในถั่ว Medicago มีค่าอยู่ระหว่าง 4.7% - 76% (Trieu et al. 2000)

ดังนั้นหากสามารถพัฒนาเทคนิคในการถ่ายยีนโดยตรง จะมีประโยชน์อย่างมาก ซึ่งมีรายงานการใช้เทคนิคการถ่ายยีนซึ่งเป็นสายรหัสพันธุกรรมอย่างเดียวโดยตรงผ่าน Stigma เพื่อให้รหัสพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ไข่ หรือเรียกว่า Ovary-drip ทั้งแบบใช้ Agrobacterium เป็นสื่อนำ ในฝ้าย (Chen et al. 2010) ข้าวสาลี (Zale et al., 2009) และใช้ linear gene cassette อย่างเดียวในข้าว (Luo and Wu, 1988) ข้าวโพด (Yang et al., 2009; Wu et al. 2008) ถั่วเหลือง (Gao *et al*. 2007; Liu et al. 2009a; Liu et al. 2009b) หัวหอม (Cheng et al. 2009) มะเขือเทศ (Chen et al. 2010) ถั่วเขียว (ศิริวรรณ อินทร์พรหม 2548)โดยมีอัตราความสำเร็จในการถ่ายยีนอยู่ระหว่าง 3% - 11% ทั้งนี้การใช้ linear gene cassette เป็นที่นิยมมากขึ้นเรื่อยๆเพราะความกังวลที่เกิดจากการใช้เวคเตอร์ ยีนต่อต้านสารปฏิชีวนะต่างๆและยีนที่ไม่พึงประสงค์อื่นๆ ซึ่งจะติดมากับเวคเตอร์ แต่ linear gene cassette จากมีเพียงยีนที่เราต้องการเท่านั้นที่จะทำการถ่ายเข้าสู่พืช

ในงานทดลองนี้จะทำการถ่ายยีนทนแล้ง OsSKIPa เข้าสู่ถั่วเหลืองโดยวิธี Ovary-drip และใช้ linear gene cassette เป็นหลักเพื่อพัฒนาเทคนิคดังกล่าวมาใช้กับถั่วเหลืองพันธุ์ไทย

7. วิธีดำเนินการ

วิธีการ

การโคลน Cassette และการตรวจสอบความถูกต้องของ Vector และ Cassette

นำเวคเตอร์ pCAMBIA2300 ซึ่งมี Cassette OsSKIPa ที่อยู่ภายใน Transform เข้าสู่ E-coli สายพันธุ์ DH5**α** (ดูวิธีการทดลอง, ดัดแปลงจาก Chung, C. T. *et al.* 1989)

การตรวจสอบ Transformants

Spread เชื้อที่ได้รับการถ่าย Vector ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ Spread เชื้อที่ไม่ได้รับการถ่าย Vector (negative control) ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ความเข้มข้นเดียวกัน ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อบน Plate

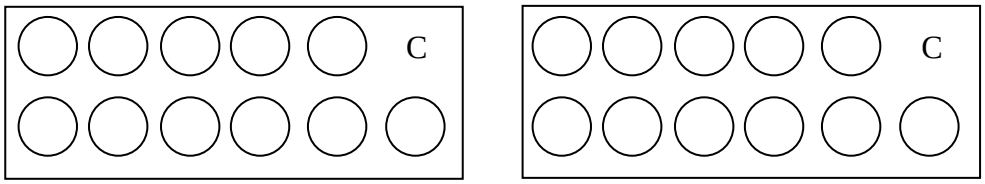
ดำเนินการตรวจสอบ Transformant โดย ตรวจสอบ Vector ที่ได้รับการถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียโดยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ Primer Os1_F และ Os1_R (Ta = 53°C) โดยมี PCR product มีขนาด 1007 bp และ 746 bp เพื่อใช้ตรวจสอบทิศของโพรโมเตอร์และยีน

การเพิ่มปริมาณ Transform cassette

นำเวคเตอร์จาก Clone ที่ 5 มาใช้ในการเพิ่มปริมาณ **Transform cassette** โดยConventional PCR ด้วย primer LB_Os และ RB_Os ที่ Ta=47°C Volume total 50 µl เพื่อให้ได้ Transform cassette ที่ขนาด 2,810 bp และทำให้บริสุทธิ์ (QIAquick PCR purification Kit) และวัดความเข้มข้น โดยจะได้ความเข้มข้นของ Transform cassette ระหว่าง 100 – 200 ng/µl

การทดสอบ Artificial pollination และการทำ Ovary drip

ดำเนินการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ S17-3 ในกระถาง จำนวน 22 กระถาง และ เชียงใหม่ 60 (Control) จำนวน 2 กระถาง เมื่อถั่วเหลืองโตถึงระดับ node ที่ 6 จึงเริ่มเตรียม Transform cassette เพื่อใช้ทดสอบ Ovary drip ตาม Protocol ดัดแปลงจาก Ellen B. et al. 2003 ในการทดลองนี้ได้เตรียม Transform cassette ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl กับ DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l



