

อัตราการแสดงออกของยีน *gus* จากการควบคุมของยูคาลิปตัสโปรโมเตอร์ KORRIGAN ในเนื้อเยื่อจำเพาะของยาสูบ

Expression Rate of *gus* Driven by Eucalyptus KORRIGAN Promoter in Tissue Specific Tobacco

อาทิตย์ วิมลทัศน์^{1,2,3,*} วิชัย ไชยสิทธิ์^{1,2} และ ศรีเมฆ ชาวโพงพงา⁴

Artit Vimoltust^{1,2,3,*}, Wichai Kositratana^{1,2} and Srimek Chowpongpa⁴

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ ศูนย์พัฒนาผลิตภัณฑ์และเทคโนโลยี บริษัท เอสซีจี แพคเกจจิ้ง จำกัด (มหาชน) ราชบุรี 70110

⁴ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900 Thailand

³ Product & Technology Development center, SCG Packaging Public Company Limited, Ratchaburi 70110 Thailand

⁴ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Science Park, Pathum Thani 12120 Thailand

รับเรื่อง: กันยายน 2561 Received: September 2018

รับตีพิมพ์: ตุลาคม 2561 Accepted: October 2018

* Corresponding author: Artitv@scg.com

ABSTRACT: *KORRIGAN* gene (*Kor*) encodes an enzyme plasma membrane bound endo-1,4-β-D-glucanase, which is member of cellulose biosynthesis genes. This gene was first discovered in *Arabidopsis* and later studied in other fiber crops, yet in the eucalyptus. The aim of this work focuses on *Kor* promoter that controls the expression of downstream gene in specific tissue and rating of expression in Tobacco (*Nicotiana tabacum*). Wherewith using sequence of *Eucalyptus grandis* genome database and extracted upstream sequence of its gene. The sequence was analyzed by *in silico* technique to identify for promoter characteristic and subsequently, the *Kor* promoter was analyzed by promoter deletion analysis. *Kor* promoters were designed *Kor* promoters, 1,587 bp. from *E. grandis*. It was fused to *gus* reporter genes and transferred to tobacco via *Agrobacterium*-mediation. Histochemical GUS staining of the transgenic tobacco showed that 1,587 bp. promoter conferred GUS expression in specific vascular tissues, which are in stem, petiole, leaf vein and root. The results of real time PCR analysis of 2 lines transgenic tobacco were compared with the CaMV 35S promoter showed that rate of expression about 52, 42, 11 and 9% respectively.

Keywords: Promoter, *KORRIGAN* gene, *Eucalyptus* gene, cellulose biosynthesis

บทคัดย่อ

ยีน *KORRIGAN (Kor)* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ plasma membrane bound endo-1,4- β -D-glucanase ในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสในพืช ยีนนี้ถูกพบครั้งแรกในต้นอะราบิโดพซิส (*Arabidopsis thaliana*) และมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในกลุ่มพืชเส้นใยอีกหลายชนิดรวมทั้งต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus sp.*) โดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาในส่วนของโปรโมเตอร์ของยีน *Kor* ซึ่งควบคุมการแสดงออกแบบเฉพาะเจาะจงในเนื้อเยื่อ และศึกษาระดับของการแสดงออกจากยีนที่ถูกควบคุมโดย *Kor* โปรโมเตอร์ ในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Kor* ในจีโนมของต้นยูคาลิปตัส (*E. grandis*) และหาคิวคลีโอไทด์ส่วนเหนือของยีน *Kor* และนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค *in silico* เพื่อหาส่วนของโปรโมเตอร์ จากนั้นทำการทดสอบการแสดงออกของโปรโมเตอร์จากต้นยูคาลิปตัส *E. grandis* โดยเชื่อมต่อโปรโมเตอร์เข้ากับยีนรายงานผล *gus* และทำการถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบด้วยเทคนิค *Agrobacterium*-mediation ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีของยีน *gus* พบว่ามีเพียงต้นที่ได้รับการถ่ายโปรโมเตอร์ *Kor* ขนาด 1,587 คู่เบส มีการแสดงออกอย่างเฉพาะเจาะจงที่เนื้อเยื่อในส่วนของท่อลำเลียง ทั้งในส่วนของลำต้น ก้านใบ เส้นใบ และราก ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real time PCR ของต้นยาสูบที่มีโปรโมเตอร์ 1,587 คู่เบส จำนวน 2 สายต้นเทียบกับโปรโมเตอร์ CaMV 35S พบว่าทั้งสองสายต้นมีลักษณะการแสดงออกในส่วนของลำต้น ก้านใบ ใบ และราก ร้อยละ 52, 42, 11 และ 9 ตามลำดับ

คำสำคัญ: โปรโมเตอร์, ยีน *KORRIGAN*, ยูคาลิปตัส ยีน, กระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส

