การตรวจสอบการผลิตโปรตีนชนิดใหม่ของมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน

Evaluation of Novel Protein Expressed in Transgenic Papaya (Khak Nual) Resistant to *Papaya Ringspot Virus* (PRSV)

ชาลินี คงสวัสดิ์[1,2,3], สุธาทิพย์ กิตติเสนาชัย[3], กษมา ชูสังข์[1,2], น้ำทิพย์ พิรณฤทธิ์[3], สิทธิรักษ์ รอยตระกูล[3], ปาริชาติ เบิร์นส์[3], วิชัย โฆสิตรัตน[1,2,4]

Chalinee Kongsawat[1,2], Suthathip Kittisenachai[3], Kasama Chusaeng[1,2], Namthip Phironrit[3], Sittiruk Roytrakul[3], Parichart Burns[3], Wichai Kositratana[1,2,4]

Abstract

The expression of Papaya Ringspot Virus Coat Protein (PRSV-CP) and neomycin phosphotransferase (NPTII) protein in transgenic papayas (Khak Nual 116/5 R_4) resistant to papaya ringspot virus (PRSV) were determined and use as a part of substantial equivalence determination in biosafety assessment. Proteins extracted from seedling leaf, mature leaf, mature flower and mature fruit of Khak Nual Papaya (*Carica papaya* Lin.) were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting. The expression of NPTII protein was only detected from transgenic papaya and mainly in leaf tissue. However, PRSV-CP protein was not detected which may due to the post-transcriptional gene silencing process or RNAi mechanism of this gene.

Keywords: transgenic papaya, biosafety assessment, western blot

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
Center for Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

[3] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย คลองหลวง ปทุมธานี 12120
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand Science Park, Klongluang, Pathumthani, 12120, Thailand

[4] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

รับเรื่อง: ธันวาคม 2552

* Corresponding author: agrwcl@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างวงแหวนมะละกอ (PRSV-CP) และ โปรตีน neomycin phosphotransferase (NPTII) ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์แขกนวล 116/5 รุ่น R_4 เพื่อใช้เป็นส่วนหนึ่งของการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพตามหลักการเทียบเท่า (substantial equivalence) ด้วยการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนจากยีนที่ถ่ายเข้าสู่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อต้านทานต่อไวรัสใบด่างวงแหวน โดยตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot จากตัวอย่าง ใบอ่อน ใบแก่ ดอก ผล พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนต้านสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่เกิดจากแสดงออกของยีน *nptII* ที่ถูกถ่ายเข้าเซลล์เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวคัดเลือกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม โดยพบในปริมาณที่มากในส่วนของเนื้อเยื่อใบ แต่ตรวจไม่พบการแสดงออกของโปรตีน PRSV-CP อันอาจเป็นผลเนื่องจากกลไก post-transcriptional gene silencing หรือ RNA interference (RNAi)

คำนำ

มะละกอ (*Carica papaya* Lin.) มีถิ่นกำเนิดจากเขตร้อนของทวีปอเมริกา ปัจจุบันมีปลูกทั่วไปในประเทศเขตร้อน สำหรับประเทศไทย มะละกอถือเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง (Subhadrabandhu และ Nontaswatsri, 1997) แต่ประสบปัญหาเรื่องการระบาดของโรคไวรัสใบด่างวงแหวน (*Papaya Ringspot Virus*, PRSV) ที่มีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ ซึ่งก่อความเสียหายให้กับมะละกอเป็นอย่างยิ่ง (รัชนี, 2529) ทั้งนี้ได้มีความพยายามหาวิธีป้องกันกำจัดเชื้อ *PRSV* ด้วยเทคนิคและวิธีการต่างๆ แต่วิธีที่ประสบความสำเร็จมากที่สุด คือ การพัฒนาพันธุ์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ให้ต้านทานไวรัส โดยการนำยีนห่อหุ้มไวรัส (Coat protein gene, CP gene) ของเชื้อ PRSV (PRSV-*CP*) ถ่ายฝากเข้าไปในเซลล์ของมะละกอ (Cai *et al*., 1999) และสำหรับประเทศไทยได้มีการดำเนินการ เพื่อพัฒนาพันธุ์มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมให้ต้านทานต่อไวรัสใบด่างวงแหวนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 เป็นต้นมา โดยหน่วยงานของรัฐ ได้แก่ กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยมหิดล ปัจจุบันมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนถือเป็นการดัดแปลงพันธุกรรมที่การพัฒนามากที่สุดของประเทศไทย และนำมาใช้เป็นต้นแบบของการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ(Technical Biosafety Committee, 2008)

การประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ ถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ที่จะต้องดำเนินการก่อนจะใช้ประโยชน์จากพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ (Neal *et al*., 2000) โดยจะต้องทำการทดสอบและประเมินตามหลักมาตรฐานสากลใน 2 ด้าน ได้แก่ ด้านสิ่งแวดล้อมและด้านความปลอดภัยของผู้บริโภค ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ใดๆ ที่แสดงว่าพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ และใช้บริโภคกันอยู่มีผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ ที่แตกต่างไปจากพืชชนิดเดียวกันที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านความเป็นพิษเฉียบพลัน หรือผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อมีการจัดการหลังการอนุญาตอย่างเหมาะสม (ICTSD, 2007)

หลักการสำคัญที่ได้ยอมรับ โดยนานาประเทศสำหรับการประเมินความปลอดภัย ต่อการบริโภคพืชดัดแปลงพันธุกรรม คือ หลักการเทียบเท่า (substantial equivalence) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างคุณสมบัติของพืชดัดแปลงพันธุกรรมกับพืชชนิดเดียวกัน ที่ไม่ได้ดัดแปลงพันธุกรรม หรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า พืชดั้งเดิมคู่เปรียบ (conventional counterpart) (Persley and Siedow, 1999) โดยสิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณา คือ โปรตีนใหม่ที่เกิดจากการแสดงออกของยีนที่สอดแทรกเข้า

ไปใหม่ในพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Delaney *et al*., 2008) ซึ่งหากมีการสร้างโปรตีนใหม่เกิดขึ้น โปรตีนเหล่านั้นจะต้องได้รับการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ โดยที่ศักยภาพในการก่อภูมิแพ้ของโปรตีนใหม่ เป็นประเด็นสำคัญประการหนึ่งที่ต้องได้รับการประเมิน ซึ่งมีประเด็นสำคัญที่ต้องพิจารณา ได้แก่ แหล่งที่มาของยีนที่แสดงออก ความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนใหม่ กับสารก่อภูมิแพ้ ปฏิกิริยาของโปรตีนใหม่กับ IgE antibody จากเซรั่มของผู้เป็นภูมิแพ้ และความคงตัวของโปรตีนใหม่ในน้ำย่อย (Taylor, 2002) หรือหากโปรตีนที่แสดงออกจากยีนที่สอดแทรกเข้าไปนั้น ไม่ใช่โปรตีนใหม่ แต่เป็นโปรตีนที่เคยมีการศึกษาและใช้ประโยชน์มาแล้ว รวมถึงเป็นโปรตีนที่มีประวัติด้านความปลอดภัยในการใช้ จนเป็นที่ยอมรับแล้ว สามารถใช้ข้อมูลเหล่านั้นเพื่อประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ ด้านอาหารของพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ โดยไม่จำเป็นต้องทำการศึกษาอีกครั้ง

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน จากยีนที่ถ่ายฝากเข้าไปในมะละกอแขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่นที่ R_4 ด้วยเครื่องยิงอนุภาค (microprojectile bombardment) โดยได้ถ่ายพลาสมิด p2CMCP ที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อไวรัสใบด่างวงแหวน (PRSV-*CP*) สายพันธุ์เชียงใหม่ และมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (neomycin phosphotransferase II gene, *nptII*) เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก (marker gene) โดยกลุ่มนักวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และนักวิจัยของกลุ่มวิจัยด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2546) เพื่อใช้เป็นข้อมูลส่วนหนึ่งในการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพด้านอาหารของมะละกอดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง

มะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์แขกนวล 116/5 รุ่น R_4 ซึ่งได้จากการถ่ายฝากยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PRSV (PRSV-*CP*) สายพันธุ์เชียงใหม่ (GenBank Accession No.DQ085856) เข้าสู่ เนื้อเยื่อคัภพะ (somatic embryo) โดยวิธียิงอนุภาค โดยใช้พลาสมิด p2CMCP และมี *nptII* gene เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก (Figure 1) (นุชนาถ และคณะ, 2546) ปลูกมะละกอในกระถางพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร ประกอบด้วยดินผสมภายใต้สภาพโรงเรือนตาข่ายปลูกพืชทดลองที่ใช้ตาข่ายขนาด 32 Mesh (32 Mesh Netted House)

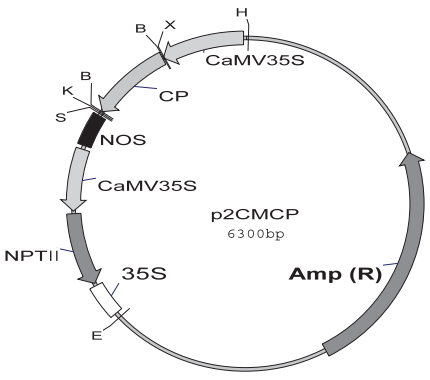

Figure 1 Chimeric construction of Plasmid (p2CMCP) used in this study containing the coat protein(*CP*) gene of *Papaya Ringspot Virus* (PRSV) isolate Chiangmai and neomycin phosphotransferase (*nptII*) which used as a selectable marker gene (นุชนาถ และคณะ, 2546)

การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อของมะละกอ

นำตัวอย่างใบต้นกล้า อายุ 60 วัน และตัวอย่างใบดอก และผลของมะละกออายุ 270 วัน ของมะละกอพันธุ์แขกนวลดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอแขกนวลสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่ละตัวอย่างชั่งน้ำหนัก 0.5 กรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว และสกัดโปรตีนด้วยสารละลาย extraction buffer (10% TCA, 0.07% 2-mercaptoethanol ใน acetone) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย acetone (0.07% 2-mercaptoethanol ใน acetone) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง(Damerval *et al*., 1986) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry *et al*. (1951)

การตรวจวิเคราะห์โปรตีนที่แสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการแยกโปรตีนใน 15% SDS-PAGE โดยใช้ตัวอย่างโปรตีนจากมะละกอ จำนวน 5 ไมโครกรัม แยกด้วยกระแสไฟตรงที่ความต่างศักย์คงที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, 100 โวลต์ 2 ชั่วโมง 30 นาที และ 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น ย้อมเจลด้วยวิธีซิลเวอร์ โดยวิธีของ Gharahdaghi *et al*. (1999) โดยแช่ใน fixing solution (40% methanol และ 10% acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ fixing solution (30% methanol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ย้ายมาแช่ในสารละลาย 0.02% w/v sodium thiosulfate เป็นเวลา 3 นาที แล้ว ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แช่ในสารละลาย silver nitrate (0.1% silver nitrate) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแช่ใน developing solution (3% sodium carbonate และ 0.05% formaldehyde) จนปรากฏแถบของโปรตีนบนเจลชัดเจน จึงหยุดปฏิกิยาด้วยสารละลาย 1% acetic acid นำไปตรวจวิเคราะห์ดูขนาดและปริมาณของโปรตีนที่แยกได้บนเจลเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (PageRuler™, Fermentas)

การตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis

นำแผ่นเจลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE มาทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยกระแสไฟฟ้า โดยเครื่อง TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, California, USA) กระแสไฟฟ้าตรงความต่างศักย์คงที่ 70 โวลต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาโปรตีนเป้าหมายโดยวิธี Western blot analysis (Sambrook *et al*., 1989) นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่มีโปรตีนตรึงอยู่ไปแช่ใน TBST buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) ที่เติม 5% skim milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST bufferเป็นเวลา 3 นาทีนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสตรวจหาโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส(coat protein) โดยนำไปแช่ใน TBST buffer ที่มีแอนติซีรัมต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส (PRSV-CP) ที่เจือจาง 1:1,000 หรือตรวจหาโปรตีน neomycin phospho transferase ในสารละลายที่มีแอนติซีรัมต่อโปรตีน NPTII ที่เจือจาง 1:1,000เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วแช่ใน TBST buffer ที่มี alkaline phosphase conjugated goat anti-rabbit IgG (Zymed Laboratories, California, USA) ที่เจือจาง 1:10,000 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 10x Nitroblue tetrazolium(NBT) 1 มิลลิลิตรและ 10x 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate(BCIP) 1 มิลลิลิตร (Zymed Laboratories, California, USA) เจือจางในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสี จนสังเกตเห็นการเกิดสีที่แถบโปรตีนชัดเจนแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น วัดค่าความเข้มของแถบสีโปรตีนด้วยเครื่อง densitometer GS-710 (Bio-Rad Laboratories, California, USA)

ผลการทดลอง

การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

เมื่อปลูกมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R_4 และมะละกอพันธุ์เดิม ภายในสภาวะโรงเรือนตาข่ายปลูกพืชทดลอง เก็บตัวอย่างใบของต้นกล้า อายุ 60 วัน และเก็บตัวอย่างของใบ ดอก และผลของมะละกออายุ 270 วัน มาตรวจสอบแยกโปรตีนตามขนาดด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมสีด้วยเทคนิค silver staining ตามวิธีของ Gharahdaghi *et al*. (1999) พบว่าสามารถตรวจพบโปรตีนขนาดประมาณ 36 และ 26 กิโลดาลตัน (Figure 2) ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดมวลของโปรตีน PRSV-CP และโปรตีน NPTII ดังที่มีรายงานโดย Wang *et al.* (1994) และ Cucu *et al.* (2002) ตามลำดับ

