แผนงานวิจัย การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

โครงการวิจัย การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

การโคลน ถ่ายฝากและศึกษายีน *GmPR1* เพื่อความต้านทานโรคในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* สำหรับเตรียมการถ่ายฝากสู่ถั่วเหลือง

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

จีราพร แก่นทรัพย์ ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนและถ่ายฝากยีนต้านทานโรค *GmPR1* ในพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* ทดสอบประสิทธิภาพก่อนการถ่ายฝากสู่ถั่วเหลือง โดยส่วน promoter หรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ควบคุมการแสดงออกของยีนจะใช้ promoter ของยีน *Glyma04g05080* ที่มีรายงานว่ามีการแสดงออกสูงในส่วนใบ ดอก และราก แต่มีการแสดงออกต่ำในเมล็ดและไม่แสดงออกในเมล็ดระยะใกล้เก็บเกี่ยว การถ่ายฝากชุดยีน *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) และมีลำดับดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล 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.

คำนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เป็นแหล่งอาหารสำคัญทั้งโปรตีนและไขมัน รวมถึงมีสารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น สารละลายคอเลสเตอรอล lecithin และสารช่วยเพิ่มมวลกระดูกและรักษาผิว isoflavone นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังมีประโยชน์ทางด้านการเกษตรเป็นพืชหมุนเวียนอีกด้วย ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองประมาณ 212,000 ไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 55,979 ตันต่อปี การผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทยไม่พอเพียงกับความต้องการใช้ภายในประเทศ ทำให้ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ในปี 2560 ความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองมีปริมาณ 2.7 ล้านตัน ซึ่งมีสัดส่วนการใช้

ผลผลิตภายในประเทศร้อยละ 2.05 และนำเข้าร้อยละ 97.95 ของปริมาณความต้องการใช้ทั้งหมด (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ดังนั้นการวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตถั่วเหลืองให้ผลิตได้มากขึ้นและมีคุณภาพสูงขึ้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตวิธีการหนึ่ง ได้แก่ การพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีความต้านทานโรคสูงขึ้น เนื่องจากการติดโรคของถั่วเหลืองจะส่งผลให้ผลผลิตลดลง โรคที่เป็นปัญหาสำคัญ ได้แก่ โรคราสนิม โรคราน้ำค้าง โรคใบจุดนูน และโรคแอนแทรคโนส เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

การพัฒนาพันธุ์พืชให้มีความต้านทานโรคสูงหรือมีลักษณะทางการเกษตรที่ดีด้วยการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีมาตรฐาน (conventional breeding) ใช้ระยะเวลา พื้นที่ แรงงาน 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* ในยาสูบเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงส่งผลให้ยาสูบมีความต้านทานต่อเชื้อรา Oomycete เพิ่มขึ้น (Alexander *et al*., 1993) นอกจากนี้การถ่ายฝากยีน *PR5* หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *Osmotin* ในมันฝรั่งเพื่อให้มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงส่งผลให้มันฝรั่งมีความต้านทานต่อเชื้อโรคเพิ่มขึ้น (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

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5
2. ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GmPR1*
3. ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ promoter ของยีน *Glyma04g05080*
4. เอนไซม์ตัดจำเพาะ
5. เอนไซม์เชื่อมต่อ
6. ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (cloning vector)
7. ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้สำหรับการถ่ายฝากยีนในพืช (plant vector)
8. *E.coli* สายพันธุ์ DH5α
9. สารเคมีที่ใช้ทำอาหารเลี้ยงเชื้อ
10. ยาปฏิชีวนะสำหรับการคัดเลือกโคโลนี
11. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
12. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
13. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis)
14. เครื่องให้กำเนิดแสง UV สำหรับตรวจสารพันธุกรรม (UV transilluminator, Biorad) และชุดถ่ายภาพ
15. ดินและปุ๋ยที่ใช้ในการปลูกพืช

