

การโคลนยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่างและการแสดงออกของยีนในยาสูบ

Cloning of Cyclophilin Gene from *Sorghum bicolor* (L.) Moench and Gene Expression in Tobacco

สุภาวดี จ้อยเหรียญ กษิต ศิษย์บรรจง ชยานิจ ศิษย์บรรจง
พยุงศักดิ์ รวยอารี หทัยรัตน์ อุไรรงค์

Suphawadee Ngorian Karsedis Distabanjong Chayanit Distabanjong
Payungsak Rauiyaree Hathairat Urairong

ABSTRACT

Cyclophilins are ubiquitous proteins present in all subcellular compartments, which are involved in a variety of processes such as immunosuppression and major biotic and abiotic stresses. The research work has been done at the Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathumthani Province during October 2007 – September 2010. In this study, full-length genomic DNA sequences of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) encoding cyclophilin (*SbCyP*) have been isolated from sorghum via PCR – based method. The gene sequence contains a fragment of 1062 kb, including a 519 bp complete ORF, the 5'UTR of 130 bp, 3'UTR of 413 bp and a polyA signal AATAA motif. *SbCyP* gene encoding the 172 amino acid polypeptide. Conducted submit CyP genes on GenBank accession no. EU722309. The highly conserved region of the gene is cyclophilin (CyP) which are also found in *Saccharum officinarum* L. (QG246462.1) and *Zea mays* L. (X68678.1) with 91% and 90% of homology respectively. A 519 bp fragment of the *SbCyP* gene was inserted into plant expression vector pCambia2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator, nptII as selectable marker with total size of 10 kb for pCambia2300 – CyP over – expression cassette. Maximum quantity of protein produced from recombinant plasmid (pEcoli – CyP) was detected after 6 hours of activation induction by IPTG. In addition, examination by SDS – PAGE displayed the 18.4 kDa of protein size. The expression cassette was then transformed into *Nicotiana tabacum* (tobacco) plant by Agrobacterium – mediated transformation, with kanamycin as a selection antibiotic. Ten transgenic tobacco plants were obtained using PCR – based method. Investigation of stress to tolerance involved salinity tolerance and drought tolerance, using NaCl and PEG 6000 respectively. Transgenic tobacco plants displayed higher tolerance to these stress conditions compare to non – transgenic plants.

Key words : Cyclophilin Gene, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, Cloning and Characterization, Transformation, *Nicotiana tabacum* (Tobacco) Plant

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ปทุมธานี 12110

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathumthani 12110

บทคัดย่อ

การโคลนยีนไซโคลฟิลิน (Cyclophilin : CyP) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างระบบภูมิคุ้มกัน และยับยั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช ช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพที่ไม่เหมาะสม ดำเนินการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2553 งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่าง โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน CyP นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวฟ่าง ได้ยีนขนาด 1062 คู่เบส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน CyP ที่พบในอ้อย (QG246462.1) และข้าวโพด (X68678.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identities) เท่ากับ 91% และ 90% ตามลำดับ นำข้อมูลมาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่า ยีน CyP มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน (ORF) มีขนาด 519 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน CyP จำนวน 172 amino acid พบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5' (5'UTR) และ 3' (3'UTR) ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน เท่ากับ 130 และ 143 คู่เบส ตามลำดับ และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งของ polyA signal (AATAA motif) อยู่ในส่วนของ 3'UTR ได้ทำการ submit ยีน CyP ลงในฐานข้อมูลชีวภาพสากล GenBank accession no. EU722309 ทำการสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อยีน CyP เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) ได้พลาสมิดสายผสม (pCAMBIA2300 – CyP) มีขนาด 10 กิโลเบส ทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของ recombinant plasmid (pEcoli – CyP) พบว่า มีการแสดงออกของยีน CyP หลังจากถูกกระตุ้นด้วย IPTG มีปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้สูงสุดเมื่อถูกกระตุ้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และพบการแสดงออกของโปรตีนที่ขนาด 18.4 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วย SDS – PAGE ทำการถ่ายฝากยีน CyP เข้าสู่ใบยาสูบโดยใช้วิธีอะโกรแบคทีเรียคัดเลือกว่าได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกว่าที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin และตรวจสอบการปรากฏของยีนโดยใช้เทคนิค PCR พบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 10 ต้น ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทดสอบความทนทานต่อสถานะเครียด ได้แก่ การทดสอบในอาหารสูตร MS ที่เติมเกลือ (NaCl) เพื่อทดสอบความทนเค็ม และทดสอบในอาหารสูตร MS ที่เติม PEG 6000 เพื่อทดสอบความทนสภาวะขาดน้ำ พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มีความทนทานต่อสถานะเครียดดังกล่าวได้ดีกว่าต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน CyP ที่ใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบ

คำหลัก : ยีนไซโคลฟิลิน, ข้าวฟ่าง, การโคลนและวิเคราะห์ยีน, การถ่ายฝากยีน, ยาสูบ

คำนำ

ปัจจุบันประชากรส่วนใหญ่ในทุกภาคของประเทศไทย ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก พืชส่วนใหญ่ที่เกษตรกรทำการเพาะปลูกเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ข้าวโพด ปาล์มน้ำมัน ยางพารา ถั่วเหลือง มันสำปะหลัง อ้อย เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) การเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจเหล่านี้มักพบปัญหาและอุปสรรคในการเพาะปลูก เช่น โรคพืช แมลงศัตรูพืช และสภาพความแปรปรวนของดินฟ้าอากาศ ทั้งปรากฏการณ์เอลนีโญที่ทำให้เกิดความแห้งแล้ง ในขณะที่ลานินญาทำให้เกิดฝนตกหนักในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเอลนีโญและลานินญาส่งผลกระทบต่อพื้นที่เกษตรกรรมโดยตรง (จารุจินต์, 2554) ปัจจุบันปัญหาดังกล่าวนับวันจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ทำให้เกษตรกรต้องปรับปรุงวิธีการเพาะปลูก รวมทั้งวางแผนการเพาะปลูกให้เหมาะสมกับสภาพดินฟ้าอากาศ นอกจากนี้ยังจำเป็นต้องมีพันธุ์พืชที่มีคุณสมบัติสามารถทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ โดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยพัฒนาพันธุ์พืชของไทยให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตที่สูงขึ้น สามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ จึงเป็นเรื่องที่นักวิจัยไทยต้องทำการวิจัยอย่างเร่งด่วน

ไซโคลฟิลิน (CyPs) เป็นโปรตีนประเภท เปปติคิลโพรพิล ซิส-ทรานส์ ไอโซเมอเรส (PPIases) ที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ของออร์แกเนล (organelle) ทั้งในเซลล์โปรคาริโอตและยูคาริโอต มีการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่พืชชนิดนั้นดำรงชีวิตอยู่ เช่น การได้รับผลกระทบจากโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ เช่น สภาวะแห้งแล้ง สภาวะดินเค็ม เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าในสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มียีนชนิดหนึ่งที่สามารถตอบสนองต่อสภาวะความไม่เหมาะสมด้านต่างๆ คือ ยีนไซโคลฟิลิน โดยมีการสร้างภูมิคุ้มกัน และยับยั้งขบวนการที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืช ซึ่งช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นๆ (Luan *et al.*, 1994; Kong *et al.*, 2001) ไซโคลฟิลินในพืช ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1990 โดยการสกัดแยก cDNA จากมะเขือเทศ ข้าวโพด และคาโนลา (Gasser *et al.*, 1990) ปัจจุบันมีรายงานพบลำดับเบสที่เหมือนกับยีนไซโคลฟิลินที่โคลนได้จากพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง อ้อย ถั่วเหลือง ฝ้าย ยาสูบ มะพร้าว และอะราบิดอพซิส เป็นต้น อีกทั้งยังพบยีนชนิดนี้ในมนุษย์และสัตว์อีกด้วย ที่ผ่านมามีงานวิจัยการค้นหายีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะของการทนแล้งในข้าวฟ่าง และพบว่ามียีนไซโคลฟิลินที่มีการแสดงออกอย่างสูงเมื่อปลูกในสภาพแล้ง อีกทั้งยังพบไซโคลฟิลินมีการแสดงออกอย่างสูงในการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ จากพืชชนิดอื่นด้วย เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง พืชตระกูลถั่ว คาโนลา และมันฝรั่ง (Marivet *et al.*, 1992, 1994, 1995; Godoy *et al.*, 2000; Sharma and Singh, 2003) เป็นต้น

ดังนั้น การโคลนยีนไซโคลฟิลินจากข้าวฟ่างสายพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ยางพารา ถั่วเหลือง อ้อย และพืชอื่นๆ โดยการถ่ายฝากยีนไซโคลฟิลินเข้าสู่พืชเหล่านั้น เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้มีคุณสมบัติทนแล้งมากยิ่งขึ้น จากยีนที่สามารถพัฒนาขึ้นได้เองในประเทศไทยจะเป็นประโยชน์ต่อการนำพืชทนแล้งที่ได้มาพัฒนาให้สามารถใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การโคลนยีน CyP จากข้าวฟ่าง