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสใบด่างวงแหวน(PRSV-*CP*) และโปรตีน NPTII ด้วยวิธี Western blot analysis

การตรวจสอบชนิดของโปรตีนที่พบ ด้วยเทคนิค Western blot analysis โดยใช้แอนติซีรัมต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส (PRSV-CP) และแอนติซีรัมต่อโปรตีน neomycin phosphotransferase ซึ่งสามารถจับกับโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV และโปรตีน neomycin phosphotransferase ได้ตามลำดับ พบว่า ในทุกตัวอย่างของทั้งมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมและมะละกอพันธุ์เดิม ไม่พบแถบโปรตีนขนาด 36 กิโลดาลตันของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV (Figure 3)

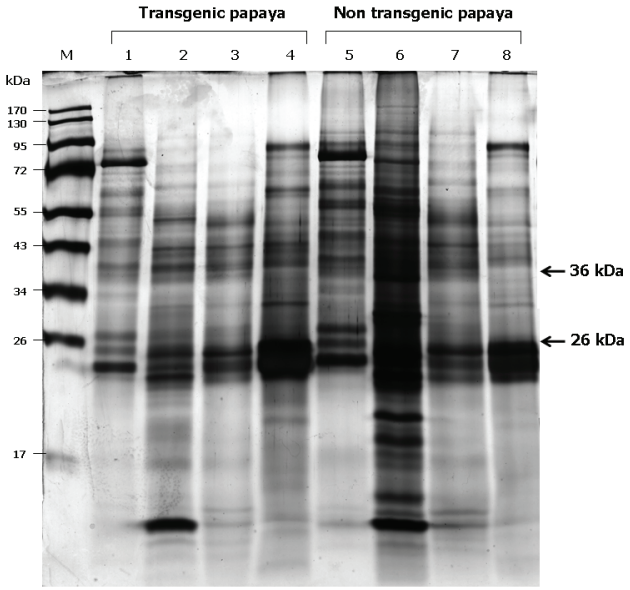

Figure 2 The SDS-PAGE pattern of protein from leave, flower and mature fruit of transgenic papaya(Khak Nual 116/5 R_4) and non transgenic papaya (Khak Nual); M = Pre-stained Protein Ladder #SM0671, PageRuler™ (Fermentas), 1 = mature fruit of transgenic papaya in mature stage (270 days), 2 = leave of transgenic papaya in seedling stage (60 days), 3 = leave of transgenic papaya in mature stage (270 days), 4 = flower of transgenic papaya in mature stage (270 days), 5 = mature fruit of non transgenic papaya in mature stage (270 days), 6 = leave of non transgenic papaya in seedling stage (60 days), 7 = leave of non transgenic papaya in mature stage (270 days), 8 = flower of non transgenic papaya in mature stage (270 days)

สำหรับการตรวจสอบโปรตีน neomycin phospho transferase พบว่า ในทุกตัวอย่างของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R_4 ตรวจพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 26 กิโลดาล ตันของโปรตีน neomycin phosphotransferase แต่ไม่พบโปรตีนดังกล่าวในตัวอย่างของมะละกอพันธุ์เดิม เมื่อตรวจสอบความหนาแน่นของแถบโปรตีนที่ปรากฏด้วยเครื่อง densitometer พบการแสดงออกของโปรตีน neomycin phosphotransferase มากที่สุดในตัวอย่างใบในระยะต้นกล้า รองลงมาได้แก่ ในตัวอย่างใบระยะให้ผล ผลแก่ และดอก ตามลำดับ(Figure 4) โดยในใบมีการแสดงออกของโปรตีนนี้มากกว่าในผลประมาณ 15 เท่า แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนนี้ในส่วนต่างๆ ของมะละกอพันธุ์เดิม