ภาพที่ 1 แสดงแผนผังการปลูกถั่วเหลืองในกรงกันหนู/แมลง

เมื่อถั่วเหลืองออกดอก เลือกดอกถั่วเหลืองที่บานแล้วมีอายุ 1 วัน ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆ ฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออก จากนั้นตัดเกสรตัวผู้ใส่แผ่นฟลอยด์เก็บใส่ sterile petri-dish ที่ 4oC จากนั้นเลือกตัวแทนดอกถั่วเหลืองที่จะทำการทดสอบมา 50 ดอกที่ยังไม่บาน ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออก โดยไม่ได้ฉีกฐานรองดอกออกตัดเกสรตัวผู้ออกทั้งหมดจากนั้น

ป้ายเกสรตัวผู้ด้วยพู่กันที่เกสรตัวเมีย และทำสัญลักษณ์ไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 20 ชั่วโมง เพื่อให้เกสรตัวผู้ต่อท่อเกสรถึงเกสรตัวเมีย จากนั้นจึงดำเนินการทำ Ovary drip โดยการเฉือนที่โคนของ Style เกสรตัวเมีย จึงหยอดสารละลาย Transform cassette ที่ความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl, DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l ปริมาตร 7 µl ทั้ง 50 ดอก และทำสัญลักษณ์ไว้

การทำ Ovary drip ในดอกที่ผ่านการผสมตัวเองแล้ว

เมื่อถั่วเหลืองออกดอกแล้ว เลือกดอกถั่วเหลืองที่บานแล้วมีอายุประมาณ 1 วัน (ประมาณ 20 ชั่วโมง)และยังบานไม่เต็มที่ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออกเพื่อให้เกสรตัวผู้ต่อท่อเกสรถึงเกสรตัวเมีย เด็ดเกสรตัวผู้ทิ้งและจึงดำเนินการทำ Ovary drip โดยการเฉือนที่โคนของ Style เกสรตัวเมีย แล้วหยอดสารละลาย Transform cassette ที่ความเข้มข้น DNA ประมาณ 100 ng/µl, DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l ปริมาตร 7 µl จำนวน 50 ดอก และทำสัญลักษณ์ไว้

การสกัดดีเอ็นเอการตรวจสอบ Transformant

นำใบมาต้นละ 4 ใบ เพื่อให้ได้ปริมาณ 200 – 300 mg จากนั้นจึงบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2% CTAB และดำเนินการทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลั่ม และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Resin และตรวจสอบ Transformant โดยใช้ Primer Os1_F และ Os1_R (Ta = 53°C)

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการทดลอง

<u>การศึกษาข้อมูลยีน *OsSKIPa* โดยวิธี Bioinformatic เพื่อสังเคราะห์ Transformation cassette</u>

สืบค้นข้อมูลความเหมือนของลำดับเบสของ SKIP จาก ฐานข้อมูล NCBI (gene bank) พบ SKIP/SNW Domain อยู่บนจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เลือกสายรหัส ยีน *snw1* บนจีโนมมนุษย์ บน Chromosome คู่ที่ 14; NC_000014.9 (77717599..77761201, complement) โดยนำ CDS ของยีน *snw1* SNW domain-containing protein 1 [Homo sapiens] Accession No. NP_036377 ไป Blast กับฐานข้อมูลจีโนมของข้าว The Institute for Genomic Research (http://rice.plantbiology.msu.edu/) Rice Genome Annotation Project พบ putative SKIP homologs ในข้าวชื่อว่า LOC_Os02g52250 หรือ OsSKIPa บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ตำแหน่ง 31,997,697–31,995,218 ยีนมีขนาด 1,824 bp สายรหัสยีน putative SKIP ที่พบในข้าวมีความเหมือนกับ SKIP ของ มนุษย์ 61% โดย ORF

สามารถสังเคราะห์โปรตีนความยาว 608 aa เมื่อนำสายรหัสเปปไทด์ไป Blast กับฐานข้อมูลโปรตีนPfam database พบว่า SKIP/SNW Domain อยู่ระหว่างอะมิโนแอซิด ที่ 190 และ 350 (ภาพที่ 2) โดยมีสายรหัสเปปไทด์ดังนี้