บทนำ

กระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส (cellulose biosynthesis) เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญมากในพืช เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์และการเจริญเติบโต เซลลูโลสนั้นเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดที่พืชประมาณร้อยละ 38-50 และยังเป็นสารอินทรีย์ที่มีมากที่สุดในโลกอีกด้วย มีการนำสายเซลลูโลสหรือเยื่อใยจากพืชมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ รวมถึงเป็นวัตถุดิบหลักในอุตสาหกรรมกระดาษ และจากการที่มีอยู่เป็นจำนวนมากนั้นจึงอาจเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลังงานทดแทนในอนาคตตามจำนวนประชากรและความต้องการที่เพิ่มขึ้น กระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสในพืชเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนประกอบด้วย การควบคุมจากยีนหลายชนิด ในปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปองค์ประกอบของกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์ มีการค้นหายีน ศึกษาหน้าที่ และการทำงานของยีนในกระบวนการสร้างเซลลูโลสในเชื้อราแบคทีเรีย และพืชหลายชนิด กลุ่มยีนที่มีความสำคัญ เช่น ยีน *Ces* (cellulose synthase genes) เป็นยีนหลักในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส ยีน *cbd* (cellulose binding domain) มีหน้าที่จับกับสายเซลลูโลสส่งเสริมการทำงานของยีน *Ces* ยีน *Kor* (Endo-1,4- β -D-glucanases) ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนแต่มีผลต่อการสังเคราะห์เซลลูโลส *cel1* (Endo-1,4- β -glucanases) ทำหน้าที่ในการยับยั้งพันธะระหว่าง cellulose-xyloglucan ในระยะการแบ่งเซลล์ และการยึดตัวของเซลล์ และยีน *csi1* (cellulose synthase interactive) ทำงานร่วมกับ *Ces* แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน ในปัจจุบันมีการนำยีนในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตและปริมาณเซลลูโลสในพืชหลายชนิด งานวิจัยนี้ทำการศึกษาส่วนโปรโมเตอร์ควบคุมยีน *Kor* ที่มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลส

จากต้น *E. grandis* กับการแสดงออกของยีนรายงานผล ยีน *gus* โดยใช้เทคนิคทาง molecular cloning สร้าง plasmid DNA สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ ในการตรวจสอบการแสดงออกของโปรโมเตอร์เพื่อที่จะทำความเข้าใจกับการทำงานของโปรโมเตอร์และสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ในด้านการเจริญเติบโตและคุณภาพของเซลล์ลูโลสให้ดีขึ้นในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบยูคาลิปตัส

E. grandis จากบริษัท เอสซีจี แพคเกจจิ้ง จำกัด มหาชน นำใบยูคาลิปตัสมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก CTAB method โดยนำใบประมาณ 1 กรัม มาบดในไนโตรเจนเหลวร่วมกับการเติมสาร PVP (Polyvinylpyrrolidone) 0.2 กรัม แล้วบ่มใน extraction buffer [(cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 2%, NaCl ความเข้มข้น 1.4 M, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) pH 8.0 ความเข้มข้น 20 mM, Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 100 mM และ 2-mercaptoethanol ความเข้มข้น 2%] 0.6 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติม Potassium acetate 5 M ปริมาณ 300 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30-60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกสารละลายส่วนใสด้านบนมาเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1) 0.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเขย่าเบา ๆ บน shaker เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกสารละลายส่วนบนมาเติม Absolute Ethanol 600-750 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้าง

ตะกอนด้วย ethanol 70% 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งตะกอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนแห้งดี ละลายด้วย TE buffer (Tris-HCl pH 8.0 ความเข้มข้น 10 mM และ EDTA pH 8.0 ความเข้มข้น 1.0 mM) วัดค่า purity ratios ด้วยเครื่องวัดค่า การดูดกลืนแสง NanoDrop™ ที่ความยาวคลื่น 260/280 nm และ 260/230 nm โดยมีค่าไม่ต่ำกว่า 2.0 และนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

โคลนโปรโมเตอร์ของยีน Kor จากยูคาลิปตัส

สร้างไพรเมอร์จากข้อมูลฐานข้อมูลจีโนมของ *E. grandis* เลขข้อมูลในฐาน NCBI Reference Sequence: XM_010066898.2 โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ 3 ชนิด ตามลำดับเบสที่อยู่เหนี่ยวยีน *Kor* ขึ้นไป 1,591 ลำดับเบส ดังนี้ forward primer F1591 Korpro (5' CAGCTATGACCATGATTACGAATTC CAGCCGGCCATACCATATGACAACG 3') ออกแบบให้มีจุดจดจำของเอ็นไซม์ *EcoRI* และ reverse primer R1Korpro (5' CCTTTACTAGTCAGATCTACCATGG GCTCATCCTCGCTCCGACGCGAACT 3') ออกแบบให้มีจุดจดจำของเอ็นไซม์ *NcoI* ปฏิกริยาดีเอ็นเอของยูคาลิปตัส 40 นาโนกรัม ไพรเมอร์ เข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร 3.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร dNTP 5.0 ไมโครลิตร AccuPrime Pfx polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Invitrogen, Korea) 1.0 ไมโครลิตร และน้ำ 36 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกริยาโดยใช้โปรแกรม 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80 วินาที 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ เชื่อมต่อโปรโมเตอร์ *Kor* เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM®-T นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกริยา ลูกลูโซฟิลเมอเรสเชื่อม ต่อเข้ากับ พลาสมิด pGEM®-T Vector (Promega,