วิธีการ

1. การโคลนยีน *GmPR1*

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

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

- เก็บใบถั่วเหลืองมาใส่ในโกร่งจากนั้นเติม 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 ไมโครลิตรเหมาะกับการบดตัวอย่างใบถั่วเหลืองที่มีน้ำหนักประมาณ 0.25 กรัม
- ดูดสารที่ได้จากการบดตัวอย่าง 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml microtube
- แช่ใน water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยผสมเบาๆ ทุก 10 นาที
- วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 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 เพื่อละลายดีเอ็นเอ
- นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer
- คำนวณปรับความเข้มข้นให้เป็น 50 ng/μl ก่อนทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่เตรียมไว้

1.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *GmPR1* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GmPR1* ได้แก่ SmaIPR1 Fw (5'-CCGAcccgggATGGGGTACATGTGCATTAAGATTTCGTTT-3') และ SacIPR1Rvpri (5'-TGCCgagctcCTACAGTTTGTAGGGTCTTTCACCAAC-3') ใช้เอนไซม์ Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

<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 DH5α 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'-atatCCCGGGaagcttCCAAGGCACATAGACACAGACACCCTC-3') และ SaXbAP2pRvpri (5'-ggccGAGCTCtctagaCTTCAATGCAACCAAGTTCACAATGTAATG-3') ใช้เอนไซม์ Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

<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 DH5α 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

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

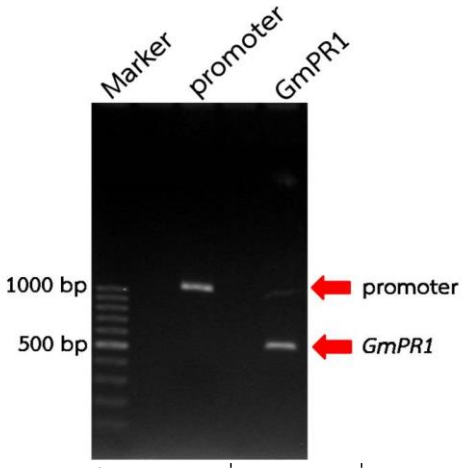
ผลการทดลองและวิจารณ์

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

ทำการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 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)

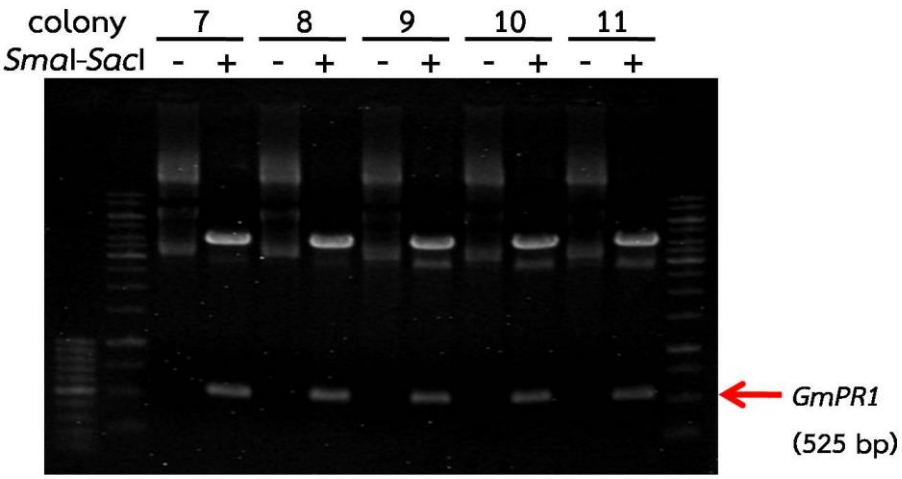
ภาพที่ 1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) และชิ้นส่วนยีน *GmPR1*



ตัดต่อชิ้นส่วนยีน *GmPR1* เข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (cloning vector) ได้แก่ pBS 35S MCS GFP (ที่ได้ตัดชิ้นส่วนของยีน *GFP* ออก) ได้เป็น pBS 35S MCS GmPR1 ถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α เมื่อตรวจสอบด้วยการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GmPR1* พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตามกำหนด (525 bp) จึงสกัดพลาสมิดของดีเอ็นเอสายผสมของแต่ละโคโลนี