1.1 ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีน CyP ที่มีการแสดงออก

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน CyP ได้ดังนี้คือ CyP4 (forward) และ CyP4 (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีนในส่วนที่มีการแสดงออก คือ CyP*Xba*I (forward) และ CyP*Kpn*I (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีน CyP เข้ากับ Plant Expression Vector (pCambia2300) คือ NOS (forward) และ 35S*CaMV* (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับสังเคราะห์ยีนเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน คือ CyP*Sa*I (forward) และ CyP*Hd* (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีน CyP เข้ากับ protein expression vector (pEcoli) คือ T7_Up1 (forward) และ T7_term (reverse) (Table 1)

1.2 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอ

คัดเลือกพันธุ์ข้าวฟ่างที่มีลักษณะทนแล้ง จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อุทอง 1 และพันธุ์สุพรรณบุรี 60 นำเมล็ดพันธุ์มาเพาะในกระถาง เมื่ออายุได้ 1 เดือน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตรวจวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, Lithuania)

1.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyP คือ CyP4 (forward) และ CyP4 (reverse) โดยใช้ HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μ M gene specific primer (forward), 0.4 μ M gene specific primer (reverse) ปรับปริมาตรด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ Pre – Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ / Denature 94°C 30 วินาที, Annealing 60°C 30 วินาที, Extension 70°C 2 นาที จำนวน 35 รอบ / 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

1.4 การโคลนยีน CyP เข้าสู่เวกเตอร์ และการวิเคราะห์ลำดับเบส

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำชิ้นยีน CyP ขนาด ~1 กิโลเบส มาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat – shock (Sambrook *et al.*, 1989) และเลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) – ampicillin/X-gal/IPTG [(LB : เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม tryptone, 5 กรัม yeast extract, 15 กรัม bacto-agar, ddH₂O), 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ampicillin, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร IPTG, 100 ไมโครกรัม/

มิลลิลิตร X-gal] บ่มเพลทที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มี insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB – ampicilin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12 – 16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Lithuania) ตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *BamHI* ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme ปรับปริมาณด้วยน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที ตรวจสอบวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน CyP นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน CyP มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3' และ M13 (reverse) 5' – GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3' นำปฏิกิริยา cycle sequencing เข้าเครื่อง Thermal Cycler (Geneamp 9700, Perkin Elmer, USA) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน CyP ทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย HiDi - formamide 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ

2. การสร้างชุด Cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

2.1 การสร้างชุด Cassette ยีน

ทำการสังเคราะห์ยีน CyP จากดีเอ็นเอของข้าวฟ่าง โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyP ได้แก่ CyP*XbaI* (forward) และ CyP*KpnI* (reverse) โดยใช้ HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.3) ตรวจสอบวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

นำพลาสมิดดีเอ็นเอของ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) มีขนาด 9648 คู่เบส มียีน nptII (kanamycin) เป็นยีนคัดเลือก และชิ้นดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* และนำดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.4) นำชิ้นยีน CyP เชื่อมต่อเข้ากับ pCAMBIA2300 จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat – shock และเลี้ยงในอาหารแข็ง LB – kanamycin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิค PCR

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Lithuania) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน 2 วิธี คือ [1] การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *KpnI* (ข้อ 1.4) และ [2] การใช้เทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMv (reverse) โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.3) และตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน (protein expression)

3.1 การสร้างชุด Cassette ยีน

ทำการสังเคราะห์ยีน CyP จากดีเอ็นเอของข้าวฟ่าง ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน CyP ได้แก่ CyPSaI (forward) และ CyPHd (reverse) (Table 1) โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.3) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis และนำดีเอ็นเอของ expression vector (pEcoli) ที่มีขนาด 5758 คู่เบส ซึ่งอยู่ในส่วนของ N – terminal vector ในระบบ T7 expression system มี T7 promoter เป็นส่วนประกอบทำให้เกิดการถอดรหัสและแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ และขึ้นดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SaI* และ *HindIII* และนำดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.4) ทำการเชื่อมต่อยีน CyP เข้ากับ expression vector เพื่อสร้าง recombinant protein มีขนาด ~6.3 กิโลเบส จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat – shock และเลี้ยงในอาหารแข็ง LB – ampicillin

3.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิค PCR

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Lithuania) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน 2 วิธี คือ [1] การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SaI* และ *HindIII* (ข้อ 1.4) และ [2] การใช้เทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์ T7_Up1 (forward) + T7_term (reverse) โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.3) และตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

3.3 การตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน CyP

ทำการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม (pEcoli – CyP) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย BL21 (DE3) เพื่อการผลิตโปรตีน โดยวิธี heat – shock และเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB – ampicillin (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มี insert ของยีน นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Lithuania) และตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR (ข้อ 2.2) จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่มี recombinant plasmid ของยีน CyP มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB – ampicillin

ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด cell culture ตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร LB – ampicillin 50 มิลลิลิตร และปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่ง OD₆₀₀ = 0.5 จากนั้นเติม 3 mM IPTG เลี้ยงต่อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยเก็บเซลล์ทุก 2 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์ออกจากอาหารโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ละลายตะกอนด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และแยกขนาดของ fusion protein ด้วย 10% SDS – PAGE ใช้บัฟเฟอร์ Tris – glycine (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1% SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 150 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย้อมแผ่นเจลสีด้วยสารละลาย Coomassie – blue (0.2% Coomassie – blue R – 250 ใน 50% methanol และ 70% acetic acid) เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วย destain solution (25% methanol, 7% acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทียบขนาดของแถบโปรตีน CyP กับโปรตีนมาตรฐาน PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, Lithuania) เพื่อตรวจสอบปริมาณของ fusion protein ในแต่ละชั่วโมง (Biolabs, 1993)

4. การถ่ายยีน CyP เข้าสู่ยีส

4.1 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด (chimeric construct) เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี Electroporation (Walkerpeach และ Velten, 1994)

การเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี Electroporation โดยนำพลาสมิดของ pCAMBIA2300 – CyP ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* ผสมให้เข้ากันเบาๆ วางไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ด้วยเครื่อง Bio-Rad Gene Pulser โดยใช้สภาวะ ดังนี้ cuvette gap 0.2 cm, voltage 2.5 kV, capacitor 25 μ F และ resistance 480 Ω เติมหาอาหารเหลว YEP ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าที่ความเร็ว 200 – 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ YEP ปริมาตร 200 ไมโครลิตร Spread plate บนอาหารแข็ง YEP – rifampicin (control) และบนอาหารแข็ง YEP – rifampicin – kanamycin เฟลทละ 80 ไมโครลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 2 – 3 วัน ตรวจสอบการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์ *A. tumefaciens* โดยเทคนิค PCR นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ CyP_{Xba}I (forward) และ CyP_{Kpn}I (reverse) โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.3) และตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

4.2 การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated gene transfer)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Horsch และคณะ (1985)

การเตรียมชิ้นส่วนยาสูบเพื่อใช้ในการถ่ายยีนโดยนำเมล็ดยาสูบเวอร์จิเนียมาผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อด้วย Hailer[®] Bleach ความเข้มข้น 30% (v/v) นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 3 – 4 ครั้ง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติม sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 ในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเตรียมเซลล์ *A. tumefaciens* โดยนำเซลล์ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มียีน CyP มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง 2xYT – kanamycin (50 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 2 – 3 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT – kanamycin ที่อุณหภูมิ 28°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 – 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความเข้มข้นที่ OD₆₀₀ ประมาณ 0.5 – 1.0 ซึ่งเป็น log phase ทำการแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหาร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรีย จำนวน 3 ครั้ง เติมอาหารเหลว MS + BA 5 µM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมไว้สำหรับการถ่ายยีน

การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบ โดยวิธี leaf disc transformation ดัดแปลงจากวิธีการของ Horsch และคณะ (1985) นำเซลล์ *A. tumefaciens* ที่มียีน CyP มาเลี้ยงร่วมกับใบยาสูบขนาด 0.5 x 0.5 ซม. นำไปจุ่มในอาหารเหลว MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* เจือจาง 1 : 20 เป็นเวลา 1 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษกรอง Whatman no.1 (Whatman International Ltd., Maidstone, England) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเลี้ยงบนอาหาร MS + BA 5 µM + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 ในสภาพห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำใบยาสูบไปเลี้ยงบนอาหาร MS + BA 5 µM + carbenicillin 400 มิลลิกรัม/ลิตร + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 นาน 6 สัปดาห์ เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7 วัน เพื่อทำการฆ่าเซลล์ *A. tumefaciens* และเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไปอีก 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตรเดิมที่ลดปริมาณ carbenicillin ลงเหลือ 200 มิลลิกรัม/ลิตร และเปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน เพื่อให้ใบยาสูบมีการพัฒนาเจริญเติบโตเป็นยอดอ่อน จากนั้นคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหาร MS ที่เติม kanamycin (200 มิลลิกรัม/ลิตร) + BA 5 µM + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 นาน 2 สัปดาห์ คัดเลือกยอดอ่อนที่รอดชีวิต ย้ายลงในอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณยอด เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ทำการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ โดยการตัดแยกยอดอ่อนที่เจริญเติบโตไปเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA 5 µM + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 เพื่อชักนำให้เกิดราก และตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