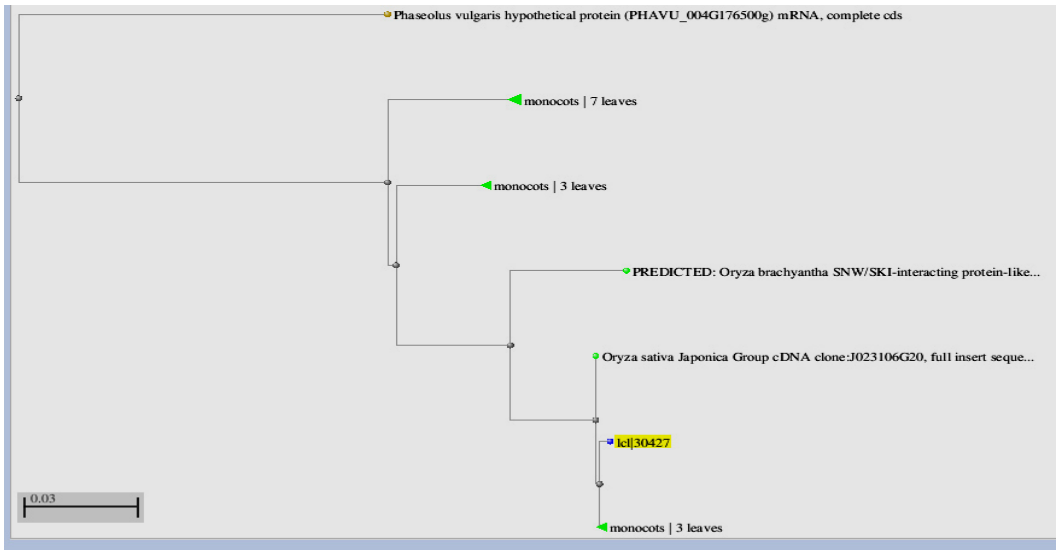
“SKFIKYKPSQQSAAFNSGAKERIIRMSEMAQDPLEPPKFKHKRVPRASGSPPVPVMHSPPRPVTVKDQQDwKIPP
CISNwKNPKGYTIPLDKRLAADGRGLQEVQINDNFAKLSEALYVAEQKAREAVQMRSKVQRELQLKEKERKEQEL
RALAQKARMERTGAPPAPTGVPAGGGRGAVDDREEDMDLEQPREQRRESREEREARIERDRIREERRRERERERRL
EARDAAMGKKSKLTRDRDRDVSEKIALGMASTGGAKGGEVMYDQRLFNQDKGMDSGFATDDQYNIYSKGLFTA
QPTLSTLYRPKKDGDSDVYGDADEQLEKVMKTDRFKPDKGFSGASERSGKR”

นำข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมจาก สุภาวดี และ คณะ 2555 (เรื่องเต็ม) ซึ่งโคลนได้จากยีนข้าวสายพันธุ์ไทย KDML 105 มา Blast กับฐานข้อมูลจีโนมของข้าว The Institute for Genomic Research (http://rice.plantbiology.msu.edu/) Rice Genome Annotation Project พบ putative SKIP homologs ในข้าวชื่อว่า LOC_Os02g52250 เช่นเดียวกับการ Blast ยีน *snw1* ของมนุษย์ โดยสายรหัสยีน putative SKIP ที่พบในข้าวมีความเหมือนกับ SKIP LOC_Os02g52250 ของ Database 99.67% โดยพบว่ามีรหัสเบสเปลี่ยนแปลงไป 6 เบส เมื่อนำมาจำลองการ Translation พบว่ามีอะมิโนแอซิดเปลี่ยนไป 3 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 23, 120 และ 564 โดยเปลี่ยนจาก Serine (S) เป็น Glycine (G), Glycine (G) เป็น Serine (S) และ Lysine (K) เป็น Glutamic acid (E) อย่างไรก็ตาม ตำแหน่งที่กรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงไม่ใช่ส่วนที่เป็น SKIP/SNW Domain จึงไม่น่ามีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน

