



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวเพื่อเพิ่มปริมาณ
กรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ด

Improvement of Thai glutinous rice to increase
essential amino acid contents in rice seeds

โดย

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ และคณะ

ตุลาคม 2553

สัญญาเลขที่ MRG4780001

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวเพื่อเพิ่มปริมาณ

กรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ด

**Improvement of Thai glutinous rice to increase
essential amino acid contents in rice seeds**

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

Professor Dr. Thomas W. Okita, Institute of Biological Chemistry, Washington State
University, USA

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร สิทธิประณีต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับการเป็นนักวิจัยที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำเป็นอย่างดีเสมอมา ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์ใช้อะไอร์แบคที่เรียม binary vector และสารเคมีต่างๆ จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการให้บริการโรงเรือนกระจกสำหรับปลูกข้าว

นอกจากนี้ขอขอบคุณนักศึกษาสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้แก่ นายบุรณศักดิ์ เชื้อทอง นางสาววารุณี เข็มหาญ และนางสาวณิชนน ธรรมรักษ์ ที่มีส่วนสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์

ตุลาคม 2553

รหัสโครงการ : MRG4780001

ชื่อโครงการ : การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวเพื่อเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ด

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

บทคัดย่อ

องค์ประกอบของเมล็ดข้าวขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการถ่ายยีนโปรตีนนมผึ้ง major royal jelly protein (*mrjp*) เข้าสู่ข้าว อาจทำให้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการโดยการเพิ่มคุณภาพโปรตีนในเมล็ดข้าวได้ ยีน *mrjp* แยกได้จากผึ้งโพรงของไทย (*Apis cerana*) และมีรหัสสร้างโปรตีน MRJP ที่มีกรดอะมิโนจำเป็นสูงประมาณ 45-49 % งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย และศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนนมผึ้ง (*mrjp2*) ในข้าว การถ่ายยีนในข้าวทำได้โดยใช้แคลลัสที่พัฒนามาจากบริเวณ scutella ของเมล็ดแก่ ร่วมกับการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pBU3 (*Gt1:: mrjp2 ::Tnos*) ซึ่งมียีน *mrjp2* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *Gt1* (Glutelin 1) ทำให้มีการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าว จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake พบว่า ข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake สามารถเกิดแคลลัสได้ 44.23 และ 73.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีขนาดเฉลี่ย 1.08 และ 1.07 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยแคลลัสของข้าวทั้งสองพันธุ์มีลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน คือ มีสีเหลืองอ่อน กลม และแน่น เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002) พบว่า วิธีการถ่ายยีนของ Endo et al. (2002) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนมากกว่าวิธีของ Toki (1997) เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตายสูงกว่า และยังพบอีกว่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองมีค่าสูงกว่าข้าวพันธุ์ Kitaake แต่แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ เมื่อตัดชิ้นส่วนใบของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake รุ่น T₀ มาทดสอบด้วยวิธี GUS assay พบว่า มีการแสดงออกของยีน *gusA* และเมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นข้าว BU3 มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* พบว่า มีการแทรกตัวของยีน *mrjp2* ในจีโนมของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ เมื่อนำต้นข้าวรุ่น T₁ มาทดสอบการถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูก พบว่า อัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- ของรุ่น T₁ มีอัตราส่วน 3:1 แสดงว่า การถ่ายทอดยีนของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมเป็นไปตามกฎของเมนเดล และการถ่ายทอดยีนมีความเสถียรจนถึงรุ่น T₃ และ T₄ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Southern blotting โดยใช้ probe ของยีน *mrjp2* ที่ติดฉลากด้วย DIG พบว่า ต้นข้าวที่นำมาทดสอบมียีน *mrjp2* แทรกอยู่ในจีโนม 1 ตำแหน่ง (a single insertion site) เมื่อนำเมล็ดอ่อนของข้าวต้น BU3 มาสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบ

โดยเทคนิค RT-PCR พบว่า มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ที่ระดับ mRNA และจากการวิเคราะห์โปรตีน ในเมล็ดแก่ของข้าวด้วยเทคนิค Western blotting พบการแสดงออกของโปรตีน GUS แต่ไม่สามารถ ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ได้ อาจเนื่องจากการแสดงออกของโปรตีนน้อยมาก หรือ โปรตีน MRJP2 อาจสลายไปในเมล็ดแก่ของข้าว และการใช้แอนติบอดี Anti-His ทำให้การตรวจสอบ โปรตีน MRJP2 มีความจำเพาะต่อโปรตีนต่ำ และมีความไวในการตรวจสอบต่ำ แต่เมื่อนำเมล็ดอ่อนของ ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blotting พบว่า มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* โดยพบโปรตีนขนาดประมาณ 50 kD ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไป ประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของโปรตีนต่อไป

คำหลัก : ข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake เชื้ออะโกรแบคทีเรีย การถ่ายยีนในข้าว ยีนโปรตีนนมผึ้ง

Project Code : MRG4780001

Project Title : Improvement of Thai glutinous rice to increase essential amino acid contents in rice seeds

Investigator : Asst.Prof.Dr. Chotipa Sakulsingharoj
Faculty of Science, Maejo University

Project period : 3 Years

Abstract

The nutritional content of rice is deficient in several amino acids essential for human growth and development. To increase the protein quality of rice, a gene encoding a 'major royal jelly protein' (*mrjp*) isolated from Thai honeybee *Apis cerena* was transformed into rice. The MRJP was selected because of its high nutritional value as its composition consists of 45-49 % essential amino acids. Transformation and expression of a major royal jelly protein (*mrjp2*) gene in rice cv. Niaw Sanpahtawng (*Oryza sativa* L. var *indica*) and Kitaake (*Oryza sativa* L. var *japonica*) were studied. Scutella-derived calli established from mature rice seeds were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 harboring pBU3 (*Gt1::mrjp2::Tnos*) plasmid containing *mrjp2* gene driven by the endosperm-specific *Gt1* (Glutelin 1) promoter. It was found that Niaw Sanpahtawng and Kitaake showed the maximum percentages of callus formation at 44.23 and 73.71%, respectively and the average size of callus of 1.08 and 1.07 cm, respectively. Both varieties produced globular, yellow, and compact calli which were actively dividing and suitable for transformation. The efficiency of transformation methods of Toki (1997) and Endo et al. (2002) was compared. It was found that a suitable transformation method for both rice varieties was that of Endo et al. (2002) which produced the highest percentage of surviving calli. The percentage of surviving calli of Niaw Sanpahtawng was higher than that of Kitaake but the hygromycin resistant calli were unable to regenerate. GUS activity was detected on leaf segments of T₀ transgenic plants, indicating the expression of *gusA* gene. PCR analysis of leaf genomic DNA of BU3 plants using *mrjp2* specific primers showed the expected PCR products, indicating the integration of *mrjp2* gene into transgenic plant genomes. In addition, segregation analysis of T₁ progeny showed that the phenotypic ratio GUS-positive : GUS-negative was 3:1, following Medelian rule. Stable inheritance of genes was observed in offsprings of T₃ and T₄ transgenic rice plants. Southern blotting analysis using DIG-labeled probe of *mrjp2* gene showed a single insertion site of *mrjp2* gene in genome of tested transgenic rice plants. Total RNA from milky stage seeds of BU3