5. การตรวจสอบการปรากฏของยีน โดยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนใบยาสูบที่รอดชีวิตในอาหารคัดเลือก โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) (ตามข้อ 1.2) ทำการตรวจสอบการปรากฏ

ของยีน CyP ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน คือ CyP*Xba*I (forward) และ CyP*Kpn*I (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวกเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35S*CaMV* (reverse) โดยใช้ HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.3) และตรวจวิเคราะห์ผล ด้วย 1% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

6. การทดสอบการแสดงออกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP

6.1 การทดสอบความทนทานต่อสถานะเค็ม (NaCl)

นำต้นอ่อนยาสูบปกติ และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 μ M + sucrose 3% (w/v) + agar 6.5% (w/v) pH 5.7 และเกลือ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% (w/v) ทำการชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นของต้นยาสูบที่ทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 7 factorial in Completely Randomized Design (CRD) 3 ซ้ำ ประกอบด้วย ปัจจัย A ชนิดพืช คือ ยาสูบปกติ (Non – GM) และยาสูบที่มียีน CyP (GM)

ปัจจัย B ความเข้มข้นของ NaCl ที่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% (w/v)

การบันทึกผล

1. อัตราการเจริญเติบโตคิดเป็นค่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น คำนวณจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น หลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด (เท่า)} = \frac{\text{น้ำหนักสดหลังเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

2. อัตราการรอดชีวิต เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือ (NaCl) ที่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% (w/v) นาน 6 สัปดาห์ โดยคิดค่าเฉลี่ยความเข้มข้นละ 10 ต้น

6.2 การทดสอบความทนทานต่อสถานะขาดน้ำ โดยใช้ polyethylene glycol (PEG 6000)

นำต้นอ่อนของยาสูบปกติ และยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 5 μ M + sucrose 3% (w/v) + agar 8% (w/v) pH 5.7 และ PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันคือ 0, 5, 10, 15 และ 20% (w/v) ทำการชั่งน้ำหนักสดเริ่มต้นของต้นยาสูบที่ทดสอบ

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 5 factorial in Completely Randomized Design (CRD) 3 ซ้ำ ประกอบด้วย ปัจจัย A ชนิดพืช คือ ยาสูบปกติ (Non – GM) และยาสูบที่มียีน CyP (GM)

ปัจจัย B ความเข้มข้นของ PEG 6000 ที่ 0, 5, 10, 15 และ 20% (w/v)

การบันทึกผล : อัตราการเจริญเติบโตคิดเป็นค่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น คำนวณจากน้ำหนักสดที่เพิ่มขึ้น หลังเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการเพิ่มน้ำหนักสด (เท่า)} = \frac{\text{น้ำหนักสดหลังเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์} - \text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักสดเริ่มต้น}}$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีน CyP จากข้าวฟ่าง

สังเคราะห์ยีน CyP ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากข้าวฟ่าง โดยการทำปฏิกิริยา PCR (Figure 1a) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาด ~1 กิโลเบส (Figure 1b) คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบยีนที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1062 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ของยีน CyP ได้จำนวน 172 amino acid อยู่ภายใน Open reading frame (ORF) ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 131 – 649 และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง polyadenylation signal AATAA motif อยู่ในส่วนหาง 3'UTR ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมพบว่า ยีน CyP ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวฟ่างมีความเหมือนอย่างสูงกับตำแหน่ง Trp128 (W128) ของยีน CyP ทั้งหมดที่พบในยูคาริโอต (Liu *et al.*, 1991) และลำดับกรดอะมิโน KSGKPLH ตำแหน่งที่ 48 – 54 จะมีความเฉพาะเจาะจงกับยีน CyP ในส่วนของ cytoplasmic ที่พบได้ในพืชหลายชนิด (Lippuner *et al.*, 1994) (Figure 2.) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน CyP ที่พบในอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) (GQ246462.1) และข้าวโพด (*Zea mays* L.) (X68678.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identity) เท่ากับ 91% และ 90% ตามลำดับ

Table 1. Primer name, Base sequence, Size of primer, Melting temperature (Tm) and GC content of designing specific primers from Genbank on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Primer name	Base sequence (5' → 3')	Size (bp)	Tm (°C)	GC content (%)
CyP4(forward)	CCG GCT ATT TTA CCG CAC CMG TYC TC	26	67.7(60)	53.8
CyP4(reverse)	GGG CKA TCC ATG CTT GGC AGT TCA C	25	68.7(60)	58.0
CyPXbaI(forward)	CAC TCT AGA ATG GCG AAC CCG CGC GTC TTC TTC GAC	36	74.9(60)	58.3
CyPKpnI(reverse)	CAC GGT ACC CTA GCT GAG CTG GCC GCA GTC AGC ATC	37	78.0(60)	64.9
NOS(forward)	GTT TGA ACG ATC GGG GAA ATT CGA GCT C	28	67.5(60)	50.0
35SCaMV(reverse)	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30	70.1(60)	53.3
CyPSaII(forward)	CAC GTC GAC ATG GCG AAC CCG CGC GTC TTC TTC GAC	36	77.2(60)	63.9
CyPHd(reverse)	CAC AAG CTT CTA GCT GAG CTG GCC GCA GTC AGC GAT C	37	75.8(60)	59.5
T7_Up1(forward)	CGG CGT AGA GGA TCG AG	17	62.0(60)	64.7
T7_term(reverse)	CTA GTT ATT GCT CAG CGG	18	57.6(60)	50.0

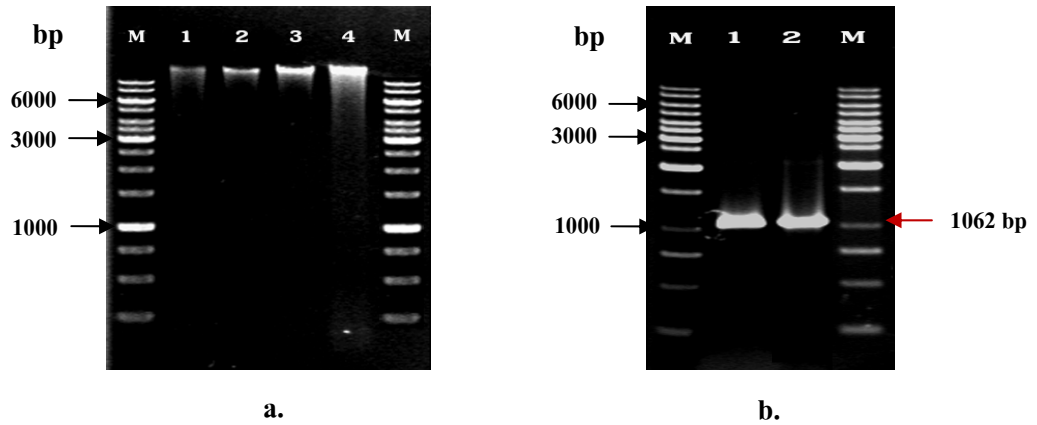


Figure 1. a. Genomic DNA isolated from two sorghum cultivars on 1% agarose gel. Lane M = 1 kb DNA ladder (Fermentas), lane 1-2 = Genomic DNA from sorghum (UT 1), lane 3-4 = Genomic DNA from sorghum (SPR 60)

b. PCR analysis of cyclophilin gene from 2 cultivars sorghum using specific primer CyP4 (forward) and CyP4 (reverse). Lane M = 1 kb DNA ladder (Fermentas), lane 1 = PCR product from sorghum (UT 1), lane 2 = PCR product from sorghum (SPR 60)

```

1   tccggctatTTTaccgcaccagttctccctccaccagatcagatcagatcacagaacgca
61  acagccgaaggaaaaatttcccccaacaaaaaacctctctcccaaaccctagctacct
121 tccgatcccgatggcgaaccgcgcgtcttcttcgacatgacggtcggcggcgcgcgccg
      M A N P R V F F D M T V G G A A A
181 ggggcggatcgtgatggagctgtacgcgaacgaggtgcccaagacggccgagaacttccg
      G R I V M E L Y A N E V P K T A E N F R
241 cgcgctgtgcacgggcgagaagggcggtggggaagtcggggaagccgctccactacaagg
      A L C T G E K G V G K S G K P L H Y K G
301 ctccaccttccaccgcgtcatcccgagttcatgtgccagggcgggcgacttcacccgggg
      S T F H R V I P Q F M C Q G G D F T R G
361 caacgggaccggaggcgagtcctatctacggcgacaagttccccgacgagaagttcgtgcg
      N G T G G E S I Y G D K F P D E K F V R
421 caaccacacggccccggggtgctctccatggccaacgccggggcccaacaccaacggctc
      N H T A P G V L S M A N A G P N T N G S
481 ccagttcttcatctgcaccgtcgataccccctggctcgacgggaagcacgtcgtctttgg
      Q F F I C T V D T P W L D G K H V V F G
541 ccaggtcgtcgagggcatggacgtcgtcaaggccatcgagaaggtcggatcccgcagcgg
      Q V V E G M D V V K A I E K V G S R S G
601 atccacctccaaggaggtcaagatcgctgactgcggccagctcagctagatcgttggtct
      S T S K E V K I A D C G Q L S *
661 ggtctgccggtccgccttccctcccgctcatcgctccactccgcctgcgtcccgtcccgttt
721 ccggtttgcttcgatctgaataagatgatggatgatctgagtggtggtctgagttgagtcg
781 ttattttatcatgtgcgtctgtctgtgctcgctcgcggtttaatctagcgggtgtaggtgtg
841 gatctccgaatcccatggcgccctctgcttacttcgtgtttcatcaccagttatatgttat
901 gagatccaggataatgcattaatgctatgagaactgagattcgggtttcatgcttcttggt
961 ccatgtgccatgtcatgtgcgtcttgttccattgcaagttcggaccccaaatgattttg
1021 attgtcaatatgttaatgtgaactgccaaagcatggatcgccc