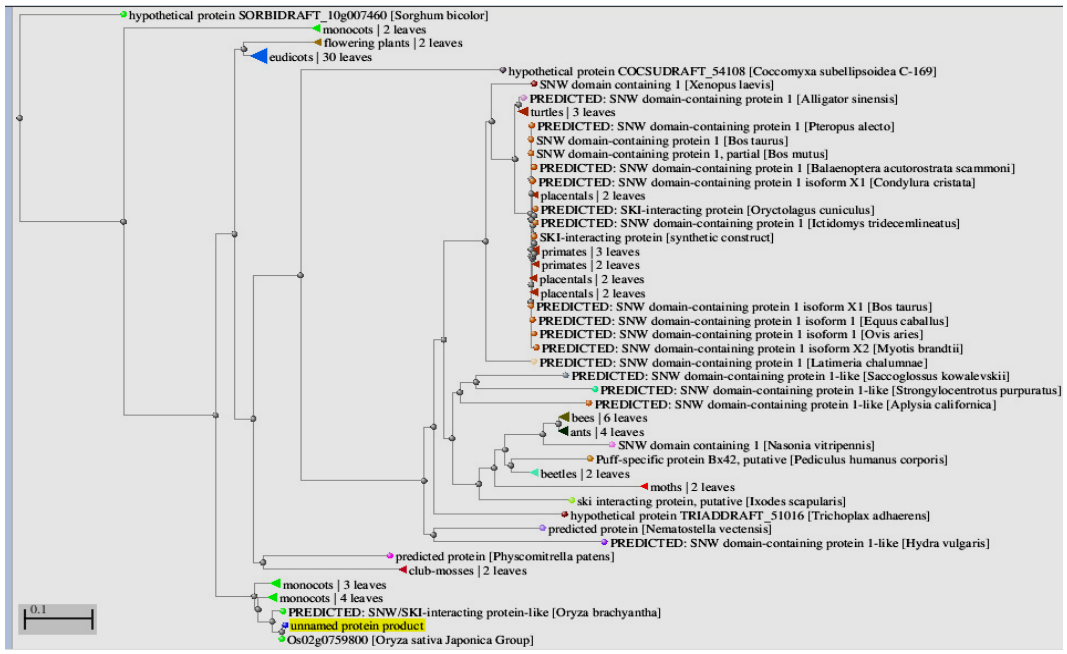
ภาพที่ 2 แสดงตำแหน่ง SKIP/SNW Domain

เพื่อวิเคราะห์การวิวัฒนาการระดับ Genome และ Proteome นำข้อมูลสายรหัสพันธุกรรมจาก สุภาวดี และ คณะ 2555 (เรื่องเต็ม) ไป Blast กับ NCBI Database Nucleotide จำลองการ Translation และนำสายรหัสกรดอะมิโนไป Blast อีกครั้งกับ Blastp พบว่า ในระดับจีโนมหรือยีนมีการกระจายตัวของรหัสพันธุกรรมค่อนข้างน้อยและจำเพาะเจาะจงอยู่เฉพาะในพืชจำพวกข้าวและ ข้าวโพด เท่านั้น (ภาพที่ 3) ในขณะที่การกระจายตัวในระดับ Proteome พบการกระจายตัวในสิ่งมีชีวิตหลากหลายกว่าและมีการใช้ SKIP/SNW Domain ร่วมกันมากกว่า (ภาพที่ 3) จึงสรุปได้ว่า SKIP/SNW Domain มีการวิวัฒนาการร่วมกันในระดับโปรตีโอมิคมากกว่าจีโนมิค

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโปรตีน SKIP มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Eukaryote) หลายชนิดและ SKIP/SNW protein Domain ได้รับการอนุรักษ์ไว้ในวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Eukaryote) ด้วยเช่นกัน



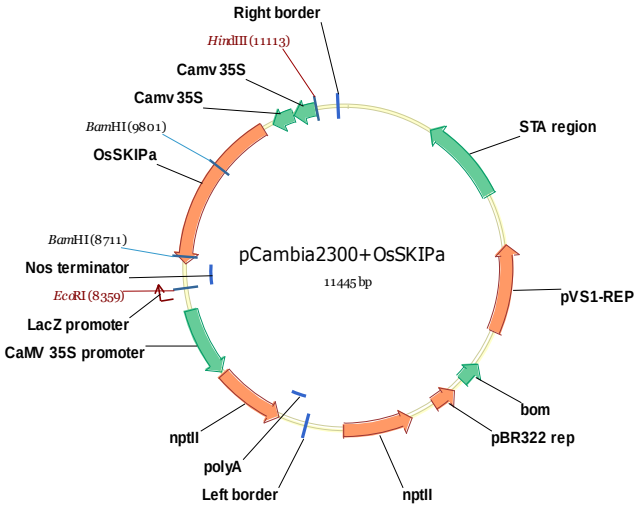
ภาพที่ 3 แสดงการนำข้อมูลรหัสพันธุกรรมมา Blast Nucleotide database



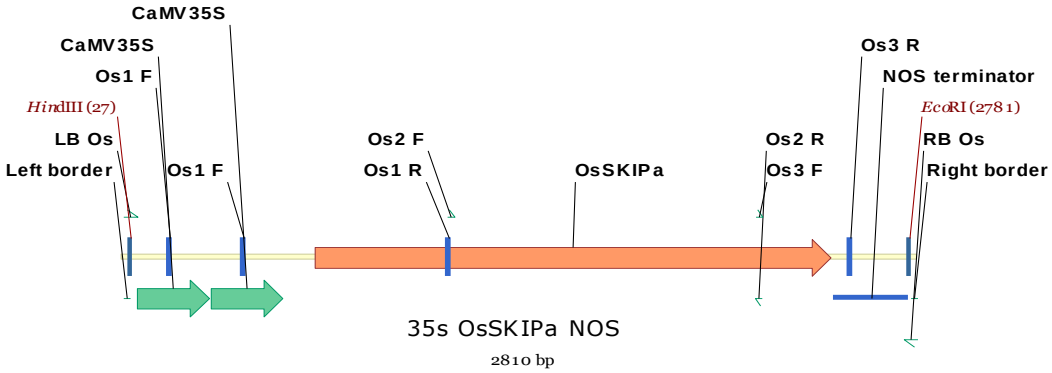
ภาพที่ 4 แสดงการนำข้อมูลรหัสเปปไทด์มา Blast protein database

<u>การออกแบบ Transformation cassette</u>

ดำเนินการออกแบบ Transformation cassette โดยออกแบบจากข้อมูล ยีน Insert ภายใน vector pCAMBIA2300 – OsSKIPa (สุภาวดี และ คณะ, 2555) (ภาพที่ 5) โดยเติม Left border ที่ 5’UTR Camv35S และ Right order ที่ 3’UTR Nos terminator (ภาพที่ 5) เพื่อให้สาย Transform cassette มีความเสถียร



ภาพที่ 5 แสดง pCambia2300+OsSKIPa



ภาพที่ 6 แสดงแผนภาพ Transform cassette และตำแหน่ง primer ที่ออกแบบบน Transform cassette

ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้โคลน Transform cassette และใช้ตรวจสอบ Transformation cassette โดย Forward ไพรเมอร์ LB_Os และ RB_Os ออกแบบให้มี Left border และ Right border โดยมี Binding site อยู่ในบริเวณ 5’UTR Camv35S ใช้โคลนและตรวจสอบตำแหน่งของ Transform cassette บนจีโนมของถั่วเหลืองในกรณีที่มีการ transform cassette เข้าสู่ ถั่วเหลือง ในส่วนของ Os(1-3)_F และ Os(1-3)_R

มี Binding site อยู่ในบริเวณ โพรโมเตอร์ Camv35S ยีน OsSKIPa และ Nos terminator ใช้ตรวจสอบตำแหน่งของโพรโมเตอร์ Camv35S ยีน OsSKIPa และ Nos terminator (ตารางที่ 1, ภาพที่ 6)

ตารางที่ 1 ตารางแสดงไพรเมอร์ใช้ในการโคลนและตรวจสอบ Transformation cassette และยีน OsSKIPa

หมายเหตุ	Name	Sequence(5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
ใช้โคลนตั้งแต่ส่วนหัวของ Tranform cassette ของ OsSKIPa	LB_Os	TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCGAT Binding site: AAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCGA	67.2	50
ใช้โคลนตั้งแต่ส่วนปลายของ Tranform cassette ของ OsSKIPa	RB_Os	GTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAGAATTCCCGATCTAGTAACATAGAT Binding site: GAATTCCCGATCTAGTAACATAGAT	49.3	50
ใช้แอมส่วนต้นของ Tranform cassette ของ OsSKIPa	Os1_F	CATTGCGATAAAGGAAAGGC	51.8	20
ใช้แอมส่วนต้นของ Tranform cassette ของ OsSKIPa	Os1_R	GCTTTAGTTCGTTCAGTGGT	46.2	20
ใช้แอมส่วนกลางของ Tranform cassette ของ OsSKIPa	Os2_F	GAAGAAACCACTGAACGAACTAAAG	52.7	25
ใช้แอมส่วนกลางของ Tranform cassette ของ OsSKIPa	Os2_R	TTTGTCTGGTTTGAACCTATCTGTC	53.4	25
ใช้แอมส่วนปลายของ Tranform cassette ของ OsSKIPa	Os3_F	CAGATAGGTTCAAACCAGACAAAGG	55.2	25
ใช้แอมส่วนปลายของ Tranform cassette ของ OsSKIPa	Os3_R	GATAATCATCGCAAGACCGG	52.1	20

<u>การโคลน Cassette และการตรวจสอบความถูกต้องของ Vector และ Cassette</u>

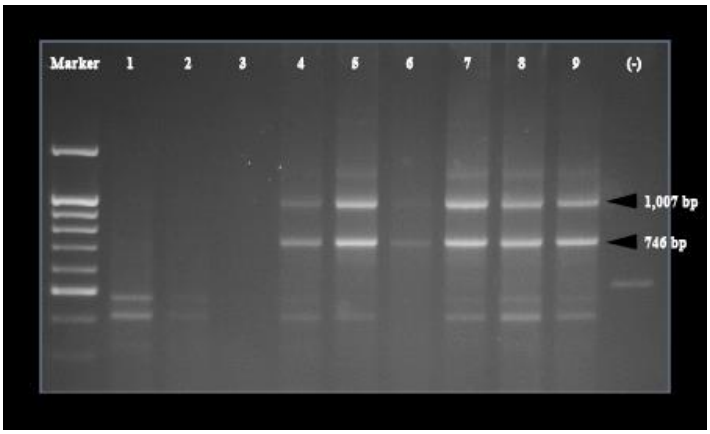
นำเวคเตอร์ pCAMBIA2300 ซึ่งมี Cassette OsSKIPa ที่อยู่ภายใน Transform เข้าสู่ E-coli สายพันธุ์ DH5α (ดูวิธีการทดลอง, ดัดแปลงจาก Chung, C. T. *et al.* 1989)

<u>การตรวจสอบ Transformants</u>

Spread เชื้อที่ได้รับการถ่าย Vector ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ความเข้มข้น 50 µg/ml และ Spread เชื้อที่ไม่ได้รับการถ่าย Vector (negative control) ลงบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าไม่มีเชื้อที่ไม่ได้รับการถ่าย Vector (negative control) โตบน Plate เลย และมี Colony ของเชื้อโตบน Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin ประมาณ 2,140 colonies สามารถคำนวน Transformant efficiency ได้ตามสูตร colonies on plate/ng of DNA plated X 1000 ng/µg โดยใช้จำนวน colony บน Plate ที่ Spread เชื้อปริมาตร 200 µl คำนวนพบ Transformant efficiency มีค่าเท่ากับ 8.56×10^3 Transformants/µg DNA

ดำเนินการตรวจสอบ Transformant โดย Duplicate single colony จำนวน 9 colonies ลง Plate อาหาร LB Agar ผสม Kanamycin และ ตรวจสอบ Vector ที่ได้รับการถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียโดยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ Primer Os1_F และ Os1_R (Ta = 53°C, ดูวิธีการ, ภาพที่ 6) โดยได้ PCR product มีขนาด 1007 bp และ 746 bp เพื่อใช้ตรวจสอบทิศของโพรโมเตอร์และยีน