transgenic plants was extracted and subjected to RT-PCR analysis. The results showed that the *mrjp2* gene was expressed at mRNA level. Expression of MRJP2 protein in mature seeds of transgenic rice by Western blotting analysis was investigated. It was found that the 70 kDa GUS protein was detected. However, MRJP2 protein was not detectable by Anti-His, probably due to low expression or degradation of this protein in mature rice seeds. The use of Anti-His antibody may result in low specificity and sensitivity for detection of MRJP2 protein. However, developing transgenic rice seeds expressed the protein of about 50 kD which was possibly MRJP2 protein. Overall results indicated that *mrjp2* gene was successfully transformed and expressed in rice seeds. This study will be useful for genetic improvement of rice for improved protein quality in the future.

Keywords : *indica* rice cv. Niaw Sanpahtawng, *japonica* rice cv. Kitaake, *Agrobacterium tumefaciens*, rice transformation, major royal jelly protein (*mrjp2*) gene

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญเรื่อง	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	viii
บทนำ	1
ตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	34
สรุปผลการทดลอง	70
เอกสารอ้างอิง	73
Output	79
ภาคผนวก	80

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่จำเป็นต่อร่างกายที่มีอยู่ในข้าวเหนียวพันธุ์ต่างๆ 100 กรัม	7
2	การเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake	48
3	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002)	51
4	สรุปการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน โดยเทคนิค GUS Assay และเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>mrjp2</i>	57
5	สรุปการวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน <i>gusA</i> ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม จากรุ่น T ₀ ไป T ₁	59

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว	5
2 ลักษณะการประกบเจล กับแผ่นเมมเบรนในขั้นตอนการย้ายโปรตีนจาก เจลลงบนแผ่นเมมเบรน	31
3 โครงสร้างพลาสมิด pBU3 (<i>Gt1:: mrjp2 ::Tnos</i>)	35
4 การวิเคราะห์ยีน <i>mrjp2</i> ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยวิธีอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส	36
5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของพลาสมิด pYW502 และยีน <i>mrjp2</i> ที่ได้ จากพีซีอาร์ ซึ่งนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XbaI</i> และ <i>SacI</i> และทำ ให้บริสุทธิ์แล้ว	37
6 การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสม pBU3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XbaI</i> และ <i>SacI</i> โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	38
7 การวิเคราะห์พลาสมิด pBU3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิธีอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส	39
8 การวิเคราะห์เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pBU3 ด้วยเทคนิคพีซี อาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>mrjp2</i> โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส	40
9 ลำดับเบสของพลาสมิด pBU3 บริเวณส่วนของยีน <i>mrjp2</i>	43
10 การวิเคราะห์กรดอะมิโนของยีน <i>mrjp2</i> ในพลาสมิด pBU3	45
11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>mrjp2</i> ในพลาสมิด pBU3 กับ ยีน <i>mrjp2</i> ที่รายงานใน GenBank (Accession no.AF525777)	46
12 แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง อายุ 4 สัปดาห์	49
13 ลักษณะแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kitaake อายุ 4 สัปดาห์	49
14 ลักษณะแคลลัสบนอาหารคัดเลือก สัปดาห์ที่ 2	52
15 ลักษณะแคลลัสบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สัปดาห์ที่ 2	52
16 แคลลัสที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pBU3 ที่กำลังพัฒนาเป็นต้นอ่อน	53
17 ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T ₀ ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBU3 ที่ปลูกในโรงเรือน	54
18 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน <i>gusA</i> ของต้น BU3	54

ภาพ		หน้า
19	การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวของต้น BU3 ที่มีการแสดงออกของยีน <i>gusA</i> ด้วยวิธี CTAB	55
20	การวิเคราะห์ยีน <i>mrjp2</i> ในข้าว Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBU3	56
21	ผลการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนและมีการแสดงออกของยีน <i>gusA</i> ด้วยเทคนิค Southern blot โดยใช้ probe ที่จำเพาะต่อยีน <i>mrjp2</i>	60
22	ผลการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนและมีการแสดงออกของยีน <i>gusA</i> ด้วยเทคนิค Southern blot โดยใช้ probe ที่จำเพาะต่อยีน <i>mrjp2</i>	61
23	การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดจากเมล็ดอ่อนรุ่น T ₂ ของต้นข้าว ดัดแปลงพันธุกรรม BU3-16 และ BU3-20	63
24	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน <i>mrjp2</i> ในระดับ mRNA ของข้าว ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>mrjp2</i>	63
25	การตรวจสอบการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอในอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน <i>mrjp2</i>	64
26	การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน <i>mrjp2</i> ในระดับ mRNA ของข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pBU3	65
27	การตรวจสอบโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค SDS-PAGE	67
28	การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดแก่ของข้าว ดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค Western blotting ที่ใช้แอนติบอดี Anti-His	68
29	การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดอ่อนรุ่น T ₁ ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค Western blotting ที่ใช้แอนติบอดี Anti-His	69

บทนำ

ข้าวเป็นอาหารหลักประจำชาติ และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทั้งบริโภคภายใน และส่งออกไปยังต่างประเทศ โดยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวปีละประมาณ 56 – 58 ล้านไร่ ได้ผลผลิตปีละประมาณ 28.0 – 30.0 ล้านตันข้าวเปลือก (กรมการค้าภายใน, 2552) ซึ่งในปี 2551 ที่ผ่านมามียอดการส่งออก ประมาณ 1.8 - 2 แสนล้านบาท ซึ่งเป็นรายได้หลักที่หล่อเลี้ยงเกษตรกรของประเทศไทย (สภาหอการค้าแห่งประเทศไทย, 2552)

ปัญหาทางโภชนาการในประเทศไทยที่สำคัญคือ การขาดโปรตีนและพลังงาน ซึ่งข้าวเป็นอาหารหลักที่มีการบริโภคมาก แต่เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของเมล็ดข้าว พบว่า องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้ง ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน ประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ (บุญหงส์, 2547) โดยพบว่าปริมาณกรดอะมิโนไลซีน และทริปโตเฟนต่ำ ดังนั้น การเพิ่มปริมาณโปรตีนในข้าวจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปัญหาการขาดแคลนโปรตีนในประชากรของประเทศ