USA) เรียกว่า พลาสมิด pG + 15E.gKorpro ตามลำดับ หลังจากนั้นถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* ด้วยวิธี Heat-shocked transformation (ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.*, 1989)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เหนือยีน *Kor*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนทั้ง 3 สายพันธุ์นำมาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลจีโนมของต้นยูคาลิปตัสโดยใช้โปรแกรม Clustalw ในการวิเคราะห์ความเหมือนและความแตกต่างของจากลำดับนิวคลีโอไทด์ต้นแบบในฐานข้อมูล Phytozome จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Eucalyptus grandis* ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนประกอบของโปรโมเตอร์จากฐานข้อมูล PLACE 26.0 (<https://sogo.dna.affrc.go.jp>) และฐานข้อมูล PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

การเชื่อมต่อ *Kor* promoter เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA 1304

นำพลาสมิด pCAMBIA 1304 และ pG + 15E.gKorpro ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *NcoI* เพื่อตัดส่วน 35s CaMV promoter ออกจากพลาสมิด pCAMBIA 1304 และตัดส่วน *Kor* promoter ออกจากพลาสมิด pGEM®-T Vector ทำการเชื่อมต่อส่วนของ *Kor* promoter เข้ากับพลาสมิด pCAMBIA 1304 ที่ตัดส่วน CaMV 35s Promoter ออกเพื่อให้ *Kor* promoter ควบคุมการแสดงออกของยีนรายงานผล โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ *Kor* promoter 3 ไมโครกรัม 5 ไมโครลิตร และ พลาสมิด pCAMBIA 1304 1 ไมโครกรัม 2 ไมโครลิตร 10X บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร T4 ligase enzyme (NEB) 2 ไมโครลิตร น้ำ 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน ซึ่งเรียกว่า พลาสมิด pC15Korpro และการบรรจุพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens*

ด้วยวิธี electroporation ที่ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 2.5 กิโลโวลต์ ความจุไฟฟ้า 25 ไมโครฟารัด ค่าความต้านทาน 600 โอห์ม

การถ่ายฝากโปรโมเตอร์และยีนรายงานผลเข้าสู่ยาสูบ

นำต้นยาสูบในสภาพปลอดเชื้อที่ขยายเพิ่มจำนวนได้ย้ายลงในอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog medium ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และเพาะเลี้ยงโดยให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรีย *A. tumefaciens* แบบที่เรียกว่าพลาสมิด pCAM1304 + Korpro โดยใช้ชิ้นส่วนใบประมาณ 25 ชิ้นต่อสารละลายเชื้อ 25 มิลลิตร นำไปแช่ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำใบยาสูบมาซับด้วยกระดาษทิชชู นำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MS และคัดเลือกตามวิธีการของ Sirifongnugoon (2005)

การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนรายงานผล

ตัดชิ้นส่วนของยาสูบนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS histochemical assay โดยเตรียมสารละลาย x-gluc ซึ่งประกอบด้วย 0.1M phosphate buffer pH 7.0, 10 mM Ethylene diamine tetra-acetic acid pH 7.0, 0.5 mM potassium ferricyanid pH 7.0, 0.5 mM potassium ferrocyanide pH 7.0, 1mM x-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide) และ 0.1% Triton x-100 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วจึงนำมาหยุดปฏิกิริยาโดยล้างเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 95% สังเกตการเกิดสีน้ำเงินของชิ้นเนื้อเยื่อ (Stomp, 1992; Jefferson *et al.*, 1987)

การวิเคราะห์การแสดงออกด้วยเทคนิค Real-time PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA จากเนื้อเยื่อจาก ลำต้น ก้านใบ และราก โดยใช้ RNA

นำมาทำปฏิกิริยา reverse transcription ด้วยชุดทำปฏิกิริยาของ Omniscript Reverse Transcription (Qiagen) โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ 2 ไมโครกรัม RNA 10X buffer 4 ไมโครลิตร Oligo-dT primer 4 ไมโครลิตร 5 mM dNTPs 4 ไมโครลิตร Rnase inhibitor (Fermentas) 0.5 ไมโครลิตร Omniscript Reverse Transcriptase 2 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่ง 23.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นบ่มปฏิกิริยาไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR ในแต่ละตัวอย่างจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยองค์ประกอบดังต่อไปนี้ 2x Kappa master mixed 10 ไมโครลิตร cDNA template 5 ไมโครลิตร Forward primer 1 ไมโครลิตร Reverse primer 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 3 ไมโครลิตร โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งเป็นยีนรายงานผลจากการแสดงออกของโปรโมเตอร์ของยีน *Kor* เทียบกับการแสดงออกของโปรโมเตอร์ CaMV 35S ที่เป็นโปรโมเตอร์เดิมในพลาสมิด pCAMBIA1304 สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกแบบ relative expression ใช้ยีน *18s rRNA* ซึ่งเป็น housekeeping gene โดยใช้ KAPA SYBR® FAST qPCR Kits และทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Mastercycle ep® realplex, Smart cycle โดยใช้โปรแกรมการทำปฏิกิริยา enzyme activation step ที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น step cycling จำนวน 35 รอบ ดังนี้ denature ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วินาที annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และ extension

ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และการทำ melting curve analysis เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยวัดการเปล่งแสงของสี syber green ที่ระยะ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เหนือยีน *Kor*