```

Figure 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of cyclophilin gene. The start (ATG) and stop (TAG) codons are highlighted. The underline shows the polyadenylation signal AATAA, the red bold shows the conservative sequence of the plant cytoplasmic cyclophilin

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม EMBL – EBI database (European Bioinformatics Institute, UK) (www.ebi.ac.uk/ena/data/view/EU722309) พบว่ายีน CyP ที่มีส่วนประกอบครบทั้งยีน (Figure 3) ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open Reading Frame : ORF) มีขนาด 519 คู่เบส, ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (5' Untranslated region หรือ 5'UTR) มีขนาดเท่ากับ 130 คู่เบส และทางด้านปลาย 3' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (3' Untranslated region หรือ 3'UTR) มีขนาดเท่ากับ 143 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ยีน CyP ที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความสมบูรณ์ จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ submit ลงในฐานข้อมูลของ GenBank accession no. EU722309. (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html) (Appendix 1)

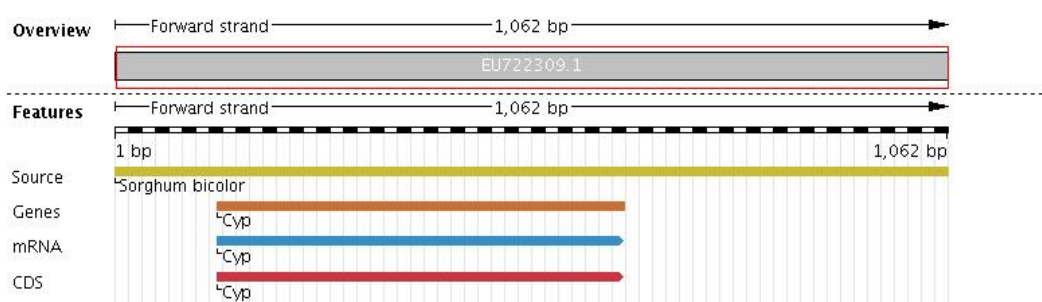


Figure 3. Structure of cyclophilin gene analyzed by EMBL-EBI database. The 1062 bp fragment of CyP gene is shown above (yellow bar). Coding sequence (CDS) of this gene is 519 bp (red arrow)

2. การสร้างชุด Cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

นำชิ้นยีน CyP ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 519 คู่เบส เชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) (Figure 4a) ขนาดประมาณ 9640 คู่เบส ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* (Figure 4b) โดยที่ pCAMBIA2300 ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน neomycin phosphotransferase (*nptII*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP ซึ่งมี 2 วิธีด้วยกัน วิธีแรกคือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *KpnI* พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 1 และ 9 กิโลเบส (Figure 5a) และวิธีที่สองคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส (Figure 5b) โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ (pCAMBIA2300 – CyP) มีขนาดประมาณ 10 กิโลเบส (Figure 6)

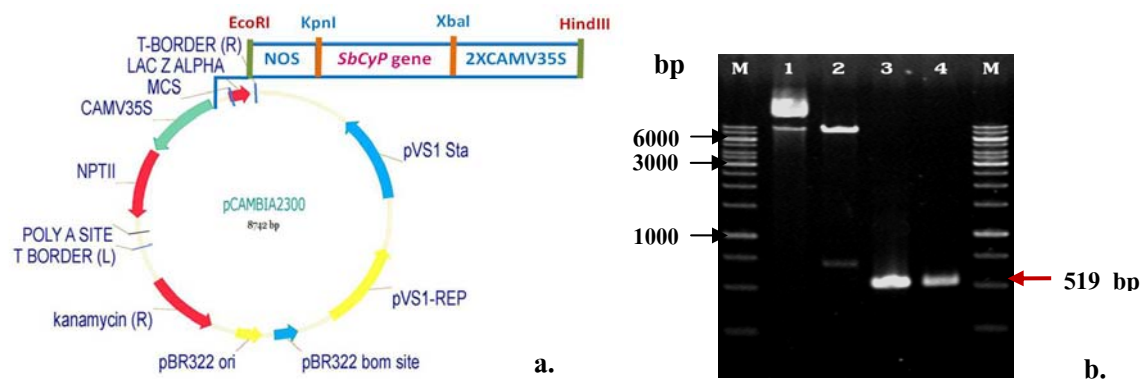


Figure 4. a. Map of plant expression vector (pCambia2300) and position of the cyclophilin (CyP) gene in plant expression vector

b. DNA of a plant expression vector (pCambia2300) and a cyclophilin (CyP) gene digested with specific enzyme *XbaI* and *KpnI*. Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1 = Plasmid DNA of pCambia2300, lane 2 = Plasmid DNA of pCambia2300 digested with specific enzyme *XbaI* and *KpnI*, Lane 3 = PCR product CyP gene, lane 4 = PCR product CyP gene digested with specific enzyme *XbaI* and *KpnI*

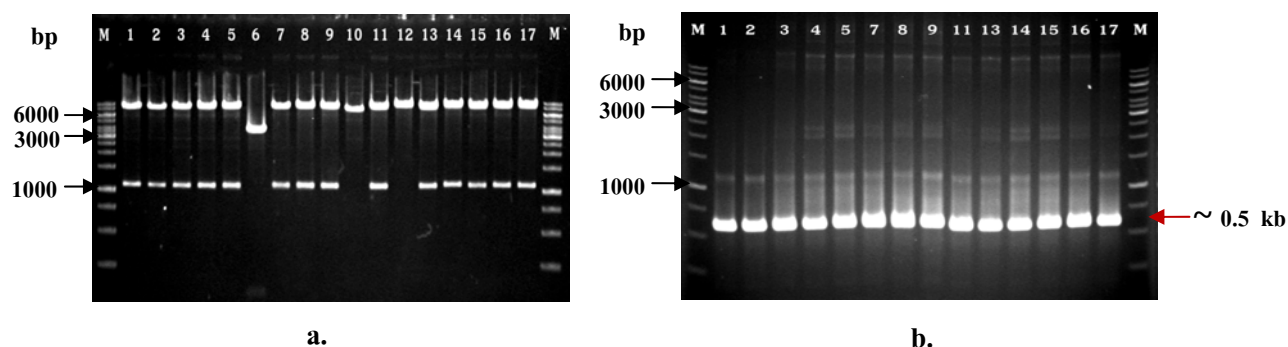


Figure 5. a. Pattern of DNA derived from recombinant plasmid DNA (pCambia2300 – CyP) digested with specific enzyme *HindIII* and *KpnI*. Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), Lane 1-17 = pCambia2300 – CyP clone 1 – 17

b. PCR analysis of plasmid DNA (pCambia2300 – CyP) using specific primer NOS (forward) and 35SCaMV (reverse). Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1-14 = pCambia2300 – CyP clone 1-5, 7-9, 11 and 13-17

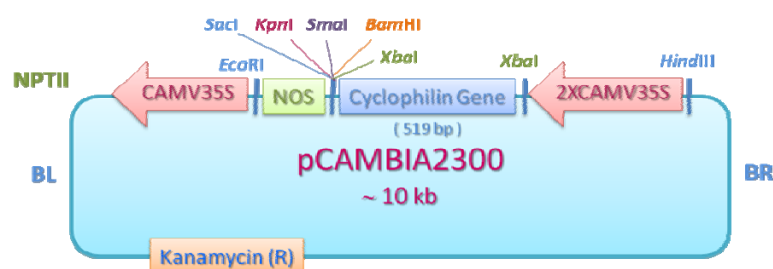


Figure 6. Structure of plasmid construct pCambia2300 – CyP

3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน (protein expression)

นำจีนยีน CyP ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 519 คู่เบส เชื่อมต่อเข้ากับ protein expression vector (pEcoli – vector) (Figure 7a) ขนาด 5758 คู่เบส ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SalI* และ *HindIII* (Figure 7b) โดยที่ pEcoli – vector ซึ่งอยู่ในส่วนของ N – terminal vector ในระบบ T7 expression system มี T7 promoter เป็นส่วนประกอบ โปรตีนจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมา โดยเอนไซม์ T7 RNA polymerase จะเข้าไปจับกับ T7 promoter ทำให้เกิดการถอดรหัสและแปลรหัสออกมาเป็นโปรตีนได้ ซึ่งแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) มียีนที่สามารถสร้าง T7 RNA polymerase ได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย IPTG จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ คือ ขนาดประมาณ 5.7 กิโลเบส (pEcoli vector) และ 0.5 กิโลเบส (CyP) และการตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7_Up (forward) และ T7_term (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.8 กิโลเบส โดยโครงสร้างของ recombinant protein (pEcoli – CyP) ที่มีความสมบูรณ์จะมีขนาดประมาณ 6.3 กิโลเบส จากนั้นนำ recombinant protein (pEcoli – CyP) ซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว นำไปถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยตรวจสอบปริมาณของ fusion protein จากเซลล์ *E. coli* ที่มี recombinant protein (pEcoli – CyP) เมื่อทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์และชักนำด้วย 3mM IPTG เป็นเวลานาน 0, 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า ยีน CyP มีการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน ซึ่งมีขนาดประมาณ 18.4 kDa และพบว่าโปรตีนจะมีปริมาณสูงสุด หลังจากชักนำด้วย IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Figure 8)