จากการศึกษาโปรตีนในนมผึ้ง ซึ่งสร้างขึ้นโดยผึ้งพยาบาล พบว่า มีปริมาณ กรดอะมิโนจำเป็นสูงมาก โปรตีนส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของ MRJP (Major Royal Jelly Protein) Imjongjirak et al. (2005) ได้ศึกษายีนที่สร้างโปรตีน MRJP โดยตรวจการแสดงออกของยีน *mrjp1* และ *mrjp2* ที่โคลนมาจากผึ้งโพรง (*Apis cerana*) พบว่า โปรตีนที่แสดงออกมีกรดอะมิโนจำเป็นทั้ง 10 ชนิดในปริมาณที่สูงมากถึง 45-49 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษายีน *mrjp2* เข้าไปในข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake โดยให้ยีนทำงานภายใต้การควบคุมของ *Gt1* promoter ซึ่งจะทำให้มีการแสดงออกอย่างจำเพาะของยีนในเมล็ดข้าว และศึกษาการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในเมล็ดข้าว

ตรวจเอกสาร

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของข้าว

ข้าวที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุดในโลก คือ ข้าวอินดิกา มีพื้นที่ปลูกประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของข้าวพันธุ์ปลูกทั้งหมด อีกทั้งข้าวชนิดนี้ยังเป็นอาหารหลักของประชากรโลก และเป็นสินค้าเกษตรที่สำคัญของประเทศ ซึ่งข้าวที่นิยมปลูกในประเทศไทยจัดเป็นข้าวอินดิกาเช่นกัน ข้าวไทยมีปริมาณการส่งออกในปี 2551 สํารวจตั้งแต่เดือนมกราคมถึงพฤศจิกายน มีการส่งออกทั้งสิ้น 9,417,880.24 ตัน คิดเป็นมูลค่า 188,873.90 ล้านบาท โดยส่งไปขายทั่วโลก 144 ประเทศ ตลาดหลักของ ข้าวไทยอยู่ในทวีปเอเชีย แอฟริกา ตะวันออกกลาง อเมริกา ยุโรป และโอเชียเนีย ตามลำดับ (สภาหอการค้าแห่งประเทศไทย, 2552)

ลักษณะพันธุศาสตร์ของข้าว

ข้าวเป็นพืชในสกุล *Oryza* ชื่อเฉพาะของข้าวคือ *Oryza sativa* วงศ์ Gramineae เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ล้มลุก เช่นเดียวกับหญ้า ข้าวที่ปลูกกันอยู่ทั่วโลกมีด้วยกัน 2 พันธุ์ คือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* L.) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima*) ข้าวที่ปลูกกันอยู่มีโครโมโซมเป็นแบบดิพลอยด์ ($2n=24$) (อรอนงค์, 2547) ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีลำต้นเป็นปล้อง ใบมีลักษณะยาวรี ปลายแหลม ดอกมีสีน้ำตาลและช่อดอกเป็นประเภทสมบูรณ์เพศ เพราะมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียในดอกเดียวกัน การผสมพันธุ์ส่วนใหญ่จึงเป็นการผสมกันในตัวเองเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น พันธุ์ข้าวโดยทั่วไปจึงมีลักษณะเป็นโฮโมไซกัส ยีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ภายในข้าวมีประมาณ 33,000-50,000 ยีน (พรทิพย์, 2539; มรกต และศิริพร, ม.ป.ป.)

ข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima*) แพร่กระจายอยู่เฉพาะบริเวณเขตร้อนของแอฟริกาเท่านั้น ส่วนข้าวเอเชียเป็นข้าวลูกผสมเกิดจาก *Oryza sativa* กับข้าวป่า มีถิ่นกำเนิดบริเวณประเทศอินเดีย บังคลาเทศ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกกันอย่างแพร่หลายตั้งแต่อินเดีย ตอนเหนือของบังคลาเทศ บริเวณดินแดนสามเหลี่ยมระหว่างพม่า ไทย ลาว เวียดนาม และจีนตอนใต้ ข้าวเอเชียสามารถ

แบ่งเป็น 3 พันธุ์ ด้วยกัน คือ อินдика (*indica* type) มีลักษณะของเมล็ดยาว เรียว นิยมปลูกมากแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินโดนีเซีย ไทย อินเดีย และบราซิล จาปอนิกา (*japonica* type) ปลูกมากในแถบภูมิอากาศค่อนข้างอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น และเกาหลี มีลักษณะเมล็ดค่อนข้างป้อม เมล็ดสั้น และจาวานิกา (*javanica* type) เป็นข้าวที่มีลักษณะอยู่ระหว่างอินдикаและ จาปอนิกา เมล็ดสั้น ปลูกมากที่ประเทศอินโดนีเซีย และพม่า จากนั้นแพร่ไปยังฟิลิปปินส์และญี่ปุ่น

(อรอนงค์, 2547; มุลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2549)

การเจริญเติบโตของข้าว

วงจรชีวิตในการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นข้าว แบ่งออกเป็น 3 ระยะด้วยกันคือ

1. การเจริญเติบโตทางลำต้น (Vegetative phase) (อรอนงค์, 2526)

การเจริญและพัฒนาทางลำต้นจะเริ่มตั้งแต่เห็นใบแรกโผล่ออกมาจากปลายหุ้มยอดอ่อน จนถึงระยะกำเนิดช่อดอก โดยจะใช้ระยะเวลา 30 วันเป็นอย่างน้อย โดยต้นอ่อนของข้าวจะเรียกกันว่า “ต้นกล้า” หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะแตกกอ (tiller) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะ

1.1 ระยะแตกกอสูงสุด เป็นระยะการเพิ่มจำนวนของหน่อที่สาม (tertiary tillers) จะเพิ่มจนถึงจุดที่ไม่สามารถแยกระหว่างหน่อที่หนึ่งและหน่อที่สามได้

1.2 ระยะยืตัวของลำต้น เป็นการยืตัวของลำต้น ซึ่งจะเกิดก่อนการสร้างรวงอ่อน ซึ่งเป็นระยะต่อจากการแตกกอ

2. การพัฒนาทางการสืบพันธุ์ (Reproductive phase) (บุญหงส์, 2547; อรอนงค์, 2526)

การพัฒนาทางการสืบพันธุ์ จะเริ่มตั้งแต่ระยะกำเนิดรวงอ่อน จนถึงระยะออกดอก ระยะสร้างรวงอ่อน ในระยะนี้ลำต้นของข้าวจะมีปุยขนขนาดเล็กเกิดขึ้น โดยปกติจะอยู่ในช่วงระยะประมาณ 30 วันก่อนออกรวง

1.1 ระยะตั้งท้อง ในระยะนี้จะมีการยืปล้องอย่างเห็นได้ชัดพร้อมกับการนูนขึ้นของกาบใบธง

1.2 ระยะออกรวง เป็นระยะที่ช่อดอกโผล่พ้นออกจากกาบใบธง

1.3 การผสมเกสรและปฏิสนธิ เป็นระยะที่ภายในดอกจะแตก และละอองเรณูจะหลุดจากอับเรณูไปตกบนยอดเกสรตัวเมีย ทำให้เกิดการผสมตัวเองภายในดอกเดียวกันขึ้น หลังจากนั้นจะเข้าสู่ช่วงสุกแก่