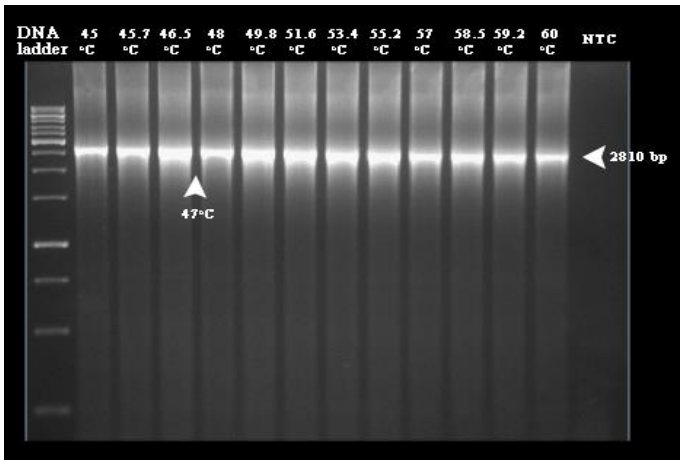
เมื่อดำเนินการตรวจ Colony ทั้ง 9 colonies พบว่าปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นได้ดีใน Colony ที่ 4, 5, 7, 8 และ 9 และได้ PCR Product ที่ 1007 bp และ 746 bp ตามที่คาดการ (ภาพที่ 7) ทั้งนี้ได้เลือก E-coli clone ที่ 5,7,8 และ 9 ไปทำ Stock และเก็บไว้ที่ -80°C และนำ Clone ที่ 5 มาใช้เพื่อ Clone Vector และสกัด Plasmid ต่อไป



ภาพที่ 7 แสดงผลการทำ Colony PCR ใน Transformant 1 – 9

<u>การเพิ่มปริมาณ Transform cassette</u>

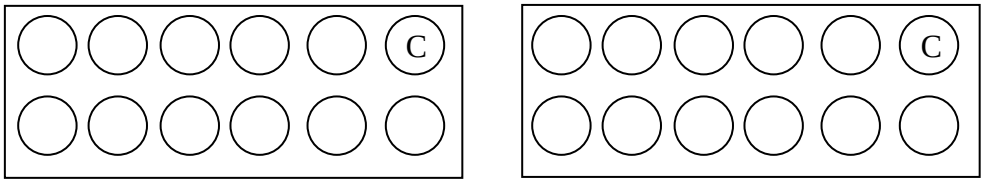
นำเวคเตอร์จาก Clone ที่ 5 มาใช้ในการเพิ่มปริมาณ **Transform cassette** ทดสอบ Gradient PCR เพื่อหา Optimal temperature ที่จะใช้เพื่อให้ได้ปริมาณ DNA และความบริสุทธิ์ที่ดีที่สุด พบว่าอุณหภูมิ 47°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เป็นอุณหภูมิที่ไม่สูงเกินไปและให้ลักษณะของ DNA band ที่เป็น band เดี่ยวและมีสเมียร์ต่ำ (ภาพที่ 8) จากนั้นดำเนินการทำ Conventional PCR ด้วย primer LB_Os และ RB_Os ที่ Ta=47°C Volume total 50 µl ได้ Transform cassette ที่ขนาด 2,810 bp และทำให้บริสุทธิ์ (QIAquick PCR purification Kit) และวัดความเข้มข้น ได้ความเข้มข้นของ Transform cassette ระหว่าง 100 – 200 ng/µl



ภาพที่ 8 แสดงการทดสอบ Gradient PCR เพื่อหา Optimal temperature ของ primer LB_Os และ RB_Os ในการเพิ่มปริมาณ Transform cassette

<u>การทดสอบ Artificial pollination และการทำ Ovary drip</u>

ดำเนินการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ S17-3 ในกระถาง จำนวน 22 กระถาง และ เชียงใหม่ 60 (Control) จำนวน 2 กระถาง (ภาพที่ 9) เมื่อถั่วเหลืองโตถึงระดับ node ที่ 6 จึงเริ่มเตรียม Transform cassette เพื่อใช้ทดสอบ Ovary drip ตาม Protocol ดัดแปลงจาก Ellen B. et al. 2003 ในการทดลองนี้ได้เตรียม Transform cassette ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl กับ DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l