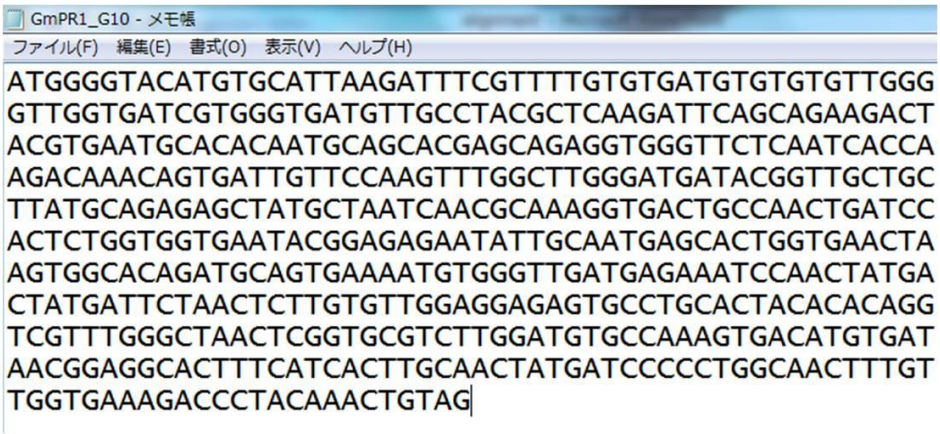
ไว้ จากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Sma*I-*Sac*I เพื่อทดสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการโคลนดังภาพที่ 2 ก่อนการนำไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ (sequencing)

ภาพที่ 2 การตรวจสอบความถูกต้องของโคโลนี pBS 35S MCS GmPR1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Sma*I-*Sac*I