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเหนือ (upstream sequences, 5') ของยีน *Kor* โดยใช้ไพรเมอร์ F1591Korpro และ R1Korpro ซึ่งออกแบบจากข้อมูลจีโนมของ *E. grandis* ที่รายงานไว้โดยใช้โปรแกรม Phytozome บนฐานข้อมูล <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html> ที่ออกแบบให้เพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ก่อนหน้ายีน *Kor* จำนวน 1,591 คู่เบส นำไพรเมอร์ที่ได้ดังกล่าวข้างต้นมาใช้โคลนยีนจาก *E. grandis* สายพันธุ์ของ บริษัท เอส ซีจี แพคเกจจิ้ง จำกัด มหาชน พบว่า โคลนที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาด 1,587 bp เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของ *E. grandis* จากฐานข้อมูล Phytozome ด้วยโปรแกรม ClustalW 2.1 พบว่ามีความเหมือนกันร้อยละ 97 (Figure 1) จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า ในส่วนของโปรโมเตอร์เป็นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกันในทุกสายพันธุ์ ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงความสำคัญของโปรโมเตอร์ *Kor* ที่มีต่อการควบคุมการสังเคราะห์เส้นใยเซลลูโลสของต้นยูคาลิปตัสที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว



Figure 1 Comparison of the upstream nucleotide sequences of *Kor* gene, 1,591 base pairs of *E. grandis* (15E.gKorpro) in this study with *E. grandis* in published genome database (15E.gGenome)

ผลการวิเคราะห์หาความเป็นไปได้และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนประกอบของโปรโมเตอร์จากฐานข้อมูล PLACE 26.0 และฐานข้อมูล PlantCARE พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ 368 สัญญาณ โดยพบทั้งในสาย sense และ antisense กระจายตัวอยู่ทั่วทั้ง 1,587 คู่เบส (Higo *et al.*, 1999) โปรโมเตอร์เป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการ transcription ในสิ่งมีชีวิต จะมีส่วนประกอบหลักที่เรียกว่า transcription start site (TSS) จะมีส่วนประกอบ 2 ส่วน ส่วนแรกคือ initiator element (Inr) เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นในกระบวนการนับเบส A ตรงกลาง Inr มีลำดับเป็น +1 และส่วนที่สองเรียกว่า transcription factor binding

sites ซึ่งโดยปกติจะประกอบไปด้วย TATA box ในกรณีที่ไม่มีโปรโมเตอร์ชนิดไม่มี TATA box (TATA boxless promoter) Inr จำเป็นต้องทำงานร่วมกับ (downstream promoter element, DPE) ในการเริ่มต้นกระบวนการและถือว่าเป็นส่วนของ core promoter ในการทำงาน Smale and Kadonaga (2003) ผลจากการวิเคราะห์โปรโมเตอร์ยีน *Kor* พบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ Inr ชื่อ (INRNTPSADB) ซึ่งพบในยีน *psaDb* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ CTCACCTTTC ซึ่งเป็นชนิด TATA boxless promoter ที่พบในต้นยาสูบ (Nakamura *et al.*, 2002) อยู่ในตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์เหนือ start codon ของยีน *Kor* ขึ้นไป 149 ลำดับเบส และพบส่วนของ DPE มีลำดับ

นิวคลีโอไทด์คือ AGACC ที่พบในโปรโมเตอร์ของสิ่งมีชีวิตทั่วไปอยู่ในตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์เหนือ start codon ของยีน *Kor* ขึ้นไปจำนวน 99 ลำดับเบส นอกจากนี้ส่วนของ core promoter ส่วนประกอบที่สำคัญอีกส่วนหนึ่งเรียกว่า Proximal promoter จากการวิเคราะห์พบ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ แบ่งออกเป็นลำดับที่หนึ่งทำหน้าที่เป็น CAAT box ชื่อ CCAATBOX1 พบในโปรโมเตอร์ของสิ่งมีชีวิตทั่วไป ทำหน้าที่ร่วมกับ TATA box ในการจับกับเอ็นไซม์ RNA polymerase มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ CCAAT มีตำแหน่งอยู่เหนือ start codon ของยีน *Kor* ขึ้นไป 254 ลำดับเบส และลำดับที่ 2-5 ทำหน้าที่เป็น specific transcription factor binding sites และเคยมีรายงานว่าพบในยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แป้งและน้ำตาลในพืชชนิดต่าง ๆ ซึ่งใกล้เคียงกับยีน *Kor* (endo-1,4-β-D-glucanases) ในการสังเคราะห์เซลลูโลส ลำดับที่สองคือ SBOXATR BCS ที่พบในต้นอะราบิดอปซิส ทำหน้าที่เป็น cis-acting element (CER) ของยีนในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ CACCTCCA มีตำแหน่งอยู่เหนือ start codon