3. การเจริญเติบโตและพัฒนาทางเมล็ด (Seed growth)

หลังจากปฏิสนธิประมาณ 8-10 วัน เมล็ดในระยะแรกจะมีแป้งใสเหลว (milky stage) เมื่อผ่านระยะน้ำนมไปแล้ว น้ำนมข้าวจะเริ่มเกาะตัวกันแน่นและแข็งตัว หลังจากนั้นเมล็ดจะมีการพัฒนาเป็นสู่ระยะเมล็ดสุกแก่ (maturity stage)

เมื่อนำเมล็ดข้าวที่สุกแก่ แล้วมาแกะเปลือกออก โดยยังเหลือส่วน brownish pericarp อยู่จะ เรียกว่า ข้าวกล้อง (brown rice) เมล็ดข้าวกล้องส่วนใหญ่จะมีสีน้ำตาลอ่อน หรือแดง ข้าวกล้องเมื่อนำไปขัดเอา pericarp และ seed coat ออก เรียกว่า ข้าวสาร (kernel) ส่วนหัวของข้าวจะมีลักษณะสีขาวขุ่นเรียกว่า จมูกข้าว ซึ่งเป็นส่วนของคัพภะ อีกส่วนหนึ่งซึ่งเป็นส่วนใหญ่ของเมล็ด คือส่วนที่เป็น starchy endosperm จะมีลักษณะเป็นแป้งสีขาวหรือใส ในข้าวเจ้าจะมีสีใส ส่วนข้าวเหนียวจะมีสีขาวขุ่น (ทรงเชาว์, 2545)

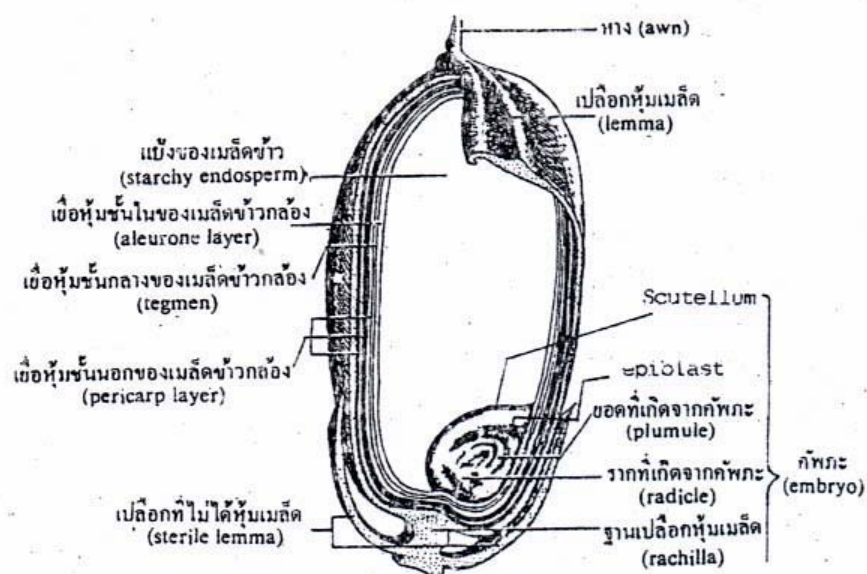
เมล็ดข้าวเปลือกประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ จากภายนอกเข้าไปดังนี้ (ภาพ 1)

1. เยื่อหุ้มข้าวกล้อง (caryopsis coat) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ได้แก่ เยื่อชั้นนอก (pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) และเยื่อคั่น (nucellus)

2. เยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด (aleurone layer) อยู่ด้านในต่อจากเยื่อคั่น (nucellus) เป็นเนื้อเยื่อชนิดเดียวกับเนื้อเมล็ด (endosperm) เซลล์ของเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ดประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน

3. ส่วนที่เป็นแป้ง (starchy endosperm) หรือส่วนที่เป็นข้าวสารจะอยู่ชั้นในสุดของเมล็ดประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่และมีโปรตีนอยู่บ้าง

4. คัพภะ (embryo) เป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนที่เป็นแป้งทางด้านท้องของเมล็ด (ventral side) คัพภะ เป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นอ่อนต่อไป ดังนั้นจึงประกอบด้วย ต้นอ่อน (plumule) รากอ่อน (radicle) เยื่อหุ้มต้นอ่อน (coleoptile) และเยื่อหุ้มรากอ่อน (coleorhiza) เป็นต้น



ภาพ 1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา : ทรงเชาว์ (2545)

ข้าวญี่ปุ่น พันธุ์ Kitaake

ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake (*Oryza sativa* var. *japonica*) เป็นข้าวที่มีเมล็ดสั้น ป้อม มีความเหนียว และมีลักษณะเฉพาะตัว เป็นพันธุ์ที่มีการพัฒนาเพื่อให้ทนต่อความเย็นสำหรับปลูกใน Hokkaido (ประเทศญี่ปุ่น) และเป็นข้าวที่ไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง (photoperiod insensitive rice) คือ การออกดอกของข้าวพันธุ์นี้จะขึ้นอยู่กับอายุของข้าว แต่ข้าวพันธุ์นี้ไม่ทนต่อความแห้งแล้ง (Kan., 2009; Fang and Pennell, 2005)

ข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง

ข้าวเหนียวเป็นที่นิยมบริโภคเป็นอาหารหลักในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง (*Oryza sativa* var. *indica*) เป็นข้าวเหนียวที่ปลูกมากเป็นอันดับสามของภาคเหนือ และเป็นข้าวที่มีลักษณะที่ดี คุณภาพการขัดสีดี ข้าวที่หุงต้มอ่อนนุ่ม น้ำหนักเมล็ดดี โดยให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูง จำหน่ายได้ราคาดี เกษตรกรจึงนิยมปลูกกันมาก แต่ข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ปลูกได้เฉพาะในฤดูนาปีเท่านั้น อีกทั้งยังไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่, 2547)

คุณค่าทางอาหารของข้าว

องค์ประกอบทางเคมีของสารอาหารที่มีคุณประโยชน์ต่อร่างกายแบ่งออกเป็น 6 ประเภทคือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน แร่ธาตุ และน้ำ ข้าวมีปริมาณไขมันต่ำ แต่ไขมันที่ได้จากข้าวจะมีคุณภาพดี ไขมันของข้าวจะพบที่ชั้นในสุดของเยื่อหุ้มเมล็ด วิตามินจะพบที่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดชั้นในสุดและที่คัพภะ วิตามินที่มีอยู่ในข้าว เช่น กรดนิโคตินิก ไทอะมีน วิตามินบี 1 วิตามินซี ส่วนแร่ธาตุส่วนใหญ่พบที่บริเวณผิวนอกของเมล็ด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก