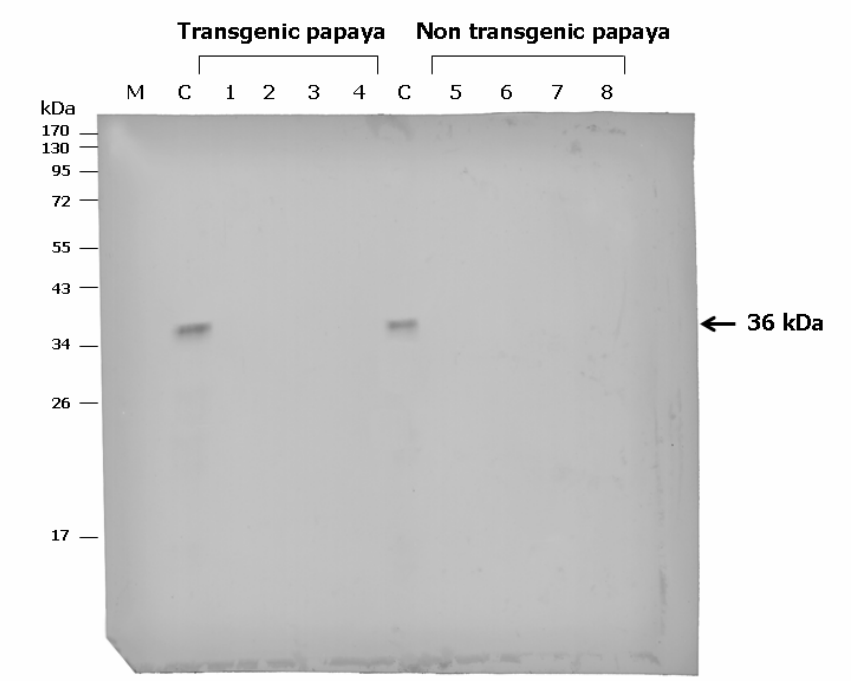

Figure 3 Western blot detection of Papaya ringspot virus (PRSV) coat protein from leave, flower and mature fruit of transgenic papaya (Khak Nual 116/5 R_4) and non transgenic papaya (Khak Nual), M = Pre-stained Protein Ladder #SM0671, PageRuler™ (Fermentas), ช่อง C = positive control, protein from PRSV-infected papaya leaf, 1 = mature fruit of transgenic papaya in mature stage (270 days), 2 = leave of transgenic papaya in seedling stage (60 days), 3 = leave of transgenic papaya in mature stage (270 days), 4 = flower of transgenic papaya in mature stage (270 days), 5 = mature fruit of non transgenic papaya in mature stage (270 days), 6 = leave of non transgenic papaya in seedling stage (60 days), 7 = leave of non transgenic papaya in mature stage (270 days), 8 = flower of non transgenic papaya in mature stage (270 days)