ของยีน *Kor* ขึ้นไป 328 ลำดับเบส ลำดับที่สาม คือ SP8BFIBSP8BIB พบในต้นมันเทศทำหน้าที่เป็น Promoter binding site (PBS) ของยีน *gB-Amy* ผลิตเอ็นไซม์ beta-amylase มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ TACTATT มีตำแหน่งอยู่เหนือ start codon ของยีน *Kor* ขึ้นไป 119 ลำดับเบส (Ishiguro and Nakamura, 1993) ลำดับที่สี่ คือ WBOXHVISO1 พบในข้าวบาเลย์ทำหน้าที่เป็น PBS ของโปรโมเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับยีน *barley iso1* ผลิตเอ็นไซม์ isoamylase1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ TGACT มีตำแหน่งอยู่เหนือ start codon ของยีน *Kor* ขึ้นไป 440 ลำดับเบส และลำดับที่ห้า คือ TCA1MOTIF พบในข้าวบาเลย์ทำหน้าที่เป็น PBS ของโปรโมเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับยีนผลิตเอ็นไซม์ beta-1,3-glucanase มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ TCATTTCTT มีตำแหน่งอยู่เหนือ start codon ของยีน *Kor* ขึ้นไป 444 ลำดับเบส (Mhiri *et al.*, 1997) และนำมาจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ตามส่วนประกอบจากนั้นนำข้อมูลองค์ประกอบดังกล่าวมาเขียนเป็นภาพจำลองของโปรโมเตอร์ (Figure 2)

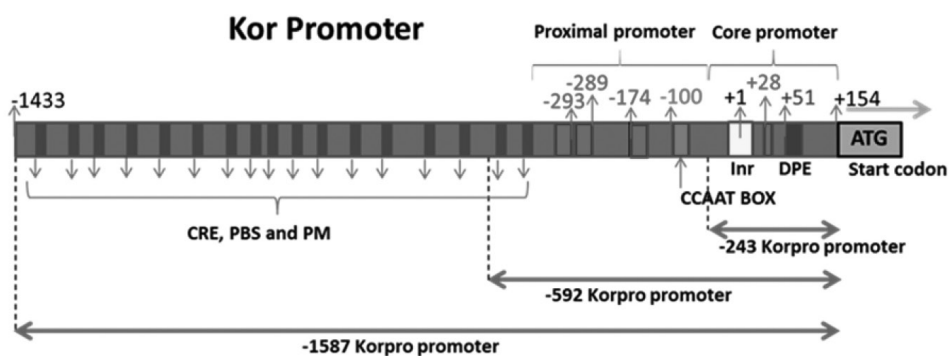


Figure 2 The simulation structure of the *Kor* promoter in *Eucalyptus grandis*

ผลการเชื่อมต่อโปรโมเตอร์ Kor เข้าพลาสมิด pCAMBIA 1304 และการถ่ายฝากโปรโมเตอร์และยีนรายงานผลเข้าสู่ยาสูบ

ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pCAMBIA1304 กับพลาสมิด pG + 15Korpro ด้วยเอ็นไซม์ *EcoR* I และ *Nco* I ซึ่งเอ็นไซม์ *EcoR*I และ *Nco*I จะตัดปลายขึ้นของโปรโมเตอร์ Kor ออกจากพลาสมิด pGEM®-T ให้ปลายทั้งสองด้านมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พร้อมเชื่อมต่อกันกับพลาสมิด pCAMBIA 1304 ที่ตัดบริเวณส่วนของดีเอ็นเอที่กำหนดการสร้างโปรตีน LacZ หน่วยแอลฟา รวมทั้งโปรโมเตอร์ CaMV 35S ซึ่งมีขนาดประมาณ 800 คู่เบส ด้วยคู่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่เหมือนกัน เชื่อมต่อโปรโมเตอร์ของยีน *Kor* เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA1304 และเรียกว่าพลาสมิด pCa + 15Korpro (Figure 3)

นำแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pCa + 15Korpro เลี้ยงในอาหารเหลวชนิด LB เพื่อเพิ่มปริมาณสำหรับการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ต้นยาสูบ ใช้ปริมาณเชื้อที่ค่า O.D. 1.0 ที่ความยาวดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (O.D. 600) ละลายตะกอนเชื้อ ด้วยอาหารสูตร B5 (Gamborg *et al.*, 1986) แซ่ขึ้นใบยาสูบในสารแขวนลอยเชื้อโดยวิธี co-cultivation กระบวนการถ่ายยีนจะเกิดขึ้นในช่วงการเลี้ยงใบพืชและแบคทีเรียร่วมกันบนอาหารสังเคราะห์ ส่งถ่ายยีนที่อยู่ในส่วนของ T-DNA border ที่อยู่ระหว่างส่วนหัวและท้าย left border (L) และ right border (R) เข้าสู่โครโมโซมพืช ซึ่งจะมียีน *hpt* ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase ทำให้ใบที่ถ่ายยีนทนทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin ได้ และยีน *gus* ที่เชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์ *Kor* ซึ่งสร้างเอ็นไซม์ β -glucuronidase (GUS) เป็นตัวบ่งชี้การควบคุมการแสดงออกยีนรายงานผล ใช้ในการตรวจต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม พบว่า เมื่อเลี้ยงขึ้นใบดังกล่าวบน

อาหารที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นเวลา 45 วัน พบว่ามีขึ้นใบที่ยังมีชีวิตรอดเป็นจำนวนมาก และชักนำให้พัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ และคัดเลือก 2 สายต้น คือ 15Kor2 และ 15Kor3

ผลการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนรายงานผล

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase (GUS) จากยีน *gus* ที่ถูกควบคุมการแสดงออกในต้นยาสูบโดยโปรโมเตอร์จากยีน *Kor* ซึ่งทำการออกแบบไว้ในส่วนประกอบของพลาสมิดสายผสม pCa + 15Korpro ทำให้การแสดงออกของยีน *gus* สามารถยืนยันถึงการทำงานของโปรโมเตอร์ว่าแสดงออกในต้นยาสูบได้ จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ GUS ทำปฏิกิริยากับสารสับสเตรท 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) และเกิดสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (X-X dimers precipitate) พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pCa + 15Korpro มีการแสดงออกของเอ็นไซม์ GUS โดยพบการเปลี่ยนสีของเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำเงินในเนื้อเยื่อของต้นยาสูบ (Figure 4) เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ได้รับการถ่าย พลาสมิด pCAMBIA 1304 ที่มีโปรโมเตอร์จาก 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) ที่ควบคุมการแสดงออกในระดับสูงในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ตลอดเวลา และมีความเสถียรโดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงคู่ จึงเป็นโปรโมเตอร์ที่นิยมนำใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2523 จนถึงปัจจุบัน Tepfer *et al.* (2004) พบว่า ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดที่มีโปรโมเตอร์ *Kor* ควบคุมการทำงานของยีน *gus* ให้แสดงออกได้จากการตรวจพบสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน แต่ในปริมาณที่น้อยกว่า และพบในเนื้อเยื่อบางส่วนของต้นยาสูบ เช่น ส่วนของลำต้น ก้านใบ เส้นใบ และราก ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของโปรโมเตอร์ *Kor* ในการควบคุมการแสดงออกของยีน (Figure 5)

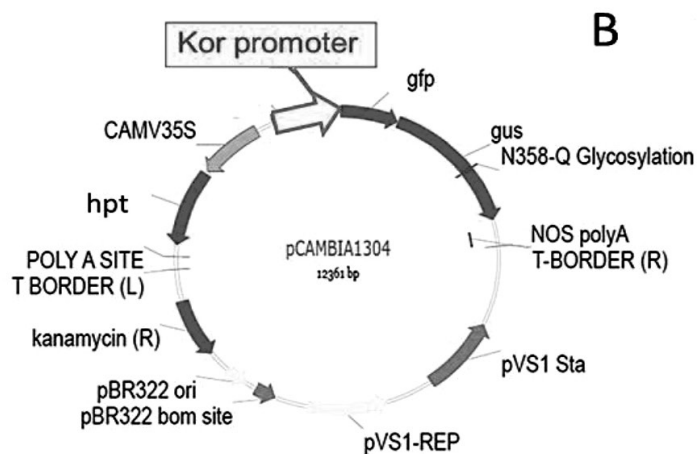
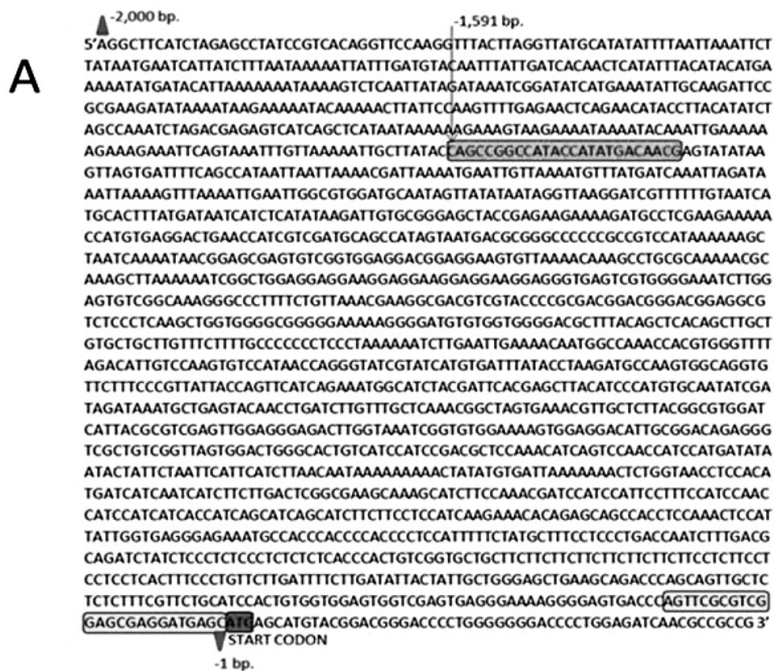


Figure 3 Cloning of Kor promoter of *E. grandis* and recombinant plasmid
 (A) Nucleotide sequence of *Kor* gene upstream 2,000 base pairs, start codon in the pink box, forward primer in the yellow box and reward primers in the green box. (B) Recombinant plasmid pC15korpro, with Kor promoter ligated into plasmid pCAMBIA 1304

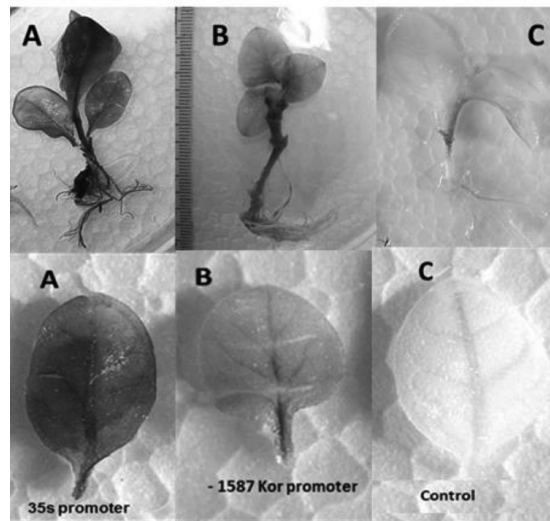


Figure 4 Comparison of reporter gene (*Gus*) with different promoter sequences in transgenic tobacco plants, with 35S CaMV promoter (A), with Kor promoter (B), control plant (C)