ภาพที่ 9 แสดงแผนผังการปลูกถั่วเหลืองในกรงกันหนู/แมลง

เมื่อถั่วเหลืองออกดอกแล้ว เลือกดอกถั่วเหลืองที่บานแล้วมีอายุ 1 วัน ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออก จากนั้นตัดเกสรตัวผู้ใส่แผ่นฟลอยด์เก็บใส่ sterile petri-dish ที่ 4°C จากนั้นเลือกตัวแทนดอกถั่วเหลืองที่จะทำการทดสอบมา 50 ดอกที่ยังไม่บาน ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออก โดยไม่ได้ฉีกฐานรองดอกออกตัดเกสรตัวผู้ออกทั้งหมด (ภาพที่ 10) จากนั้นป้ายเกสรตัวผู้ด้วยพู่กันที่เกสรตัวเมีย และทำสัญลักษณ์ไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 20 ชั่วโมง เพื่อให้เกสรตัวผู้ต่อท่อเกสรถึงเกสรตัวเมีย จากนั้นจึงดำเนินการทำ Ovary drip โดยการเฉือนที่โคนของ Style เกสรตัวเมีย จึงหยอดสารละลาย Transform cassette ที่ความเข้มข้นประมาณ 100 ng/µl, DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l ปริมาตร 7 µl ทั้ง 50 ดอก และทำสัญลักษณ์ไว้ พบว่าหลังจาก 4 วัน ดอกที่ดำเนินการทำ Ovary drip จากการทำ Artificial pollination ไม่ติดและร่วงทั้งหมด

ภาพที่ 10 แสดงภาพของดอกถั่วเหลืองที่ได้รับการดึงกลีบดอกออกทั้งหมดเหลือแต่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย

<u>การทำ Ovary drip ในดอกที่ผ่านการผสมตัวเองแล้ว</u>

เมื่อถั่วเหลืองออกดอกแล้ว เลือกดอกถั่วเหลืองที่บานแล้วมีอายุประมาณ 1 วัน (ประมาณ 20 ชั่วโมง) และยังบานไม่เต็มที่ใช้ Forcep ขนาดหัว 0.15 mm ค่อยๆฉีกกลีบดอกชั้นนอกและกลีบดอกชั้นในออกเพื่อให้เกสรตัวผู้ต่อท่อเกสรถึงเกสรตัวเมีย เด็ดเกสรตัวผู้ทิ้งและจึงดำเนินการทำ Ovary drip โดยการเฉือนที่โคนของ Style เกสรตัวเมีย แล้วหยอดสารละลาย Transform cassette ที่ความเข้มข้น DNA ประมาณ 100 ng/µl, DMSO 0.25%, NAA 4mg/l และ GA 4 mg/l ปริมาตร 7 µl ทั้ง 50 ดอก และทำสัญลักษณ์ไว้ พบว่ามีดอกติดและไม่ร่วง ทั้งสิ้น 33 ดอก และสามารถพัฒนาไปเป็นฝัก ได้ 17 ฝัก (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม ด้วยสภาพการปลูกในกระถางอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ฝักพัฒนาได้ไม่เต็มที่และต้นแห้งตาย เมล็ดที่ได้มีลักษณะแคระแกรนไม่สามารถปลูกขึ้นเพื่อใช้เป็นรุ่น F1 ได้และมีเมล็ดเพียง 34 ที่น่าจะสามารถนำไปปลูกต่อเพื่อทดสอบในขั้นต่อไปได้ จึงต้องดำเนินการปลูกใหม่และทำซ้ำ

ตารางที่ 2 แสดงผลการทำ Ovary drip เปรียบวิธีการ 2 วิธี Ovary drip with Artificial pollination และ Ovary drip with self-pollinated

Transformation method	Number of flower with successful drip	Number of pod	Number of Maturing seed
Ovary drip with Artificial pollination	0	0	Not available
Ovary drip with self-pollinated	33	17	34

<u>การสกัดดีเอ็นเอ</u>

ดำเนินการปลูกเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 34 เมล็ดเพื่อตรวจสอบ Transformant ในบ่อซีเมนต์ใหญ่ที่ได้จากการทำ Ovardrip (ภาพที่ 11) เมื่อต้นกล้าถั่วเหลืองโตได้ที่จึงเด็ดใบมาต้นละ 4 ใบ เพื่อให้ได้ปริมาณ 200 – 300 mg จากนั้นจึงบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี 2% CTAB และดำเนินการทำ DNA ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลั่ม และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Resin พบว่าได้ปริมาณ Genomic DNA 200 – 1,000 ng/ul (ภาพที่ 12)

ภาพที่ 11 การปลูกถั่วเหลืองในบ่อซีเมนต์แทนการปลูกในกระถางช่วยให้ถั่วเหลือง เจริญเติบโตได้ดีและต้นไม่แคระแกรน

ภาพที่ 12 แสดงผลการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของถั่วเหลือง

<u>การตรวจสอบ Insert Cassette</u>

ดำเนินการตรวจสอบ Transformant โดยใช้ Primer Os1_F และ Os1_R (Ta = 53°C, ดูวิธีการ, ภาพที่ 5)

อย่างไรก็ตามปรากฏว่าผล PCR เป็น Negative ทั้งหมด คือไม่มี Insert อยู่ภายในจึงต้องดำเนินการปลูกต้นถั่วเหลืองเพิ่มและดำเนินการทดลองซ้ำโดยหยอด DNA ลงในดอกทั้งสิ้น 60 ดอก และเว้นช่วงเวลาที่คาดว่าท่อเกสรตัวผู้สามารถต่อลงถึงรังไข่โดยกะระยะเวลาให้ได้ใกล้เคียงมากที่สุด เป็น 20 ชั่วโมง 25 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง แบ่งเป็นชุดชุดละ 20 ดอก หลังจากหยอดดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดอกประมาณ 90% อนึ่งหลังจากดอกติดเมล็ดพบว่าสามารถเจริญไปเป็นฟักได้ทั้งหมด ประมาณ 51% และได้เมล็ดทั้งหมด 78 เมล็ด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลการทำ Ovary drip จาก self-pollinated