ส่วนโปรตีนจะมียูหนานที่บริเวณผิวนอกของเมล็ดข้าว (aleurone layer) ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวกล้องจะมีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 4.3-18.2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับข้าวกล้องพันธุ์จางปอนิกาจะมีโปรตีนเฉลี่ย 11.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ข้าวกล้องพันธุ์อินดิกาจะมีโปรตีนเฉลี่ย 9.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนข้าวกล้องไทยมีโปรตีนเฉลี่ย 7.84 เปอร์เซ็นต์ (บุญหงส์, 2547) ปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวจะค่อนข้างต่ำ กรดอะมิโนที่มีอยู่น้อยที่สุด คือ กรดอะมิโนไลซีน และทริปโตเฟน (อัมมาร และวิโรจน์, 2533)

จากตาราง 1 สังเกตที่อัตราส่วน A/T ซึ่งเป็นค่าที่ใช้เป็นบรรทัดฐานในการพิจารณาปริมาณสารอาหารโปรตีนว่าเพียงพอที่จะช่วยในการเจริญเติบโตของร่างกายหรือไม่ โดยค่า A คือปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายแต่ละตัว ส่วนค่า T เป็นค่ามาตรฐานขององค์การอนามัยโลก คือถ้ามีค่า A/T สูงกว่า 70 ถือว่าเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพดี จากตารางพบว่าคุณภาพโปรตีนของข้าวพันธุ์

เหี่ยวส้นปาดองมีค่า A/T น้อยกว่า 70 แสดงว่าคุณภาพโปรตีนของข้าวพันธุ์เหี่ยวส้นปาดองมีคุณภาพค่อนข้างต่ำ (อัมมาร และวิโรจน์, 2533)

ตาราง 1 ปริมาณกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่จำเป็นต่อร่างกายที่มีอยู่ในข้าวเหี่ยวพันธุ์ต่างๆ 100 กรัม

พันธุ์ข้าว	ปริมาณโปรตีน (กรัม)	Lysine	Methionine	Tryptophan	A/T ที่ ต่ำสุด	กรดอะมิโนที่ มี A/T ต่ำสุด
เหี่ยวส้นปาดอง	8.4	253	120	91	55	Lysine
เหี่ยว กข2	8.3	218	67	73	47	Lysine
เหี่ยวดำ	8.2	272	112	99	60	Lysine
เหี่ยวหางอี 71	6.9	210	99	57	55	Lysine
เหี่ยวหมยทอง	7.0	216	117	74	56	Lysine

ที่มา: ดัดแปลงจาก อัมมาร และวิโรจน์ (2533)

โปรตีนนมผึ้ง

ในปัจจุบัน นมผึ้ง (royal jelly; RJ) ได้รับความสนใจมากในฐานะอาหารเพื่อสุขภาพ มีหลายๆ งานวิจัยที่ได้ศึกษาโปรตีนนมผึ้ง เช่น Taniguchi et al. (2003) พบว่า นมผึ้งช่วยให้บาดแผลหายเร็วขึ้น และช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Kohno et al. (2004) ซึ่งพบว่านมผึ้งช่วงลดการอักเสบของผิวหนังได้ นอกจากนี้นมผึ้งยังช่วยยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งได้อีกด้วย จากการศึกษาของ Kimura et al. (2003) พบว่านมผึ้งที่ความเข้มข้น 300 หรือ 600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมจะทำให้เนื้องอกในตับหนูมีน้ำหนักลดลง

นมผึ้งถูกสร้างขึ้นจากผึ้งพยาบาลโดยต่อมไฮโปฟารินเจียล (hypopharyngeal) และแมนดิบิวลาร์ (mandibular) ซึ่งจะถูกใช้เป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่จะเจริญเป็นผึ้งนางพญา จากการศึกษา

ของ Takenaka and Takenakan (1996) ในผึ้งโพรงฝรั่ง (*A. mellifera*) พบว่า องค์ประกอบที่สำคัญของนมผึ้ง คือ โปรตีน ซึ่งมีสูงถึง 12.7 ± 0.8 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 11.9 ± 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรตีนส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่ม MRJP (Major royal jelly protein) ซึ่งคิดเป็น 82-90 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนนมผึ้งทั้งหมด โดยสามารถจำแนกได้ 5 กลุ่ม คือ MRJP1 MRJP2 MRJP3 MRJP4 และ MRJP5 มีขนาดประมาณ 49-87 kDa (Schmitzova et al., 1998)

สำหรับผึ้งโพรงของไทย (*Apis cerana*) Duangporn et al. (2003) ได้ทำ expressed sequence tag (EST) library และตรวจสอบโปรตีนของยีน *AcMRJP1* พบว่ามีลำดับเบส 1,299 bp และสามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 433 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสกับยีน *AmMRJP1* ของผึ้งโพรงฝรั่ง (*Apis mellifera*) พบว่า มีโครงสร้างของยีนคล้ายยีน *AmMRJP1* ถึง 93 เปอร์เซ็นต์

Imjongjirak et al. (2005) ได้ทำการโคลน cDNA ของโปรตีน MRJP1 และ MRJP2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากในนมผึ้ง พบว่า ยีน *AcMRJP1* (GenBank accession no. AF525776) และ *AcMRJP2* (GenBank accession no. AF525777) มีลำดับเบส 1,302 และ 1,392 bp ตามลำดับ ซึ่งแปลรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 433 และ 463 ตัว ตามลำดับ โปรตีน MRJP1 และ MRJP2 ที่ได้จากการแปลรหัสมีกรดอะมิโนจำเป็น 47.5 และ 44.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *MRJP1* และ *MRJP2* cDNA ของผึ้งโพรงฝรั่ง (*A. mellifera*) 93 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกเป็นโปรตีนของยีน *AcMRJP1* และ *AcMRJP2* โดยมีการแสดงออกภายในเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ Rosetta (DE3) pLysS และวิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า *AcMRJP1* มีน้ำหนักโมเลกุล 47.9 kDa ส่วน *AcMRJP2* มีน้ำหนักโมเลกุล 51.7 kDa เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์แล้วได้ปริมาณโปรตีนประมาณ 20 และ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

มีรายงานการถ่ายยีน *mrjp1* ซึ่งโคลนได้จากผึ้งโพรงฝรั่ง ในยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L. cv.Wi38) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย เมื่อวิเคราะห์โปรตีนในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิค Immunoblot พบการแสดงออกของยีน *mrjp1* ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม (Judova et al., 2004)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการคัดเลือกหลังการผสมข้ามพันธุ์แบบดั้งเดิมใช้เวลานานหลายปีกว่าจะคัดเลือกได้พันธุ์ใหม่ที่ดียิ่ง การนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเป็นอีกวิธีหนึ่งเพื่อที่จะลดระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง และได้ลักษณะตามที่ต้องการโดยไม่เกิดการสูญเสียลักษณะที่ดีของแต่ละพันธุ์ไป ซึ่งเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ แบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การใช้ไมเลกุลเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ และเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ การถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมพืชโดยตรง และการถ่ายยีนโดยใช้พาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์

การถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมพืชโดยตรง

วิธีนี้จะไม่อาศัยตัวกลางหรือพาหะในการนำยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืช เช่น การใช้สารเคมีโพลีเอทิลีนไกลคอล การใช้กระแสไฟฟ้า การใช้เครื่องยิงอนุภาค ซึ่งมีรายงานที่ประสบความสำเร็จสำหรับการใช้สารโพลีเอทิลีนไกลคอลในการถ่ายยีนเข้าสู่โปรโตพลาสต์ของข้าวอินดิกา พันธุ์ IR54 (Peng et al., 1990) ส่วนการใช้กระแสไฟฟ้ามีรายงานความสำเร็จในข้าวจาปอนิกา (Toki et al., 1992) ซึ่งทั้ง 2 วิธีมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ยาก

การใช้เครื่องยิงอนุภาคปัจจุบันเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ทำได้โดยใช้อนุภาคเล็กๆ ของทอง หรือทังสเตน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-5.0 ไมครอน เคลือบด้วยดีเอ็นเอ ที่ต้องการถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช อนุภาคโลหะที่ถูกเคลือบด้วยดีเอ็นเอ จะถูกส่งเข้าสู่เซลล์โดยใช้ความดัน (กษิตติ, 2544) โดยมีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการถ่ายยีนในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวอินดิกา และจาปอนิกา ข้าวสาลี และข้าวโพด (Lazzeri and Shewry, 1993) สำหรับในข้าวไทย ลาวลย์และคณะ (2543) ได้ทำการถ่ายฝากยีน *wci* ของถั่วพูให้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อให้ข้าวแปลงพันธุ์สามารถต้านทานต่อแมลงบัวและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ มียีนเข้าไปหลายชุด ซึ่งทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่สูง อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับกับการเกิด Gene silencing (Al-Forkan. et al., 2004)

การถ่ายยีนโดยใช้พาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย เป็นวิธีการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช ภายในแบคทีเรียมีดีเอ็นเอที่เป็นวงหรือ พลาสมิด Ti (tumor inducing plasmid) เป็นตัวชักนำให้เกิดการส่งถ่ายยีนบน Ti plasmid ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่เรียกว่า T-DNA จะถูกส่งจากแบคทีเรียเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์พืชแล้วรวมตัวเข้ากับโครโมโซมพืช (กษิตศ, 2544)

Agrobacterium tumefaciens แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการถ่ายยีนในพืชแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ virulence (*vir*) gene ใน Ti plasmid โดย *virA* จะทำหน้าที่จดจำต่อสารประกอบฟีโนลิก เช่น 4-acetyl-2,6-dimethoxyphenol (acetosyringone) ซึ่งจะเกิดหลังจากที่พืชเกิดบาดแผล หลังจากนั้นจะไปกระตุ้น *virG* ให้มีการแสดงออก ซึ่ง *virG* จะทำหน้าที่กระตุ้น *vir* อื่นๆ ให้ทำงาน (Zupan and Zambryski, 1995) ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของยีน *vir* จะทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเพิ่มสูงขึ้นด้วย จึงได้มีการพัฒนาระบบ super binary vector ขึ้น เพื่อช่วยให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ดังรายงานของ Hiei et al. (1994) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการถ่ายยีนระหว่างเวกเตอร์ 2 ชนิด โดยชนิดแรกคือ pIG121Hm ซึ่งเป็น binary vector แบบธรรมดา กับ pTOK233 ซึ่งเป็น super binary vector โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 พบว่าพลาสมิด pTOK233 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนสูงขึ้น

การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมีข้อดี คือ ประหยัด เนื่องจากไม่ใช้เครื่องมือและวัสดุที่มีราคาแพง ทำให้สะดวกในการถ่ายยีน อีกทั้ง ดีเอ็นเอที่ถ่ายยีนเข้าไปมีการจัดเรียงตัวใหม่บ่อย และยีนที่ถ่ายยีนเข้าไปนั้นสามารถถ่ายยีนต่อสู่รุ่นต่อไปได้อย่างเสถียร (Hiei et al., 1997) แต่ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียในข้าวยังต่ำอยู่ จึงมีงานวิจัยต่างๆ เกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการถ่ายยีนในข้าวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น (ประภา และพรทิพย์, 2537; ช่อทิพา และคณะ 2548; บุณตศักดิ์ และคณะ 2549; Smith and Hood, 1995; Toki, 1997)

การถ่ายยีนในข้าวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียประสบความสำเร็จครั้งแรกในปี 1993 เมื่อ Chan et al. (1993) ได้รายงานถึงความสำเร็จของการถ่ายยีนในข้าวจากปอนิกา ตั้งแต่นั้นมาก็เริ่มมีการพัฒนาและส่งถ่ายยีนที่มีความสำคัญ เช่น ยีนต้านทานโรคและแมลง ยีนที่ช่วยให้ข้าวทนทานต่อยา

ปราบวัชพืช เช่น Cheng et al. (1998) ได้ถ่ายยีน *CryIA (b)* และ *CryIA (c)* เข้าสู่ข้าวโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเพื่อต้านทานแมลง และศัตรูของข้าว Cao et al. (2004) ได้ถ่ายยีนที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไกลโฟเสทเข้าไปในเซลล์ข้าว สำหรับข้าวไทยก็มีรายงานความสำเร็จในการส่งถ่ายยีนที่ต้านทานโรคและแมลง เช่น เกศสุคนธ์ และคณะ (2548) รายงานการถ่ายยีนโคทิเนสเข้าสู่ข้าวสุพรรณบุรี 1 โดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 เพื่อให้ข้าวมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคใหม่ได้

เอนโดสเปิร์มของข้าว คือส่วนที่ไขบริโภคมะเร็งมีสารอาหารที่จำเป็นน้อย เช่น โปรตีน วิตามิน A ธาตุเหล็ก จึงได้มีความพยายามที่จะเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในข้าวให้มากขึ้น เช่น Ye et al. (2000) ได้ทำการย้ายยีนที่สร้าง β -carotene จากดอกแดฟโฟดิล โดยให้มีการแสดงออกที่เอนโดสเปิร์ม โดยถ่ายยีน *psy* ซึ่งยีนนี้จะอยู่ภายใต้โปรโมเตอร์ *Gt1* (endosperm-specific promoter) ซึ่งทำให้มีการแสดงออกที่เอนโดสเปิร์มเท่านั้น จากการทดลองพบว่าการสะสมของแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ซึ่งทำให้ได้เมล็ดสีเหลืองทอง อีกคณะหนึ่งที่ได้ทำการศึกษเพื่อเพิ่มธาตุเหล็กในข้าว คือ Goto et al. (1999) ได้รายงานว่าสามารถถ่ายยีน soybean ferritin ในข้าวจากปอนิกาพันธุ์ Kitaake ได้ ทำให้มีการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว เนื่องจากยีนนี้ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *Glub-1* (glutelin promoter) ซึ่งทำให้เมล็ดข้าวมีธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่าเมื่อเทียบกับเมล็ดจากต้นข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