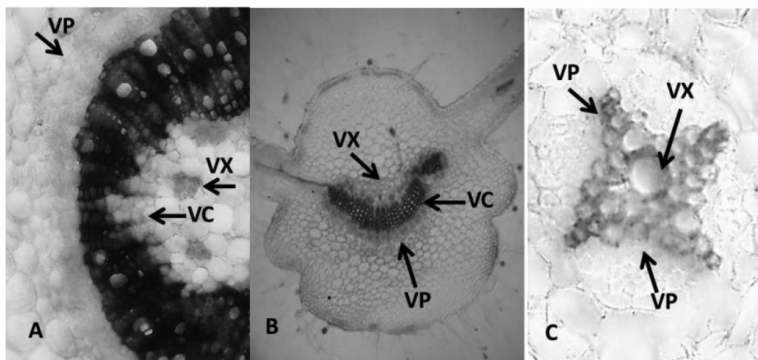


Figure 5 Histochemical localization of GUS expression with 1587 Kor promoter in transformed tobacco stems cross-section (A), petiole cross-section (B) and root cross-section (C) at high magnification 400X, vascular cambium (VC) phloem (VP) and xylem (VX)

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกด้วยเทคนิค Real-time PCR

ในการทดลองใช้โปรโมเตอร์ CaMV 35S เป็นโปรโมเตอร์ต้นแบบในการเปรียบเทียบระดับการควบคุมการแสดงออกของยีน *gus* เทียบกับโปรโมเตอร์ Kor จากต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน 2 สายพันธุ์ คือ 15Kor2 และ 15Kor3 ในการเปรียบเทียบให้อัตราการแสดงออกของโปรโมเตอร์ CaMV 35S ถือเป็นร้อยละ 100 โดยการนำค่า cycle threshold (CT) ที่ได้จากการแสดงออกของยีน *gus* ที่ถูกควบคุมโดยโปรโมเตอร์ทั้งสองชนิด จากนั้นนำมาเปรียบเทียบโดยใช้การหาเชิงปริมาณสัมพัทธ์ หรือ (Quantification and relative quantification PCR) โดยการนำสัญญาณที่ได้จากการทำปฏิกิริยานำมาเทียบกับสัญญาณของสายดีเอ็นเอที่ได้มาจากกลุ่มที่ต้องการคำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจโดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบเปรียบเทียบ $\Delta\Delta CT$ มีสมการดังนี้ $R = 2^{-[(CT \text{ sample} - CT \text{ housekeeping gene}) - (CT \text{ calibrator} - CT \text{ housekeeping gene})]}$ และเปรียบเทียบการอัตราการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันหรือแสดงอัตราการ

แสดงออกของยีนในเวลาที่แตกต่างกัน (Livak and Schmittgen, 2001) อัตราการแสดงออกของโปรโมเตอร์ Kor จาก 2 สายพันธุ์ คือ 15Kor2, 15Kor3 และต้นปกติ การแสดงออกในส่วนของใบมีการแสดงออกเพียงร้อยละ 11.2, 12.0 และ 0.2 ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการแสดงออกในส่วนของเส้นใบที่ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อระบบท่อลำเลียง ในส่วนของก้านใบพบว่า มีการแสดงออกร้อยละ 42, 40 และ 0.6 ตามลำดับ ในส่วนของลำต้น พบว่า มีการแสดงออกร้อยละ 52, 48 และ 1 ตามลำดับ และในราก พบว่า มีการแสดงออกร้อยละ 9.0, 8.7 และ 0.1 ตามลำดับ (Figure 6) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ามีผลที่สอดคล้องกับการแสดงออกที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อที่ประกอบไปด้วยส่วนของท่อลำเลียงน้ำและอาหารซึ่งเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อกลุ่มหลักที่มีหน้าที่สร้างเนื้อไม้ มีการพัฒนาเซลล์ที่มีส่วนประกอบของเซลล์โลสสูง โดยมีระดับการแสดงออกที่มากที่สุดในส่วนของลำต้น ซึ่งเป็นส่วนหลักที่ต้นไม่มีการผลิตเนื้อเยื่อเซลล์โลสตามกระบวนการสังเคราะห์เซลล์โลส เนื่องจากโปรโมเตอร์จากยีน *Kor* เป็นยีนที่อยู่ในกระบวนการสังเคราะห์เซลล์โลสมาทำการทดลอง