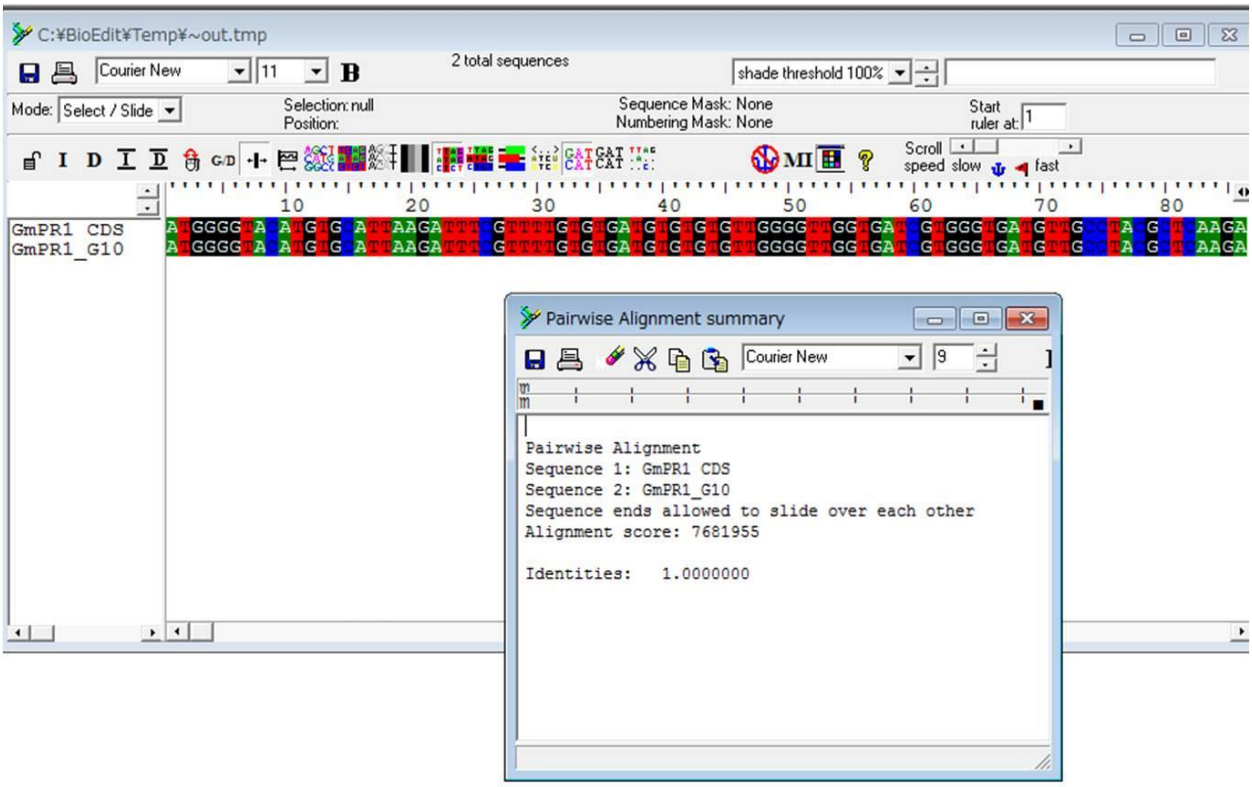


การตรวจสอบวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *GmPR1* ภายใน cloning vector และเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล SoyBase และ NCBI รวมถึงการ pairwise alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit พบว่า ชิ้นส่วนที่ทำการโคลนมีลำดับดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล (ภาพที่ 3) มีความเหมือน (Identities)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

ภาพที่ 3 ลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *GmPR1* ที่ตรวจวิเคราะห์จากโคโลนีที่ 10



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



2. การโคลนชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080*

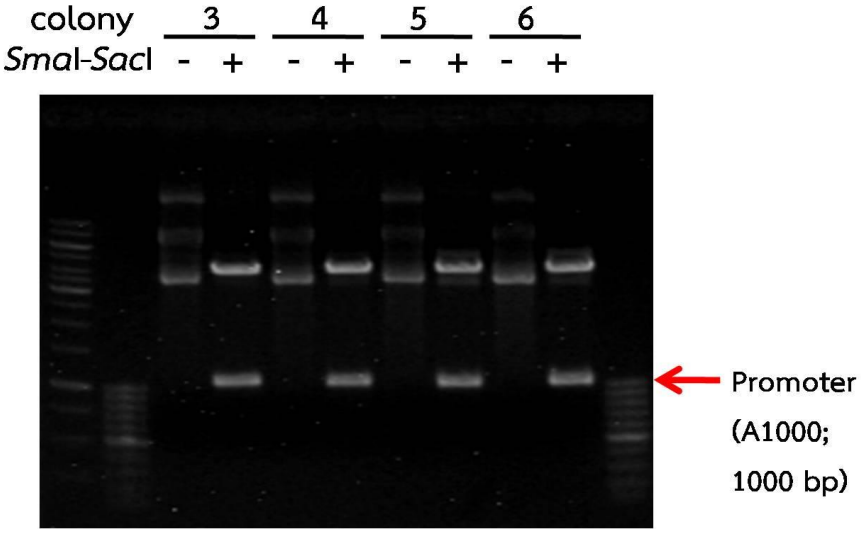
จากการศึกษาข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080* จากฐานข้อมูล SoyBase และ SURE พบว่า promoter ของยีน *Glyma04g05080* มีความยาวมากสุดที่ 1,767 bp อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าชิ้นส่วน promoter โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 100 - 1,000 bp นับจากจุดเริ่มต้นของยีนที่ควบคุม (https://en.wikiversity.org/wiki/Gene_transcriptions/Distal_promoters) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการโคลนชิ้นส่วน promoter ขนาด 1,000 bp ใช้รหัสว่า A1000 เมื่อนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อวางแผนการตัดต่อชุดยีน พบว่า 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 จึงสามารถใช้ดีเอ็นเอที่สกัดเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (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 ถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α เมื่อตรวจสอบด้วยการทำโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นส่วน promoter (A1000) พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตามกำหนด (1,000 bp) จึงสกัดพลาสมิดของดีเอ็นเอ

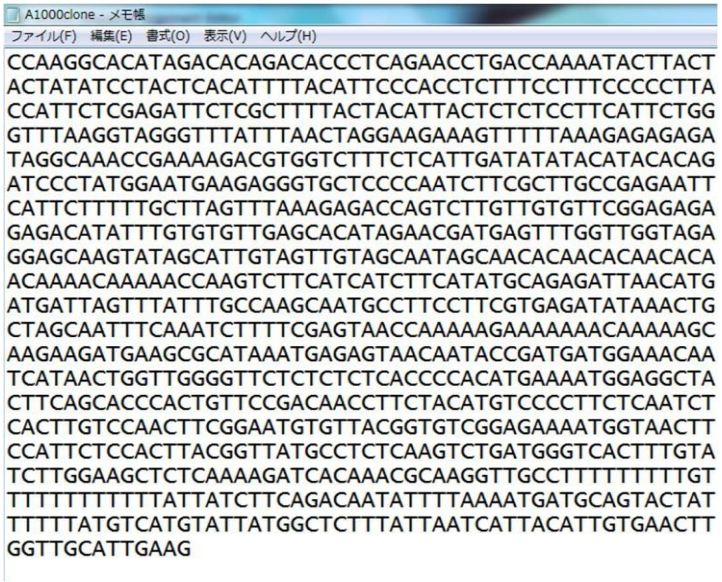
สายผสมของแต่ละโคโลนีไว้ จากนั้นทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Sma*I-*Sac*I เพื่อทดสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำการโคลนดังภาพที่ 5 ก่อนการนำไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอ (sequencing)