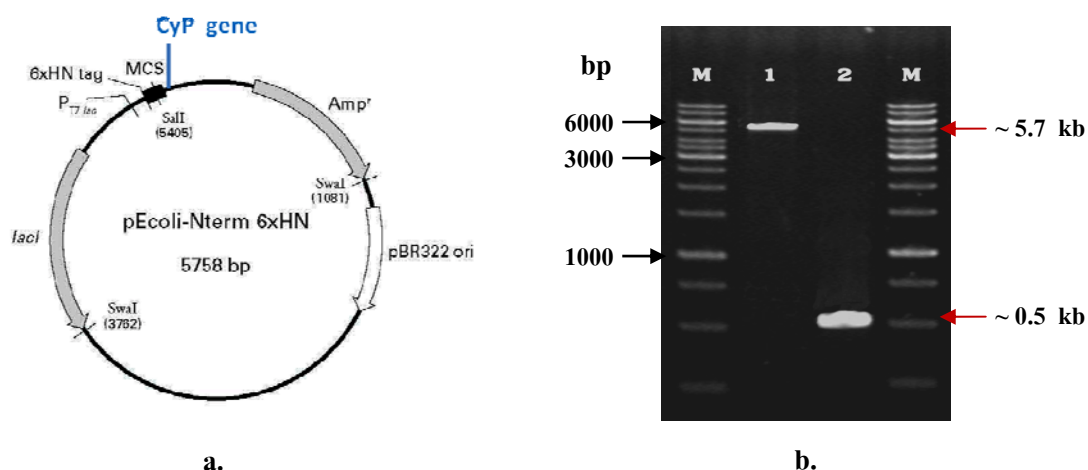


Figure 7. a. Map of protein expression vector (pEcoli) and position of the CyP gene in protein expression vector

b. DNA of protein expression vector (pEcoli) and CyP gene digested with specific enzyme *SalI* and *HindIII*. Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1 = Plasmid DNA of pEcoli vector digested with specific enzyme *SalI* และ *HindIII*, Lane 2 = PCR product CyP gene, lane 3 = PCR product CyP gene digested with specific enzyme *SalI* และ *HindIII*

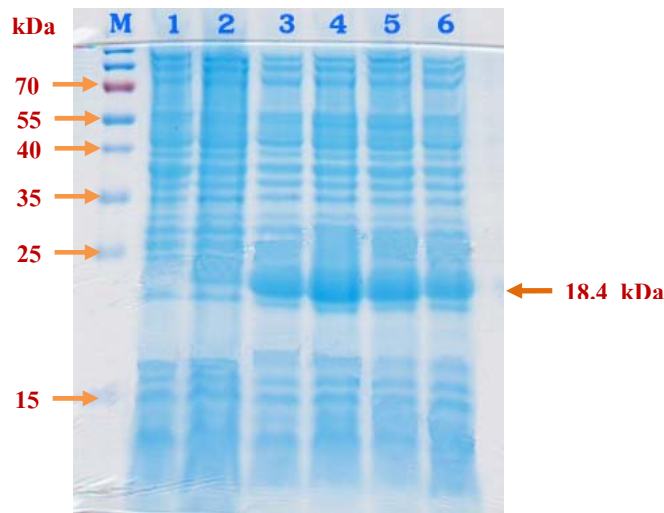


Figure 8. Expression of pEcoli - *SbCyP* in *E. coli* BL21. M, protein marker; Lane 1 = BL21 without induction, Lane 2 = pEcoli - *SbCyP* without induction; Lane 3 - 6 = pEcoli - *SbCyP* induction for 2, 4, 6, and 8h respectively

4. การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ และการคัดเลือกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีน

การถ่ายยีน *CyP* ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA2300 เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* (Linn.)) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ภายหลังการถ่ายยีนต้องกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบออกจากพืชให้หมด โดยใช้สารปฏิชีวนะชนิด carbenicillin 400 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งปริมาณที่ใช้มีความเหมาะสมสามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CyP* บนอาหารคัดเลือก สูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 5 μ M + sucrose 3% (w/v) + gelrite 0.3% (w/v) pH 5.7 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกยอดอ่อนที่รอดชีวิต ย้ายลงในอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณยอด เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ทำการชักนำให้เกิดต้นที่สมบูรณ์ พบว่า ต้นยาสูบที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก MS – kanamycin มีจำนวน 25 ต้น โดยคัดเลือกจากยอดอ่อนที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไปได้ และต้นอ่อนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก หรือเรียกว่า ต้น escape นั่นเอง สารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมาย (selectable marker gene) ที่ใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยถ่ายฝากยีนเข้าไปในจีโนมพืชพร้อมกับยีนเป้าหมาย ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin จะไม่สามารถทำอันตรายแก่เนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับยีนจะตายในอาหารคัดเลือก (Miki and McHugh, 2004) งานวิจัยนี้พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายฝากยีนสามารถพัฒนาให้เป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ โดยสามารถอยู่รอดบนอาหารคัดเลือก kanamycin ที่ความเข้มข้นในระดับค่อนข้างสูงคือ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากยีน *CyP* ที่อยู่ในพลาสมิดสายผสมที่มียีน *nptII* สอดแทรกอยู่ในจีโนมของยาสูบด้วย

5. การตรวจสอบการปรากฏของยีนในยาสูบ โดยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP จากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและสามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือก ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน คือ CyP*Xba*I (forward) และ CyP*Kpn*I (reverse) และไพรเมอร์ที่เป็นส่วนประกอบของเวกเตอร์พาหะ คือ NOS (forward) และ 35S*CaMV* (reverse) พบว่า มีต้นยาสูบจำนวน 10 ต้น ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน CyP ขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตรงกับยีนที่ได้สอดแทรกเข้าไปในจีโนมของยาสูบ ในขณะที่ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนดังกล่าว (Figure 9a, b)

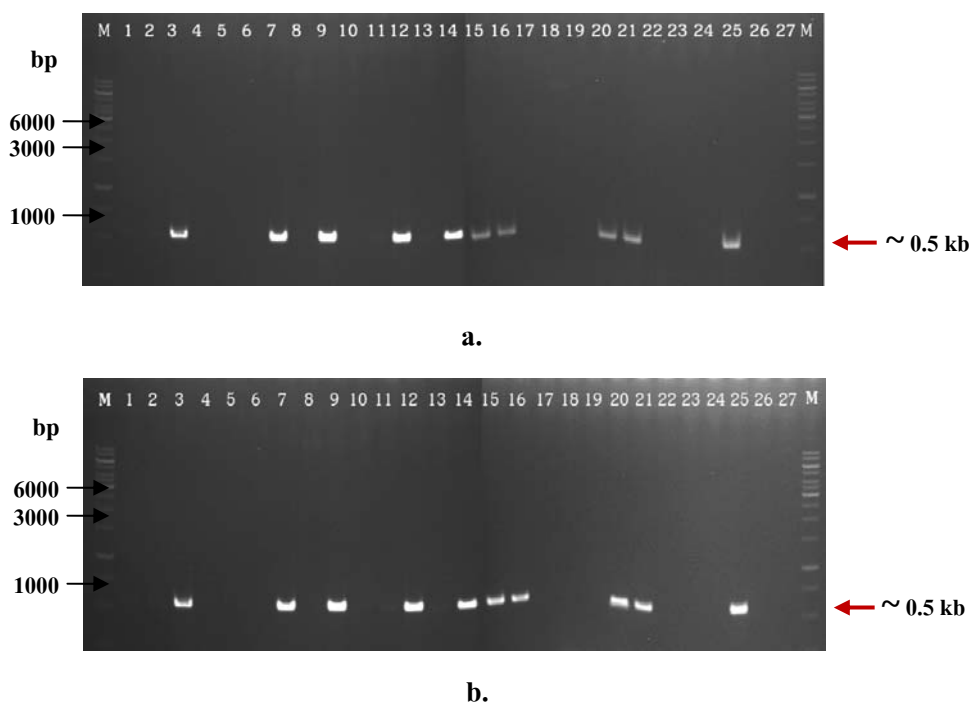


Figure 9 a. PCR analysis of tobacco plant using specific primer CyP*Xba*I (forward) and CyP*Kpn*I (reverse)

b. PCR analysis of tobacco plant using specific primer NOS (forward) and 35s*CaMV* (reverse). Lane M = 1 kb ladder (Fermentas), lane 1-2 = no. 1 – 2 control (no gene transfer had been performed), lane 3-27 = no. 3 – 27 (transgenic model plant)

6. การทดสอบการแสดงออกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP

6.1 การทดสอบความทนทานต่อสภาวะเค็ม (NaCl)

จากการเพาะเลี้ยงยาสูบปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP ในอาหารที่มีส่วนประกอบของเกลือ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 – 3% เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยชนิดพืช ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มีอัตราการเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดเท่ากับ 2.21 เท่า มากกว่ายาสูบปกติซึ่งมีเท่ากับ 1.64 เท่า และเมื่อพิจารณาปัจจัยความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) พบว่า

อัตราการเจริญเติบโตของยาสูบปกติและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP แตกต่างกันทางสถิติโดยมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดสูงสุดในอาหาร MS ที่เติมเกลือ (NaCl) 0.5% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) มากขึ้นอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดจะลดลง และเริ่มเห็นความแตกต่างของยาสูบทั้งสองชนิดอย่างเห็นได้ชัดที่ระดับความเข้มข้นเกลือ (NaCl) 2.0, 2.5 และ 3.0% ยาสูบทั้งสองชนิดมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดในอัตราที่ลดลง โดยยาสูบที่มียีน CyP มีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 1.97, 0.76 และ 0.73 เท่า ซึ่งมากกว่าอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของยาสูบปกติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.67, 0.34 และ 0.24 เท่า ตามลำดับ (Table 2) และจากการเปรียบเทียบกับลักษณะการเจริญเติบโตทางสัณฐานวิทยา ยาสูบที่มียีน CyP เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0% ถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มน้ำหนักสดในอัตราที่ลดลงเมื่อเทียบกับอาหารที่มีเกลือ (NaCl) ที่ระดับ 0 – 1% แต่ใบยังคงมีสีเขียว สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะที่ยาสูบปกติ ใบจะเหลืองซีด การตอบสนองต่ออาหารไม่ดี ขอบใบม้วน และมีบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 2.5 และ 3.0% (Figure 10) เนื่องจากความเต็มมีผลกระทบต่อกระบวนการเมตาโบลิซึมของพืชในหลายๆ ลักษณะ และยังมีผลให้มีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายวิภาคและลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเดิมต่อไปอีก 2 สัปดาห์ จากข้อมูลเฉลี่ยอัตราการรอดชีวิตพบว่า ยาสูบทั้ง 2 ชนิด ยังคงมีอัตราการรอดชีวิต 100% ที่ระดับเกลือ (NaCl) 1.5% เท่านั้น และจะค่อยๆ ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) สูงขึ้น โดยยาสูบที่มียีน CyP มีอัตราการรอดชีวิต 80% และยาสูบปกติมีอัตราการรอดชีวิตเพียง 30% เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติมเกลือ (NaCl) 2.0% และจะตายหมดเมื่อความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) เพิ่มขึ้นเป็น 2.5 และ 3.0% ในขณะที่ยาสูบที่มียีน CyP ยังคงรอดชีวิตถึง 50 และ 30% ตามลำดับ

Table 2. Fresh weight increment (time) of non – transformed (non – GM) and transformed tobacco (GM) cultured on various concentrations of NaCl after 4 weeks of culture.

NaCl conc. (w/v) (A)	Fresh weight increment (time) (B)		A – Mean
	Non – GM	GM (CyP)	
0%	3.08	2.95	3.01 ab
0.5%	3.29	3.88	3.59 a
1.0%	2.30	2.56	2.43 b
1.5%	1.37	2.65	2.01 bc
2.0%	0.67	1.97	1.32 c
2.5%	0.34	0.76	0.55 d
3.0%	0.24	0.73	0.49 d
B – Mean	1.64	2.21	
% CV		29.6	

Means within the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level of DMRT

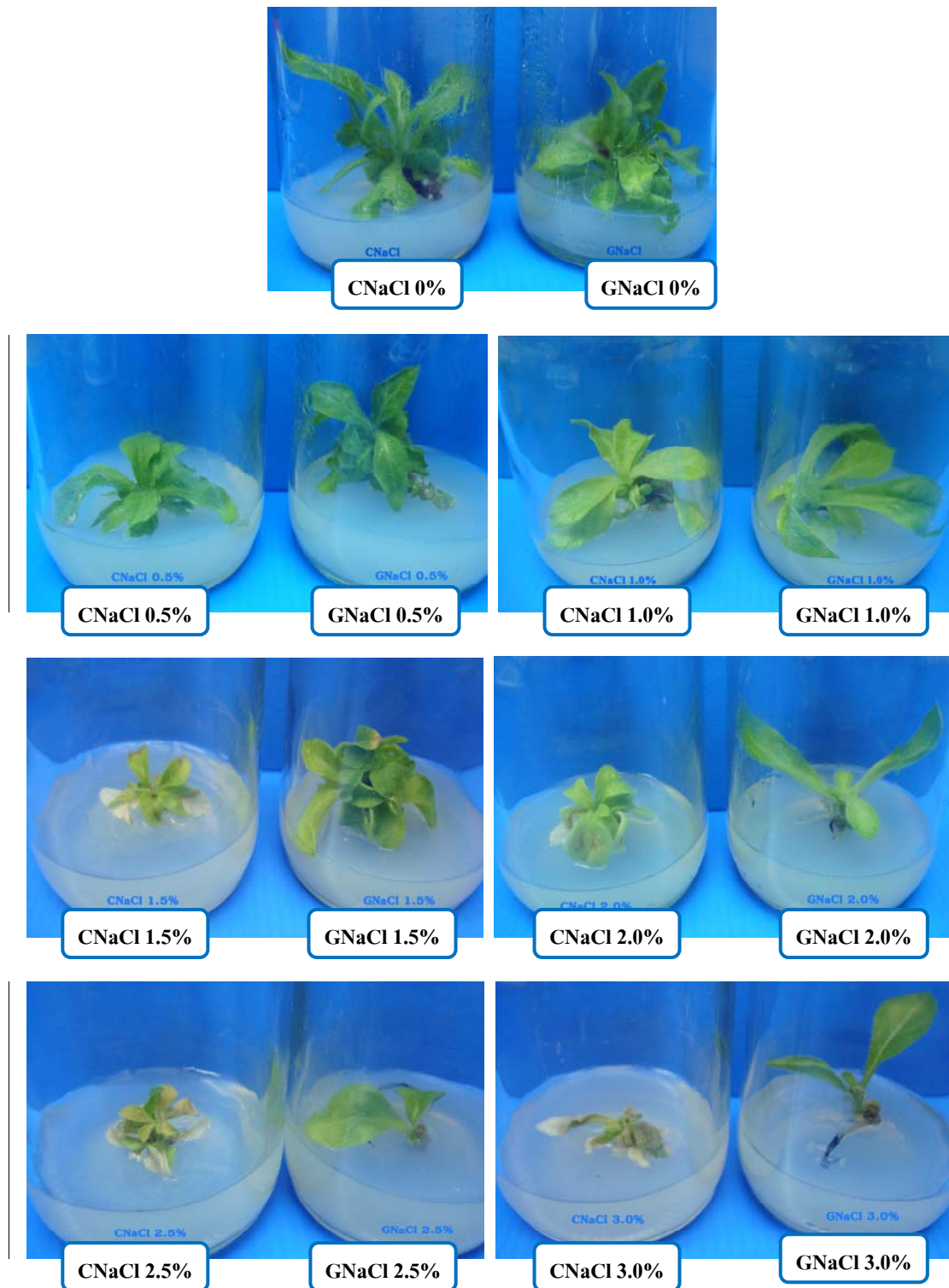


Figure 10. Growth of non – transformed tobacco (C) and transformed tobacco (G) on various concentration of NaCl (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0% (w/v)) after 4 weeks of culture

6.2 การทดสอบความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ (PEG 6000)

จากการเพาะเลี้ยงยาสูบปกติและยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP ในอาหารที่มีส่วนประกอบของ PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 5, 10, 15 และ 20% เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยชนิดพืชคือ ยาสูบปกติ กับยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP พบว่ามีความแตกต่างกัน ในยาสูบปกติ เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 5% จะมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดเท่ากับ 0.75 และ 0.60 เท่า และแตกต่างกันทางสถิติกับยาสูบปกติที่เลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 6000 ที่ระดับ 10, 15 และ 20% ซึ่งมีการเพิ่มน้ำหนักสดในอัตราที่ลดลงเท่ากับ 0.31, 0.33 และ 0.21 เท่าตามลำดับ ในขณะที่อัตราการเพิ่มน้ำหนักสดของยาสูบที่มียีน CyP เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 5, 10, 15 และ 20% มีค่าระหว่าง 0.71 – 0.86 เท่า โดยไม่ต่างกันทางสถิติในทุกๆระดับ และเมื่อพิจารณาจากปัจจัยความเข้มข้นของ PEG 6000 พบว่า ยาสูบที่มียีน CyP เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม PEG 6000 ความเข้มข้นทุกระดับ จะมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักสดมากกว่ายาสูบปกติที่เลี้ยงบนอาหาร PEG 6000 ที่ความระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20% (Table 3) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทนทานต่อสภาวะขาดน้ำของยาสูบที่มียีน CyP ซึ่งสามารถทนได้ถึงระดับความเข้มข้น 20% ในขณะที่ยาสูบปกติทนได้เพียงระดับความเข้มข้น 5% เท่านั้น ส่วนการเจริญทางสัณฐานวิทยา รูปร่าง และสีใบ มีลักษณะที่สอดคล้องกับปริมาณน้ำหนักสด ที่เพิ่มขึ้น โดยยาสูบปกติไม่มียีน CyP เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี PEG 6000 ที่ระดับความเข้มข้น 10% ใบจะเริ่มเหลืองซีด และที่ระดับความเข้มข้น 15 – 20% จะแสดงให้เห็นถึงใบพืชที่มีลักษณะขาดน้ำอย่างเห็น ได้ชัดคือ ปลายใบ และขอบใบจะม้วนตัว ซึ่งเป็นลักษณะการปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ สีของใบเหลืองซีดแห้งกรอบ ในขณะที่ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP ใบยังคงเขียว และสามารถเติบโตได้ตามปกติ (Figure 11)

Table 3. Fresh weight increment (time) of non – transformed (non – GM) and transformed tobacco (GM) cultured on various concentrations of PEG 6000 after 3 weeks of culture.