Transformation method	Number of flower with successful drip	Number of pod	Number of Maturing seed
Ovary drip with self-pollinated at 20 h after pollination	14	8	23
Ovary drip with self-pollinated at 25 h after pollination	20	11	30
Ovary drip with self-pollinated at 30 h after pollination	20	10	25

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

นำเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้ไปปลูกและเก็บใบออ่อนไปสกัดดีเอ็นเมื่อนำไปตรวจด้วยวิธีการ PCR พบว่าไม่พบ Insert gene อยู่ภายในถั่วเหลืองรุ่นลูกที่ได้ และจากการทดลองดำเนินการเช่นเดิม ยังคงตรวจไม่พบ Insert ในรุ่นลูกถั่วเหลือง

สาเหตุความเป็นไปได้จากผลการทดลองอาจเกิดจากหลายประการคือสภาพแวดล้อมในการปลูกภายในโรงเรือนมีอากาศร้อน อบ และแสงไม่เพียงพอ ซึ่งอาจทำให้สภาพของต้นถั่วไม่สมบูรณ์แข็งแรงและดอกถั่วเหลืองมีลักษณะผิดปกติ ทำให้ DNA ที่ dip ไม่สามารถ Insert เข้าไปในจีโนมได้ หากสามารถปลูกถั่วเหลืองได้ในปริมาณมากในสภาวะอากาศที่อุณหภูมิที่เหมาะสมอาจทำให้การ Ovary dip ประสบผลสำเร็จมากกว่านี้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นักวิชาการ/นักวิชาการเกษตรที่สนใจสามารถนำข้อมูลยีน OsSKIPa ไปใช้ได้และสามารถนำ Transform cassette ที่ออกแบบไว้แล้วรวมถึงข้อมูลวิธีการดำเนินการ Ovary dip ทำไปใช้ในงานวิจัยต่อไปได้

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่สนับสนุนทุนในการวิจัยและกลุ่มวิจัยพัฒนาการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรมที่ให้การสนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทดลองและปฏิบัติงาน

12.เอกสารอ้างอิง

Albers M., Diment A., Muraru M, Russell C.S., Beggs J.D. 2003. Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. RNA 9:138–150.

E. J. Clake and J. Wiseman, 2000. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans I. Protein and amino acid content.

M. Friedman and D.L. Brandon, 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins. J. Agric. Food Chem. 2001;49(3):1069-1086.

Dahl R., Wani B., Hayman M. J. 1998. The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of Drosophila Bx42. Oncogene 16:1579–1586.

Figueroa J.D., Hayman M.J. 2004. Differential effects of the Ski-interacting protein (SKIP) on differentiation induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-2 in C2C12 cells. Exp Cell Res 296:163–172.

Folk P., Puta F., Skruzny M. 2004. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: The concealed tie of dissimilar pathways. Cell Mol Life Sci 61:629–640.

Ivanov A.I., Rovescalli A.C., Pozzi P., Siuk Y. , Mozer B., Li H.P. , Yu S.H. ,Higashida H., Guo V., Spencer M., and Nirenberg M. 2004. Genes required for Drosophila nervous system development identified by RNA interference. Proc Natl Acad Sci USA 101:16216–16221.

Kostrouchova M., Housa D., Kostrouch Z., Saudek V., Rall J.E. 2002. SKIP is an indispensable factor for Caenorhabditis elegans development. Proc Natl Acad Sci USA 99:9254–9259.

Lee B.H., Kapoor A., Zhu J., Zhu J.K. 2006. STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in Arabidopsis. Plant Cell 18:1736–1749.

Leong G.M., Subramaniam N., Issa L.L., Barry J.B., Kino T., Driggers P.H., Hayman M.J., Eisman J.A., Gardiner E.M. 2004. Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300. Biochem Biophys Res Commun 315:1070–1076.

Negeri D., Eggert H., Gienapp R., SaumweberH. 2002. Inducible RNA interference uncovers the Drosophila protein Bx42 as an essential nuclear cofactor involved in Notch signal transduction. Mech Dev 117:151–162.

Saumweber H., Frasch M., Korge G. 1990. Two puff-specific proteins bind within the 2.5 kb upstream region of the Drosophila melanogaster Sgs-4 gene. Chromosoma 99:52–60.

Wieland C., Mann S., V. Besser H., Saumweber H. 1992. The Drosophila nuclear protein Bx42 , which is found in many puffs on polytene chromosomes, is highly charged. Chromosoma 101:517–525.

Xin H., Kabin X., Jialing Y., Zhuyun Q., and Lizhong X. 2009. A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. PNAS:6410–6415.

Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Transcriptional regulatorynetworksin cellular responsesandtolerance to dehydrationandcold stresses.AnnuRev Plant Biol 57:781–803.

Zhu J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol 53:247–273.