ภาพที่ 5 การตรวจสอบความถูกต้องของโคโลนี pBS 35S MCS A1000 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Sma*I-*Sac*I

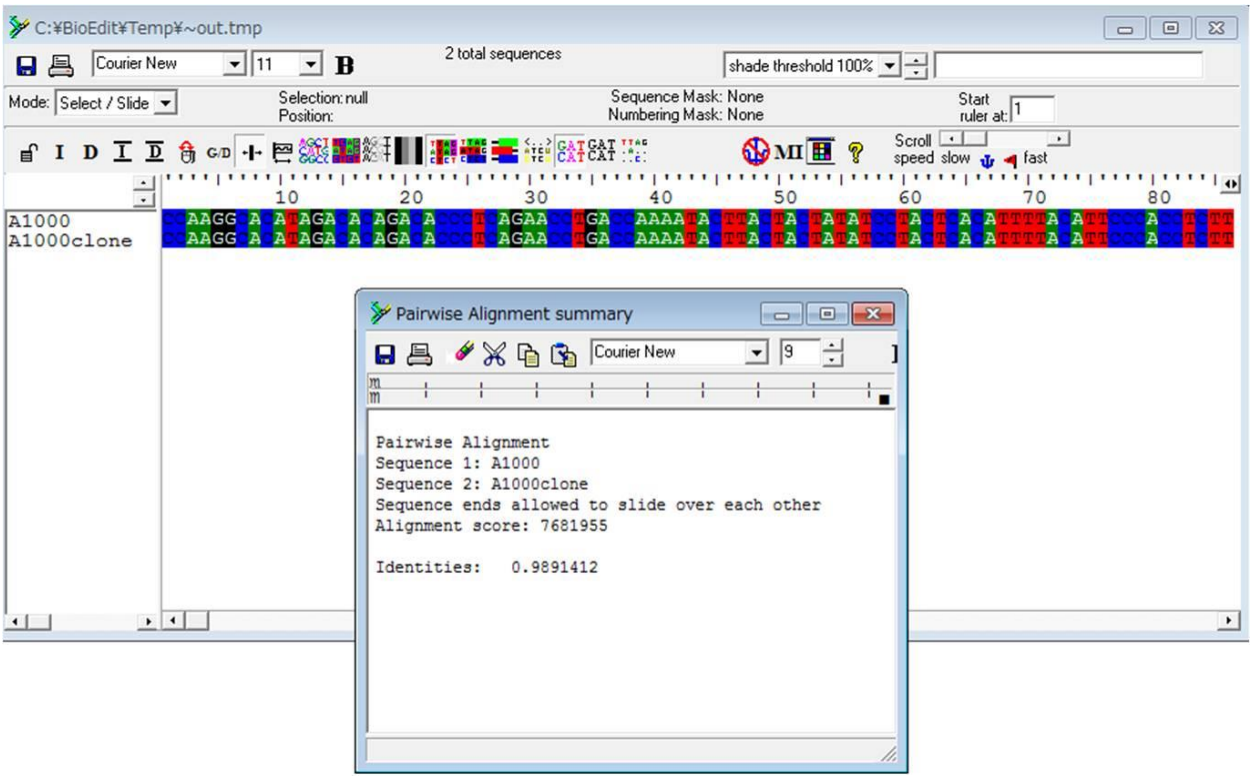


การตรวจสอบวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) ภายใน cloning vector และเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล SoyBase และ SURE รวมถึงการ pairwise alignment โดยใช้โปรแกรม BioEdit พบว่า ชิ้นส่วนที่ทำการโคลนมีลำดับดีเอ็นเอถูกต้องตรงตามฐานข้อมูล (ภาพที่ 6) มีความเหมือน (Identities)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