PEG 6000 conc. (w/v) (A)	Fresh weight increment (time) (B)		A – Mean
	Non – GM	GM (CyP)	
0%	0.75a	0.71a	0.73
5%	0.60a	0.78a	0.69
10%	0.31b	0.77a	0.54
15%	0.33b	0.79a	0.56
20%	0.21b	0.86a	0.53
B – Mean	0.44	0.78	
% CV		23.1	

Means within the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level of DMRT

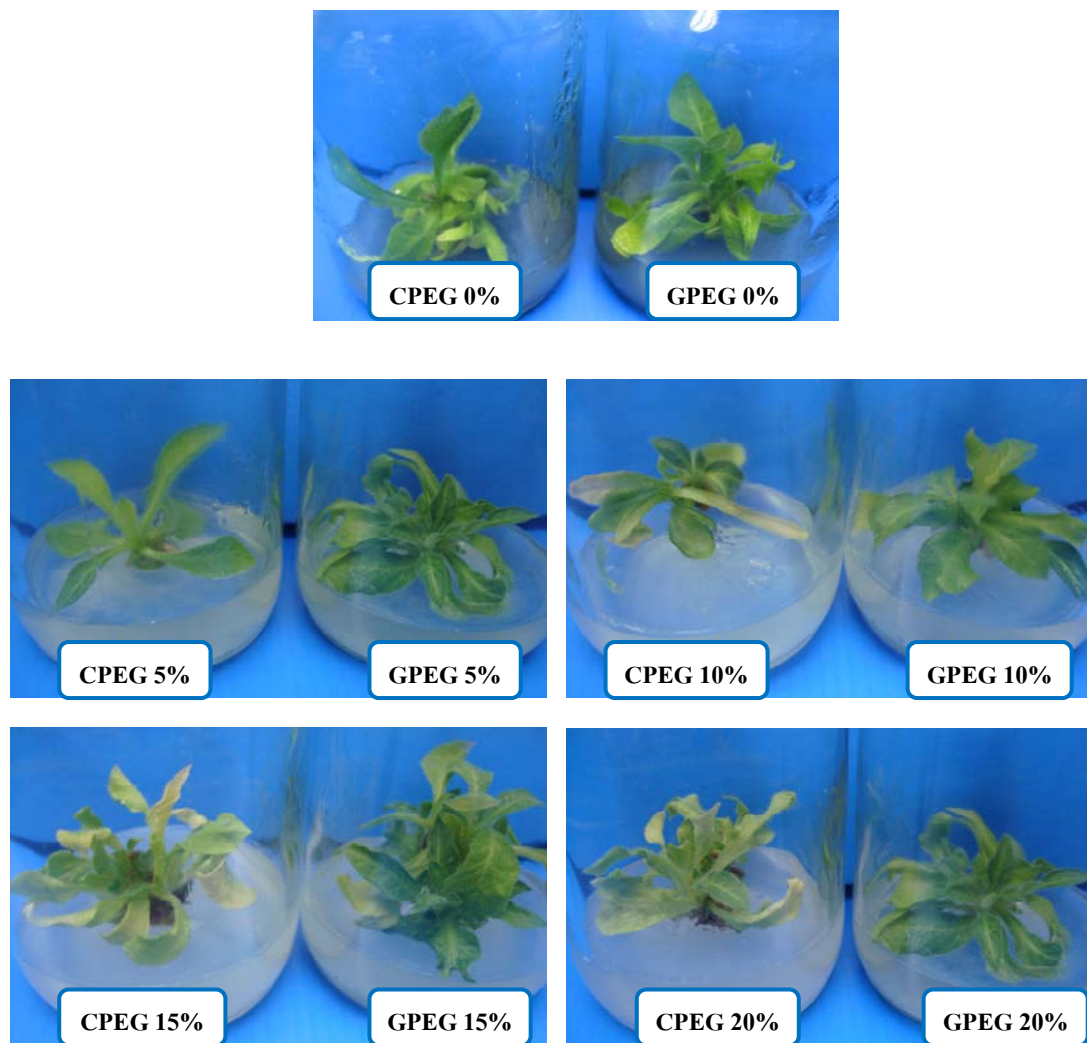


Figure 12. Growth of non – transformed tobacco (C) and transformed tobacco (G) on various concentration of PEG 6000 (0, 5, 10, 15 and 20% (w/v)) after 3 weeks of culture.

จากผลการทดลองดังกล่าว ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP สามารถทนทานต่อสภาวะเค็มของเกลือ (NaCl) ได้ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 และ 2.5% โดยยังคงมีอัตราการรอดชีวิต 50% ขึ้นไป และสามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ที่ระดับความเข้มข้น 15 – 20% ทั้งนี้ยีน CyP อาจมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ หรือโปรตีน ซึ่งทำให้พืชสามารถบรรเทาความเป็นพิษของเกลือ โดยการสร้างกลไกในลักษณะต่างๆ เช่น กลไกการหลีกเลี่ยง (avoidance mechanism) โดยหลีกเลี่ยงการสะสมเกลือในไซโตพลาสซึมจนถึงระดับที่เป็นพิษ หรือ สร้างระบบเอนไซม์ต่างๆ ที่มีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของเกลือสูง โดยการที่เอนไซม์บางชนิดยังคงมีกิจกรรมได้เป็นปกติ แม้จะได้รับอิทธิพลจากความเค็ม (ชาญวิทย์, 2537) หรือมีผลต่อการสร้างสารประกอบในโตรเจนและคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาล เพื่อลดค่าชลศักย์ (osmotic potential) ภายในเซลล์ และทำให้เกิดการออสโมซิสของน้ำกลับเข้ามาในเซลล์ (reverse osmosis) ให้มากขึ้น เพื่อชะลอการไม่ให้แรงดันเต่งลดลง ทำให้เซลล์รักษาสภาพเอาไว้ได้ (ชุมพล, 2555) อย่างไรก็ตามใน

พืชแต่ละชนิดหรือพืชชนิดเดียวกันแต่คนละสายพันธุ์ จะมีการแสดงออกของยีนที่อยู่ในสภาพเครียดแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นจะต้องศึกษากลไกการทำงานของยีน CyP ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนนี้ โดยละเอียดต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. การโคลนยีน CyP จากจีโนมกิดีเอ็นเอของข้าวฟ่างพันธุ์อุทอง 1 และสุพรรณบุรี 60 พบว่ายีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1062 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่ายีนที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) จำนวน 519 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ของยีน CyP จำนวน 172 amino acid และยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน CyP ที่พบในอ้อย และข้าวโพด โดยมีค่า % Max Identity เท่ากับ 91% และ 90% ตามลำดับ

2. การสร้างชุด Cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน CyP ขนาด 519 คู่เบส เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มินเตอร์ NOS ได้ พลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ pCAMBIA2300 – CyP มีขนาด ~ 10 กิโลเบส

3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน CyP ในระดับโปรตีน โดยการเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ขนาด ของ fusion protein จากเซลล์ *E. coli* ที่มี recombinant protein (pEcoli – CyP) พบว่ายีน CyP มีการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน และสังเคราะห์โปรตีนได้ปริมาณมากที่สุด เมื่อถูกชักนำด้วย 3mM IPTG เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และโปรตีนที่ได้มีขนาด ~ 18.4 kDa

4. การถ่ายฝากชุดยีน pCAMBIA2300 – CyP เข้าสู่ใบยาสูบ โดยการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่สามารถคัดเลือกต้นยาสูบบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin เข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร พบต้นยาสูบที่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไปได้ จำนวน 25 ต้น

5. การตรวจสอบการปรากฏของยีน CyP ในยาสูบ โดยใช้เทคนิค PCR พบต้นยาสูบที่มียีน CyP ทั้งหมด 10 ต้น คิดเป็นประสิทธิภาพในการถ่ายยีนได้ร้อยละ 40

6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน CyP ในยาสูบ โดยการทดสอบความทนทานต่อสภาวะเครียด ได้แก่ ความทนเค็มและความทนสภาวะขาดน้ำ พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน CyP มีความทนทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้ดีกว่าต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน CyP ที่ใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบ แสดงว่ายีน CyP ที่โคลนได้มีการแสดงออกในพืช