ความสำเร็จในการถ่ายยีนขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น ขึ้นส่วนพืช สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงแคลลัส การชักนำให้เกิดต้น สภาวะการเพาะเลี้ยงร่วม ผลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของแคลลัส การคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน และสายพันธุ์ของอะโกรแบคทีเรีย (Hiei et al., 1997)

แคลลัสเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีน แคลลัสที่ใช้ควรเป็นแคลลัสที่มาจากบริเวณ scutella (เนื้อเยื่อรอบๆ คัพภะ) ซึ่งแคลลัสที่เกิดจากบริเวณนี้จะมีลักษณะที่ดี คือเป็นแคลลัสที่มีสีเหลืองอ่อนและมีลักษณะกลม แน่น และพร้อมสำหรับการถ่ายยีน (Toki et al., 2006)

สูตรอาหารที่ใช้ในการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน โดย Toki (1997) พบว่าอาหารสูตร N6 ที่มี casamino acid 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีโพสเฟต 2.88 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ได้แคลลัสที่มีลักษณะที่ดี

เมื่อนำมาถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่าแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเกิดต้นได้ภายใน 2 เดือน ซึ่งทำให้ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนโดยใช้เวลาเพียง 2 เดือน สอดคล้องกับการทดลองของ Hiei et al. (1994) ซึ่งพบว่าแคลลัสที่ได้จากบริเวณ scutella เป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ LBA4404 (pTOK233) โดยพบว่าแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน *gusA* 12.8 – 28.6 เปอร์เซ็นต์

สำหรับข้าวไทย (*Oryza sativa* var. *indica*) มีหลายๆ งานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาสู่อาหารที่เหมาะสมสำหรับแคลลัส เช่น งานวิจัยของ ประภา และพรทิพย์ (2537) ได้เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวหอม พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 บนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ casamino acid 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าจะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง (96.3 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ เกศสุคนธ์ และคณะ (2548) ได้การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เกิดแคลลัส พบว่า สูตรอาหาร N6 ที่เติม casamino acid 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA และ 2,4-D เป็นสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Thadavong et al. (2002) ได้ทำการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสของข้าว พันธุ์ TDK1 พบว่าการใช้ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพรลีน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูงที่สุด (96.91 เปอร์เซ็นต์) และให้แคลลัสขนาดใหญ่เฉลี่ย 6.02 มิลลิเมตร

สภาวะในการเพาะเลี้ยงร่วมของแคลลัสและอะโกรแบคทีเรีย เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีน โดยช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการแช่ และจำนวนวันที่ใช้เพาะเลี้ยงร่วมระหว่างแคลลัสกับเชื้ออะโกรแบคทีเรีย มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วย สำหรับช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการแช่แคลลัสร่วมกับอะโกรแบคทีเรีย มีรายงานของ เกศสุคนธ์ และคณะ (2548) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายยีนของแคลลัสข้าวสุพรรณบุรี 1 พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการแช่แคลลัสมากที่สุดคือ 50 นาที โดยพบการแสดงออกของยีน *gusA* มากที่สุด

สารฟิโนลิก เช่น acetosyringone จะทำงานร่วมกับปัจจัยภายนอกอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ และกรด ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของยีน *vir* ในเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (Huw et al., 2005) ทำให้มีการส่งถ่ายยีนขึ้นที่สนใจได้ดียิ่งขึ้น ดังในรายงานของ Saharan (2004) ที่พบว่าความเข้มข้นของ acetosyringone ที่ 400 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนในข้าวอินดิกา พันธุ์ HKR-46 และ HKR-126 มากที่สุด เนื่องจากการแสดงออกของยีน *gusA* มากที่สุด 28.9 และ 44.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างจากการทดลองของ Hiei et al. (1994) ซึ่งพบว่า acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนแคลลัสของข้าวจาปอนิกา พันธุ์ Tsukinohikari Asanohikari และ Kosihikari โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในงานวิจัย

1. ข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่
2. ข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas W Okita จาก Institute of Biological Chemistry Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา

สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และแบคทีเรีย

สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อะโกรแบคทีเรีย และการถ่ายยีน
ดัดแปลงจาก Toki (1997)

พลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

แผนที่โครงสร้างพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย

พลาสมิด pET-*mrjp2* ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์.ดร.ศิริพร สิทธิ
ประณีต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พลาสมิด pYW502 และ pCAMBIA1301 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Thomas
W Okita จาก Institute of Biological Chemistry Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา

วัสดุ และ อุปกรณ์

1. กระบอกตวง
2. กระดาษกรอง
3. ขวดรูปชมพู่
4. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
5. ข้อนตักเชื้อ
6. ตะแกรง
7. บีกเกอร์
8. ปากคืบ
9. ไมโครปิเปต
10. ทิป
11. พลาสติกห่อ
12. หลอดพลาสติก
13. หลอดไมโครทิวป์
14. Kodak Medical X-Ray Cassette with Kodak Green 400 screens 8×10 inch
(Kodak, USA)
15. แผ่นฟิล์ม CL-X Posure™ Film 5×7 inch Clear Blue X-Ray film Lot#
HL1033597 (PIERCE, USA)
16. แผ่นเมมเบรน ชนิด PVDF (BioTrace PVDF membrane, Pall, USA)

เครื่องมือ

1. เครื่องเขย่า Innova 2100 (New Brunswick Scientific)
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง Sartorius Professional Meter PP-50
(Sartorius)
3. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น PG802-S (Mettler Toledo)
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AG285 (Mettler Toledo)
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R
(Hettich)

6. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
รุ่น Harrier 18/80 Refrigerated (Sanyo)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Biofuge Pico (Sorvall)
8. เครื่อง Spectrophotometer (Perkin Elmer)
9. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส Gel Mate 2000 (Toyobo)
10. เครื่อง Microplate Reader รุ่น 680XR (Bio Rad)
11. เครื่องพีซีอาร์ PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research)
12. เครื่อง PowerPac HC High-Current Power Supply (Bio Rad)
13. เครื่อง Vertical Electrophoresis (Mini-PROTEAN 3 cell) (Bio Rad)
14. เครื่อง Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell (Bio Rad)
15. ตู้ปลอดเชื้อ Class IIA/B3 biological safety (Forma scientific)
16. เครื่อง vortex GENIE-2 (Scientific industry)
17. ตู้เลี้ยงต้นไม้ Plant Growth Cabinet รุ่น GS-1000CL
18. ตู้อบแห้ง BINDER
19. ไมโครเวฟ รุ่น Intell wave (LG)
20. หม้อน้ำความดันไอน้ำ (Astell)