ภาพที่ 6 ลำดับดีเอ็นเอของชิ้นส่วน promoter (A1000) ที่ตรวจวิเคราะห์จากโคโลนีที่ 5 (A1000clone)



ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของ promoter (A1000) จากโคโลนีที่ 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 DH5α พบว่ามีโคโลนีเกิดขึ้น แต่ใช้ระยะเวลานานกว่าจะปรากฏให้เห็น นำโคโลนีที่ปรากฏมาเพิ่มปริมาณโดยเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน พบว่า *E.coli* สายพันธุ์ DH5α เจริญเติบโตได้ช้ามาก เมื่อทำการสกัดพลาสมิดออกมาและนำไปทดสอบโดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ของยีน *GmPR1* พบว่า มีแถบดีเอ็นเอปรากฏแต่แถบดีเอ็นเอจางคาดว่าการถ่ายฝากชุดยีน pBI121 35S MCS GmPR1 อาจส่งผลทำให้ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α เจริญเติบโตได้ไม่

ดีเนื่องจากในชุดยีนดังกล่าวมียีน *GmPR1* ที่ทำงานในระบบต้านทานโรคของพืชรวมอยู่ด้วยซึ่งอาจเป็นพิษต่อ *E.coli* (Singha *et al*., 2014)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

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 DH5α เจริญเติบโตได้ไม่ดี ดังรายละเอียดในผลการทดลองและวิจารณ์ข้างต้น ดังนั้นถ้ามีการดำเนินการทดลองต่อในอนาคต คณะผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่าการปรับเปลี่ยนลำดับการตัดต่อยีน โดยทำการต่อชิ้นส่วน promoter (A1000) เข้าสู่ plant vector แทนที่ 35S promoter ก่อน จากนั้นทำการต่อชิ้นส่วนยีน *GmPR1* เข้าไป อาจเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหา *E.coli* สายพันธุ์ DH5α เจริญเติบโตได้ไม่ดีอันมีสาเหตุมาจากการผลิตยีน *GmPR1* ที่มากเกินไป

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ยีน *GmPR1* ที่โคลนจากถั่วเหลืองสายพันธุ์ไทย ซึ่งเป็นยีนที่มีคุณสมบัติในการต้านทานการรุกรานจากเชื้อโรค สำหรับใช้สร้างชุดยีนถ่ายฝากสู่ถั่วเหลืองเพื่อผลิตถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทานโรคสูง หรือสามารถใช้กับพืชชนิดอื่นๆ อีกด้วย
2. ได้ชิ้นส่วน promoter ของยีน *Glyma04g05080* ซึ่งมีคุณสมบัติในการควบคุมการแสดงออกของยีนให้แสดงออกมากเฉพาะส่วนใบ ดอกและราก ซึ่งสามารถนำไปต่อยอดโดยใช้กับยีนชนิดอื่นหรือพืชชนิดอื่นได้

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ดร.อลงกรณ์ กรณ์ทอง (รองอธิบดีกรมการข้าว อดีตดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ) ดร.สมศักดิ์ ศรีสมบุญ (อดีตผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ สวพ.1) ดร.กษิดิศ ดิษฐบรรจง (ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) และ ผอ.ชยานิจ

ดิษฐบรรจง (ผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ) ที่กรุณาให้คำปรึกษางานวิจัยถั่วเหลืองด้านต่างๆ ขอขอบพระคุณข้าราชการ พนักงานราชการ และพนักงานอัตราจ้างของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่กรุณาให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้การทดลองดำเนินไปได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืช : ถั่วเหลือง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 156 หน้า.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2560. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 215 หน้า.

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.

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.

https://en.wikiversity.org/wiki/Gene_transcriptions/Distal_promoters

http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Keim, P., T.C. Olson and R.C. Shoemaker. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet. Newsl*. 15: 150-152.

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.

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.

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.

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.

SoyBase. http://soybase.org.

Soybean Upstream Regulatory Element (SURE). http://www.igece.org/SystemsBiologyCenter/Soybean/Soybean_files/SURE.html. Accessed on April 10, 2014.