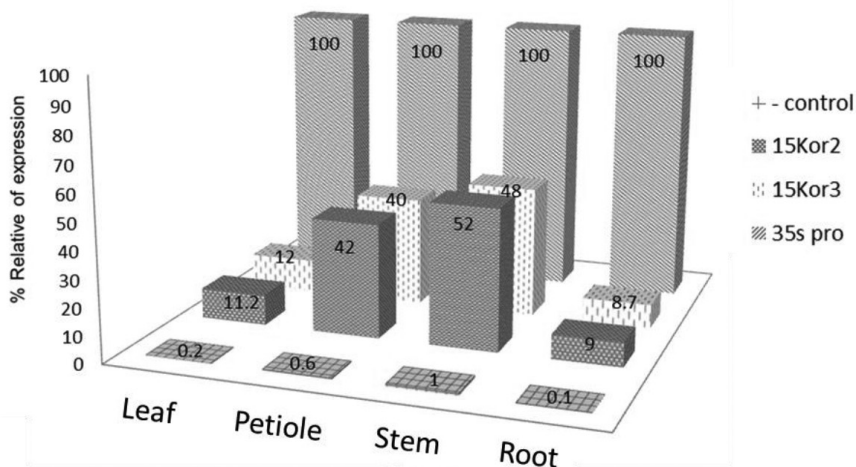


Figure 6 Relative expression of *gus* gene in 2 lines of transgenic tobacco with Kor promoter (15Kor2 and 15Kor3) compare with normal tobacco (control) and transgenic tobacco with CaMV 35S promoter (35s pro) in stem, petiole, leaf and root

สรุป

สามารถค้นหายีน *Kor* และโคลนโปรโมเตอร์ของยีน *Kor* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เซลลูโลสในพืช ซึ่งพบรายงานไว้เพียงในต้น *A. thaliana* โดยการถอดรหัสจากลำดับกรดอะมิโนให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ และค้นหาในฐานข้อมูลจีโนมของ *E. grandis* ได้โดยตรง ซึ่งยีนนี้ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในยุคาลิปดัส เมื่อสามารถหายีนและสามารถวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนประกอบของยีนในส่วนโปรโมเตอร์ที่อยู่เหนือยีนขึ้นไป พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากกว่าร้อยละ 97 และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *in silico* หาส่วนองค์ประกอบของโปรโมเตอร์ *Kor* ด้วยโปรแกรม PLACE 26.0 และ PlantCARE พบว่า โปรโมเตอร์ *Kor* เป็นโปรโมเตอร์ชนิดพิเศษที่เรียกว่า TATA boxless promoter คือโปรโมเตอร์ที่ทำงานได้โดยไม่ต้องมี TATA box แต่จะทำงานร่วมกับ DPE โดยทำหน้าที่เป็นจุดจดจำในการเข้าจับกับ transcription factor เพื่อเริ่มกระบวนการแสดงออกของยีน ส่วนของ Inr ที่พบมีชื่อเฉพาะว่า (INRNTPSADB) ซึ่งพบในยีน *psaDb* และเมื่อนำมาทดสอบกับการแสดงออกของยีนรายงานผล *gus* พบว่า โปรโมเตอร์ *Kor* สามารถควบคุมการแสดงออก

ของยีนรายงานผล *gus* ให้แสดงออกในต้นยาสูบได้ และมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อในกลุ่มท่อลำเลียงเท่านั้น และมีระดับการแสดงออกของยีนรายงานผลสอดคล้องกัน โดยมีระดับการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อระบบท่อลำเลียงและเป็นแหล่งสร้างเซลลูโลสของพืชในส่วนของลำต้นและก้านใบ และพบการแสดงออกน้อยมากในส่วนของใบและราก การศึกษาด้วยเทคนิค *in silico* เป็นการนำข้อมูลส่วนประกอบและหน้าที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยมีรายงานไว้ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวบรวมเป็นรูปแบบฐานข้อมูล และสามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการประมวลผลเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน ทำให้เกิดความสะดวกรวดเร็วในการศึกษาและพัฒนางานทางด้านวิทยาศาสตร์สามารถเชื่อมโยงข้อมูล และนำองค์ความรู้มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

สนับสนุนทุนการวิจัยโดย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และบริษัท เอสซีจี แพคเกจจิ้ง จำกัด (มหาชน)

เอกสารอ้างอิง

- Gamborg, O.L., R. Miller and K. Ojima. 1986. Nutrient requirements of suspension in cultures of soybean root cell. *J. Exp. Cell Res.* 50: 151–158.
- Higo, K., U. Yoshihiro, I. Masao and K. Tomoko. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.* 27: 297–300.
- Ishiguro, S. and K. Nakamura. 1993. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and β -amylase from sweet potato. *Mol. Gen. Genet.* 244: 563–571.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387–405.
- Livak, K.J. and D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402–408.
- Mhiri, C., M.A. Grandbastien, H. Lucas, J.B. Morel, S. Verbhettes and J.M. Casacuberta. 1997. The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense response. *Genetica.* 100: 241–252.
- Nakamura, M., T. Tsunoda and J. Obokata. 2002. Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J.* 29: 1–10.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A. 545 p.
- Sirifongnugoon, S. 2005. Transformation of pCAMBIA 1301 to tomato via *Agrobacterium rhizogenes* 'K599'. MS Thesis, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Smale, S.T. and J.T. Kadonaga. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 449–479.
- Stomp, A.M. 1992. Histochemical localization of β -glucuronidase. *In*: Gallagher, S.R. (Ed), *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press, New York, U.S.A. 221 p.
- Tepfer, M., S. Gaubert, M. Leroux-Coyau, S. Prince and L.M. Houdebine. 2004. Transient expression in mammalian cells of transgenes transcribed from the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Environ. Biosafety Res.* 3: 91–97.