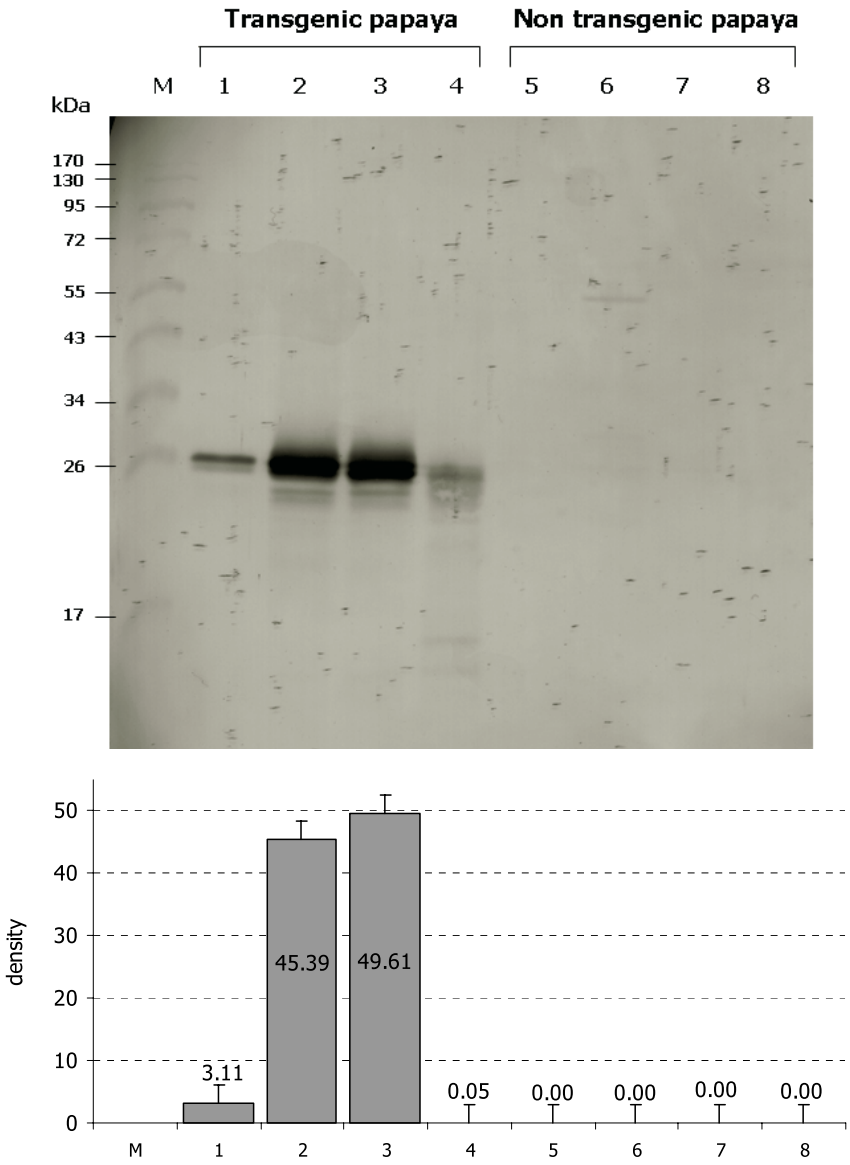

Figure 4 Western blot detection of neomycin phosphotransferase (NPT II) from leave, flower and mature fruit of transgenic papaya (Khak Nual 116/5 R_4) and non transgenic papaya (Khak Nual), M = Pre-stained Protein Ladder #SM0671, PageRuler™ (Fermentas), 1 = mature fruit of transgenic papaya in mature stage (270 days), 2 = leave of transgenic papaya in seedling stage (60 days), 3 = leave of transgenic papaya in mature stage (270 days), 4 = flower of transgenic papaya in mature stage (270 days), 5 = mature fruit of non transgenic papaya in mature stage (270 days), 6 = leave of non transgenic papaya in seedling stage (60 days), 7 = leave of non transgenic papaya in mature stage (270 days), 8 = flower of non transgenic papaya in mature stage (270 days)

วิจารณ์

การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส (PRSV-CP) และโปรตีน neomycin phosphotransferase ที่เกิดจากยีนที่ถ่ายฝากเข้าไปในโครโมโซมของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แขกนวล 116/5 รุ่น R_4 ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ในขณะที่ตัวอย่างที่เป็น positive control ที่ได้จากใบมะละกอพันธุ์เดิมที่ติดไวรัส ตรวจพบการแสดงออกเป็นโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 – 36 กิโลดาลตัน ซึ่งตรงกับขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ที่รายงานโดย Hema และ Prasad (2004) แสดงว่าเทคนิค Western blot ที่ใช้ในการวิจัยนี้มีประสิทธิภาพสามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ได้ แต่มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แขกนวล 116/5 รุ่น R_4 ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ในทุกส่วนของต้น ทั้งใบอ่อน ใบแก่ ดอก ผลและราก

ทั้งนี้มะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานโรคใบด่างวงแหวน สายพันธุ์ 116/5 รุ่น R_4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ Phironrit *et al*. (2009) รายงานการตรวจสอบการสอดแทรกของยีน PRSV-CP โดยวิธี Southern blot พบว่า มะละกอมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส PRSV และพบว่ามียีน PRSV-CP สอดแทรกอยู่บนโครโมโซมของมะละกอ นอกจากนั้น Chowpongpang *et al.* (2002) รายงานว่า โดยวิธี Northern blot ไม่พบสาย mRNA ที่มีขนาดเต็มสาย (full length mRNA) แต่พบ small interference RNA(siRNA) ขนาดเล็กประมาณ 21–24 เบส และเมื่อทำการตรวจสอบ mRNA ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ด้วยเทคนิค RT-PCR สามารถตรวจพบ mRNA ที่มีขนาดเต็มสายได้ (Warin *et al*., 2007) จากการศึกษาทั้งหมดแสดงว่า ยีนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV มีการสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืชแล้ว และยังสามารถแสดงออกที่ระบบ mRNA ได้ แต่ตรวจไม่พบการแสดงออกเป็นโปรตีน อันเป็นผลมาจากกลไก post-transcriptional gene silencing หรือ RNA interference(RNAi) ซึ่งเป็นกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน ซึ่งเกิดขึ้นเองในธรรมชาติ โดย RNA duplex ที่เกิดขึ้นจะถูกจับและตัดโดยเอนไซม์ Dicer ให้เป็นอาร์เอ็นเอนสายคู่เส้นสั้น ขนาดประมาณ 21-25 คู่เบส ที่เรียกว่า siRNA (small interferening RNA) จากนั้นโมเลกุลนี้จะถูกจับด้วย RISC (RNA-induced silencing complex) และทำให้เกิดโครงสร้างใหม่ที่ประกอบด้วย RISC และ siRNA สายเดี่ยว (Baulcombe, 2004) เมื่อมี mRNA ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายของเดิมเข้าสู่เซลล์ต้นพืชในครั้งต่อไป โครงสร้างนี้จะทำหน้าที่ตัด mRNA นั้น (Waterhouse *et al*., 1998) ดังนั้น ต้นมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม จะไม่มีการแสดงออกของโปรตีน PRSV แต่ยังมีความต้านทานต่อไวรัส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nomura *et al*. (2004) ที่ทำการทดลอง การแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มไวรัส *Turnip mosaic virus* (TuMV) ใน *Arabidopsis thaliana* พบว่า *A. thaliana* ที่ได้รับการถ่ายยีน TuMV-CP gene เมื่อตรวจสอบการสอดแทรกของดีเอ็นเอในพืช ด้วยวิธี Southern blot สามารถตรวจพบยีน TuMV-CP แต่เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มไวรัส ด้วยวิธี Western blot กลับไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบการเกิด small interference RNA (siRNA) ด้วยวิธี Northern blot พบ siRNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ TuMV-CP gene เป็นผลมาจากกลไก RNAi เช่นเดียวกัน ดังนั้น การตรวจไม่พบการแสดงออกของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV อาจมีสาเหตุมาจากกลไก RNAi ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ดีการตรวจไม่พบการแสดงออกยังสามารถเกิดจากสาเหตุอื่น ได้แก่ โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ที่มีเกิดการย่อยสลาย (protein degradation) หรือโปรตีนมีปริมาณที่ต่ำกว่า 0.5 ไมโครกรัมซึ่งต่ำกว่า