การนำไปใช้ประโยชน์ : ได้นำชุดยีน CyP ไปถ่ายฝากเข้าสู่ถั่วเหลืองเพื่อให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม ซึ่งขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการชักนำแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ สำหรับนำไปปลูกคัดเลือกต่อไป นอกจากนี้ยังมีการนำเทคโนโลยีการโคลนยีนมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาและโคลนยีนที่มีประโยชน์ในด้านอื่นๆ ได้สำเร็จ เช่น ยีน OsSKIPa ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมอีกยีนหนึ่ง และได้มีการนำยีน OsSKIPa ไปศึกษาการถ่ายฝากยีนเข้าสู่ถั่วเหลืองเพื่อให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม สำหรับนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อรองรับปัญหาอันเกิดจากสภาวะโลกร้อนได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวฟ่าง ดร.ศรีเมฆ ชาวโพพวง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา และอนุเคราะห์ plant expression vector (pCAMBIA2300) สำหรับใช้ในการทดลองวิจัย ขอขอบคุณ คุณสุทวัฒน์ สิ้นธิ์โรจน์ และ คุณขวัญจิต ชื่นปั้นแดง ผู้ช่วยนักวิจัย สำหรับความช่วยเหลืองานวิจัยด้านต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

จารุจินต์ นกิตะภักดิ์, 2554. *เอลนินโญ/ลานินญา*. (ออนไลน์). แหล่งที่มา :

http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=86&i2=6, 12 ธันวาคม 2554.

เพิ่มพูน กิรติภักดิ์. 2527. ดินภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. คณะเกษตรศาสตร์ : มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 250 น.

ชาญวิทย์ ม่วงมิตร. 2537. การชักนำให้เกิดพันธุ์อ้อยทนเค็มโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 69 น.

ชุมพล คุณวาศี. 2555. เอกสารประกอบการสอนวิชา 2303 107 General Biology ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : <http://www.sc.chula.ac.th/botany/eClass/2303107/response49.pdf>, 27 ธันวาคม 2556.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554. *ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร*. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/main.php?filename=agri_production, 12 ธันวาคม 2554.

BioLabs, 1993. Instruction Manual : Protein Fusion & Purification System ; Expression and Purification of Protein from Cloned Genes. Mississauga, Ontario, L4V1H8, Canada. 37 p.

Gasser, C.S., D.A. Gunning, K.A. Budelier and S.M. Brown. 1990. Structure and expression of cytosolic cyclophilin peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of higher-plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 87: 9519 – 9523.

Godoy, A.V., A.S. Lazzaro, C.A. Casalongue and B. San Segundo. 2000. Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. *Plant Sci*. 152: 123 – 124.

Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227 : 1229 – 1231.

Kong, H.Y., S.C. Lee and B.K. Hwang. 2001. Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions. *Physiol Mol Plant Pathol*. 59: 189 – 199.

- Lippuner, V., I.T. Chou, S.V. Scott, W.F. Ettinger, S.M. Theg and C.S. Gasser. 1994. Cloning and characterisation of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 269 : 7863–7868.
- Liu, J., C.M. Chen and C.T. Walsh. 1991. Human and *Escherichia coli* cyclophilins: Sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry*. 30 : 2306–2310.
- Luan, S., M.W. Albers and S.L. Schreiber. 1994. Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher-plant. *Proc Natl Acad Sci*. 91: 984 – 988.
- Marivet, J., P. Frendo and G. Burkard. 1992. Effects of abiotic stresses on cyclophilin gene-expression in maize and bean and sequence analysis of cyclophilin cDNA. *Plant Sci*. 84: 171-178.
- Marivet, J., M. Margispinheiro, P. Frendo and G. Burkard. 1994. Bean cyclophilin gene-expression during plant development and stress conditions. *Plant Mol Biol*. 26: 1181-1189.
- Marivet, J., P. Frendo and G. Burkard. 1995. DNA-sequence analysis of a cyclophilin gene from maize-developmental expression and regulation by salicylic acid. *Mol Gen Genet*. 247 : 222-228.
- Miki, B and S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. of Biology*. 107 : 193 – 232.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*. 15 : 473 – 497.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 545 p.
- Sharma, S.D. and P. Singh. 2003. Effect of water stress on expression of a 20 kD cyclophilin-like protein in drought susceptible and tolerant cultivars of Sorghum. *J. Plant Biochem Biot*. 12 : 77 – 80.
- Walkerpeach, C. R. and J. Velten. 1994. Agrobacterium-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems In: S. B. Gelvin and R. A. Schilperoort (eds). *Plant Molecular Biology Manual*, 2nd edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. B1: 1-19.
- Watad, A.A., D. Swartzberg, R.A. Bressan, S. Izaher and P.M. Hasegawa. 1991. Stability of salt tolerance at the cell level after regeneration of plants from a salt tolerant tobacco cell line. *Physiol. Plant*. 83: 307 – 313.

Sorghum bicolor cyclophilin (Cyp) gene, complete cds

GenBank: EU722309.1

Go to:

LOCUS EU722309 1062 bp DNA linear PLN 09-JUN-2008
 DEFINITION Sorghum bicolor cyclophilin (Cyp) gene, complete cds.
 ACCESSION EU722309
 VERSION EU722309.1 GI:189345345
 KEYWORDS .
 SOURCE Sorghum bicolor (sorghum)
 ORGANISM [Sorghum bicolor](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
 Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; PACMAD
 clade; Panicoideae; Andropogoneae; Sorghum.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1062)
 AUTHORS Suphawadee,N., Payungsak,R., Karsedit,D., Chayanit,D. and
 Hathairat,U.
 TITLE Cloning of a cyclophilin gene from Sorghum bicolor
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1062)
 AUTHORS Suphawadee,N., Payungsak,R., Karsedit,D., Chayanit,D. and
 Hathairat,U.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-MAY-2008) Biotechnology Technology Research and
 Development Office, Department of Agriculture, Rangsit-Nakhonnayok
 Road, Thunyaburi, Pathumthani 12110, Thailand
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..1062
 /organism="Sorghum bicolor"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:4558"
 gene <131..>649
 /gene="Cyp"
 mRNA <131..>649
 /gene="Cyp"
 /product="cyclophilin"
 CDS 131..649
 /gene="Cyp"
 /note="peptidyl-propyl cis-trans isomerase"
 /codon_start=1
 /product="cyclophilin"
 /protein_id="ACD93011.1"
 /db_xref="GI:189345346"
 /translation="MANPRVFFDMTVGGAAAGRIVMELYANEVPKTAENFRALCTGEK
 GVGKSGKPLHYKGSTFHRVIPQFMCQGGDFTRGNGTGGESIYGDKFPDEKFVRNHTAP
 GVLSMANAGPNTNGSQFFICTVDTPWLDGKHVVFQVVEGMDVVKAIEKVGSRSRGSTS
 KEVKIADCGQLS"
 ORIGIN
 1 tccggctatt ttaccgcacc agttctccct ccaccagatc agatcagatc acagaacgca
 61 acagccgaag gaaaaatttc cccccaacca aaaaccctct ctcccaaacc ctagctacct
 121 tcggatcccc atggcggaacc cgcgcgtctt ctccgacatg acgggtcggcg gcgcggcggc
 181 ggggcgatc gtgatggagc tgtacgcgaa cgaggtgccc aagacggccg agaacttccg
 241 cgcgctgtgc acgggcgaga agggcgtggg gaagtccggg aagccgctcc actacaaggg
 301 ctccaccttc caccgcgtca tcccgagtt catgtgccag ggccggcgact tcaccggggg
 361 caacgggacc ggaggcgagt ccatctacgg cgacaagttc cccgacgaga agttcgtgcg
 421 caaccacacg gccccgggg tgctctccat ggccaacgcc gggcccaaca ccaacggctc
 481 ccagttcttc atctgcaccg tcgatacccc ctggctcgac ggcaagcacg tcgtctttgg
 541 ccaggtcgtc gagggcatgg acgtcgtcaa ggccatcgag aagggtcgat cccgcagcgg
 601 atccaccttc aaggaggatc agatcgctga ctgcggccag ctcagctaga tcgttggtct
 661 ggtctgcccc tccgccctcc ctcccgctcat cgtccactcc gcctgcgtcc cgtcccgttt
 721 ccggtttgct tcgatctgaa taagatgatg gtgatctgag tgggtggtctg agttgagtcg
 781 tttatttatc atgtgcgtct gtctgtgtcg ctgcgggttt aatctagcgg tgtagggtgtg
 841 gatctccgaa tcccatggcg cctctgctta ctctgtgttt catcaccagt tatatgttat
 901 gagatccagg ataatgcatt aatgctatga gaactgagat tcggtttcat gcttcttgtt
 961 ccatgtgccg tgtcatgtgc gtctgtgtcc attgcaagtt cggaccccaa aatgattttg
 1021 attgtcaata tgtaaatgtg aactgccaaag catggatcgc cc

Appendix 1. Sequence of the gene Cyclophilin (CyP) submit to the database of GenBank

accession no. EU722309. (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html)