พิกัดความไว (sensitivity) ของเทคนิค Western blot ปกติจะสามารถตรวจจับได้ (Hames, 2002)

ส่วนการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *nptII* ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แขกนวล 116/5 รุ่น R_4 สามารถตรวจพบโปรตีนนี้ในทุกส่วนของพืชดัดแปลงพันธุกรรม สอดคล้องกับการศึกษาของ Kositratana *et al*. (2007) ซึ่งพบว่ามะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แขกนวล 116/5 รุ่น R_4 มีการสอดแทรกยีน *nptII* ในโครโมโซม โดยสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค Polymerease chain reaction (PCR) และสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีน พบว่า โปรตีน NPTII มีการแสดงออกมากที่สุดในเนื้อเยื่อของส่วนใบระยะให้ผล รองลงมาได้แก่ ในใบระยะต้นกล้า ผล และดอก ตามลำดับ

ดังนั้นในการพิจารณาถึงความปลอดภัย ของมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนสายพันธุ์แขกนวล 116/5 รุ่น R_4 โดยการตรวจสอบโปรตีนชนิดใหม่ที่เกิดจากการแสดงออกของยีน 2 ชนิด ได้แก่ ยีน PRSV-CP และยีน *nptII* ที่ถ่ายฝากเข้าไปในโครโมโซมมะละกอ พบว่า ไม่มีการผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส PRSV ในขณะที่ตรวจพบการผลิตโปรตีน neomycin phosphotransferase ในทุกส่วนของเนื้อเยื่อมะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งวิธี Western blot เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจสอบโปรตีนเป้าหมาย โดยหากพบการแสดงออกของโปรตีนจากยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป จะต้องนำมาพิจารณาถึงความปลอดภัยของโปรตีนชนิดนั้น สำหรับโปรตีน NPTII ที่พบแสดงออกในการวิจัยครั้งนี้ มีการศึกษาข้อมูลโดยสำนักงานความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority, 2007) และได้รับรองให้เป็นยีนต้านทานสารปฏิชีวนะกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ โดยจะพบยีนนี้ในแบคทีเรียที่อยู่ในดินทั่วไป และสารปฏิชีวนะชนิดนี้ ไม่ได้มีการใช้รักษาโรคของมนุษย์อย่างแพร่หลายเหมือนในอดีตแล้ว จึงมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและการบริโภค

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี(สบว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่สนับสนุนงบประมาณบางส่วนในการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้งบประมาณในการสนับสนุนการวิจัยในโครงการ BT-B-01-PG-11-4910

เอกสารอ้างอิง

นุชนาถ วารินทร์ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง อัญจนา บุญชด กนกวรรณ รมยานนท์ ราตรี รอดอารีย์ วิชัย โฆสิตรัตน และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2546. มะละกอพันธุ์ใหม่ต้านทานไวรัสใบด่างวงแหวนมะละกอ ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 14 ,3–7 กุมภาพันธ์ 2546 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ หน้า 539 – 546.

รัชนี นิมมานพัชรินทร์. 2529. การเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ เซรุ่มวิทยา และโครงสร้างอนุภาคของไวรัสโรคจุดวงแหวนของมะละกอ.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2546. การวิจัยพัฒนามะละกอดัดแปลงพันธุกรรม ของประเทศไทย. เอกสารประกอบการสัมมนาเรื่อง การวิจัย พัฒนา และทดสอบความปลอดภัยมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมในประเทศไทย. 23 สิงหาคม 2547 ณ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จ.ปทุมธานี. 10 น.

Baulcombe, D.C. 2004. Review article RNA silencing in plants. Nature 431: 356-363.

Cai, W.Q., C. Gonsalves, P. Tennant, G. Fermin, M. Souza, N. Sarindu, F.J. Jan, H.Y. Zhu and D. Gonsalves. 1999. A protocol for efficient transformation and regeneration of *Carica papaya* L. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant. 35:61–69.

Chowpongpang, S., N. Warin, A. Bhunchoth, K. Romayanon, R. Rodaree, W. Kositratana and S. Attathom. 2002. Thai transgenic papaya protects PRSV infection to different geographical isolates. The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease. November 5-8, 2002. The Imperial Mae Ping Hotel Chiang Mai, Thailand. p.131.

Cucu, N., G. Negoianu-tenea and L. Gavrila. 2002. Genetically modified medicinal plants II. Transfer and expression of a marker kanamycine resistance gene in *Atropa belladonna* plants. Roumanian Biotechnology Letter. 7:869–874.

Damerval, C., D. de Vienne, M. Zivy, H. Thiellement. 1986. The technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis. 7:52-54.

Delaney B., J.D. Astwood, H. Cunny, R.E. Conn, C. Herouet-Guicheney, S. Macintosh, L.S. Meyer, L. Privalle, Y. Gao and J. Mattsson. 2008. Levine and ILSI International Food Biotechnology Committee Task Force on Protein Safety, Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. Food and Chemical Toxicology 46:S71–S97.

European Food Safety Authority (EFSA). 2007. Statement of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safe use of the *npt*II antibiotic resistance marker gene in genetically modified plants. Available from URL: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620775641.htm. 29 October 2009.

Gharahdaghi, F., C.R. Weinberg, D.A. Meagher, B.S. Imai and S.M. Mische. 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. Electrophoresis 20:601-605.

Hames, B.D. 2002. Gel electrophoresis of protein. Oxford University Press. New York. 545pp.

International Centre for Trade and Sustainable Development (ICTSD). 2007. Biotechnology: Adressing Key Trade and Sustainability Issue. 93 pp.

Kositratana, K., N. Phironrit., N. Warin, A. Bhunchoth, W. Suasa-ard, B. Phuangrat, S. Chanprame, S. Wasee and P. Burns. 2007. Biosafety of transgenic papaya: from the point of scientific data. Proc. BioAsia2007, Bangkok, Thailand. p. 400.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. Journal of Biological Chemistry 193:265-275.

Neal, S.C., A.R. Harold and M.D. Halfhill. 2000. Transgenic plants and biosafety: science, misconceptions and public perceptions. BioTechniques 29:832–843.

Nomaru., K., K. Ohshima, T. Anai, H. Uekusa and N.Kita. 2004. RNA silencing of the introduced coat protein gene of *Turnip mosaic virus* confers broad-spectrum resistance in transgenic *Arabidopsis*. Phytopathology 94:730–736.

Persley, T.G. and Siedow, J. N., 1999. Applications of biotechnology to crops: benefits and risks. Council for Agricultural Science and Technology Issue Paper 12. 8 pp.

Phironrit., N., B. Phuangrat, P. Burns and W. Kositratana. 2009. Biosafety assessment of papaya ringspot virus (PRSV) resistance transgenic papaya using morphological and agronomical characters under screen house conditions. Proc. the Agricultural Biotechnology International Conference (ABIC2009), Bangkok, Thailand. p. 238.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Subhadrabandhu., S. and C. Nontaswatsri. 1997. Combining ability analysis of some characters of introduced and local papaya cultivars. Scientia Horticulturae 71:203–212.

Taylor, S.L. 2002. Protein allergenicity assessment of foods produced through agricultural biotechnology. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 42:99-112.

Technical Biosafety Committee. 2008. White Paper: Thailand Updated Status and Perspective on Research and Development of Modern Biotechnology and Biosafety Regulation. Bangkok. 21p.

Wang, C.H., H.J Bau and S.D Yeh. 1994. Comparison of the nuclear inclusion b protein and coat protein genes of five papaya ringspot virus stains distinct in geographic origin and pathogenicity. Phytopathology 84:1205–1210.

Warin, N., N. Phironrit, A. Bhunchoth, P. Burns, S. Chanprame and W. Kositratana. 2007. Determination of transcapsidation effects in genetically modified papaya contain the coat protein gene of PRSV-P superinfected with PRSV-W. Proc. BioAsia2007, Bangkok, Thailand. p. 389.

Waterhouse, P.M., M.W. Graham and M. Wang. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. PNAS. 95: 13959-13964.

Hames, B.D. 2002. Gel electrophoresis of protein. Oxford University Press. New York. 545pp.