สารเคมี

1. 2,4 -Dichlorophenoxyacetic acid (Phytotechnology)
2. 2-Mercaptoethanol (Bio – Rad)
3. 2-propanol (isopropanol) (Merck)
4. 3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone (acetosyringone) (Fluka)
5. 6-Benzylaminopurine (BA) (Phyto technology)
6. Acetic acid (Merck)
7. Ammonium Nitrate (J.T.Baker)
8. Ammonium Persulfate (Bio – Rad)
9. Ammonium sulphate (Ajax finechem)
10. Amoxycillin - Clavulanate potassium (Glaxo SmithKline)
11. α-Naphthaleneacetic acid (NAA) (Phytotechnology)
12. Boric acid (Fisher scientific)

13. Bromophenol blue (Fisher scientific)
14. Calcium chloride dehydrate (Merck)
15. Casamino Acids Powder (Bio Basic Inc)
16. Casein Hydrolysate (Fluka)
17. Chloroform (Lab-Scan)
18. Cobalt (II) chloride (Ajax finechem)
19. Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio – Rad)
20. Copper (II) sulfate (Fisher scientific)
21. D(-) Sorbitol (Merck)
22. D-glucose anhydrous (Fisher scientific)
23. Diaminoethanetetra-acetic acid disodium salt (EDTA) (Fisher scientific)
24. Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck)
25. di-Potassium hydrogen orthophosphate anhydrous (Fisher scientific)
26. di-Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous (Fisher scientific)
27. D-sorbitol, powder (Bio Basic Inc)
28. Ethanol (Merck)
29. Gelrite (Sigma)
30. Glycerol 87 % (Merck)
31. Glycine (Fisher scientific)
32. Hydrochloric acid (Merck)
33. Iron(II) sulfate (Fisher scientific)
34. Iso-butyl alcohol (Isobutanol) (Fisher scientific)
35. Kinetin (6-furfurylaminopurine) (Phytotechnology)
36. L-Arginine (Fluka)
37. L-Asparagine (Sigma)
38. L-Aspartic acid (Sigma)
39. L-Glutamine (Fluka)
40. L-Proline (AMRESCO)
41. Magnesium sulfate (Fisher scientific)
42. Maltose (Monohydrate) (Merck)
43. Manganese(II) sulphate, monohydrate (Ajax finechem)
44. Methanol (Merck)

45. Molecular biology Agarose (Bio – Rad)
46. myo-Inositol (Fluka)
47. N,N,N,N-Tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED) (Bio – Rad)
48. Nicotinic acid (Fluka)
49. Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) (Phyto technology)
50. Potassium chloride (Merck)
51. Potassium dichromate (Fisher scientific)
52. Potassium dihydrogen orthophosphate (Fisher scientific)
53. Potassium hexaacyanoferrate(II) (Ferrocyanide) (Fisher scientific)
54. Potassium hexaacyanoferrate(III) (Ferricyanide) (Fisher scientific)
55. Potassium hydroxide (Merck)
56. Potassium iodide (Ajax finechem)
57. Potassium nitrate (Merck)
58. Pyridoxine Hydrochloride (Fluka)
59. Sodium chloride (Merck)
60. Sodium dinarydrogen orthophosphate dehydrate (Fisher scientific)
61. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Bio-Rad)
62. Sodium Hydroxide (Merck)
63. Sucrose (BDH Laboratory)
64. Vitamin B1 Hydrochloride (Thiamine .HCL) (Fluka)
65. X-Gluc (100mM X-Gluc in Dimethylformamide) (Bio Basic Inc)
66. Zinc sulphate (Ajax finechem)
67. 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide (X-gluc) (Bio Basic Inc)
68. 10% โซเดียมไฮโปคลอไรท์
69. น้ำยา Kodak GBX Developer
70. น้ำยา Kodak GBX Fixer

สารปฏิชีวนะที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (A.G. scientific Inc, USA)
2. สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (Biobasic Inc, USA)
3. สารปฏิชีวนะไทเมนทิน (Glaxo SmithKline, USA)

4. สารปฏิชีวนะไธราเพมพิซิน (Siamphamceu, ไทย)

เอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA)
2. เอนไซม์ *pfu* DNA polymerase (Fermentas, USA)
3. เอนไซม์ T4 DNA ligase (NEB, USA)
4. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I (NEB, USA)
5. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I (NEB, USA)
6. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (NEB, USA)
7. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*II (NEB, USA)
8. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (NEB, USA)
9. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I (NEB, USA)
10. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cla*I (NEB, USA)

ดีเอ็นเอ และโปรตีนเครื่องหมาย

1. 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA)
2. 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA)
3. λ HindIII/EcoRI (Fermentas, USA)
4. Mass Ruler DNA ladder (Fermentas, USA)
5. PageRuler Unprestrained Protein ladder (Fermentas, USA)
6. PageRuler Prestrained Protein ladder (Fermentas, USA)
7. Prestrained Protein Molecular Weight ladder (Fermentas, USA)
8. 6X His Protein ladder (QIAGEN, USA)

ชุดทดลองสำเร็จรูป (Kit) ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ชุด GeneClean II Kit (Bio101 Inc, USA)

2. ชุด GeneJet mini prep Kit (Fermentas, USA)
3. ชุด Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel, France)
4. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ Master pure RNA purification (Epicentre, USA)
5. ชุด SuperSignal West His Probe kit (Pierce, USA)
6. ชุด QIAExpress Anti His HRP Conjugate Kits (QIAGEN, USA)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ไพรเมอร์ที่สั่งจาก Bio Service Unit (BSU) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) มีดังนี้

1. seq5 5'-GTC CAC CCT TAC CGA TTT TGT TAG-3'
2. seq3 5'-GAA GAG CTT CCA CAT TTC GTA GG-3'
3. Fmrjp 5'-AGC GAA GAA AGA AGA CAA GCT GC-3'
4. Rmrjp 5'-CGC AAT GAG TAT TTC TCA TTA ATT CC-3'
5. F1mrjp 5'-TGT GCT CCA AAG TTG CAT GT-3'
6. R1mrjp 5'-ACG CCA TCT TTC GAT ACT GC-3'
7. F_XbaImrjp2 5'-GCT CTA GAA TGG CTA GCC ATC ATC AT-3'
8. R_SacImrjp2 5'-CCC GAG CTC ATT ATC ATT CTA ATT GTT AG-3'
9. R_SacImrjp2 5'-CCC GAG CTC ATT ATC ATT CTA ATT GTT AG-3'

ไพรเมอร์ที่สั่งจาก Bio basic Inc. ประเทศไทย มีดังนี้

F1EcoRI 5'-Cgg AAT TCC ATC ATC ATC ATC ATC ATg CCA TTA TTC g-3'

วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งการทดลองออกเป็น 8 การทดลอง ดังนี้

1. การสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนในข้าว
2. การถ่ายยีน *mrjp2* เข้าสู่แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake
3. การตรวจสอบการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS Assay
4. การวิเคราะห์การแทรกยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์
5. การวิเคราะห์การถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูก
6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยเทคนิค RT-PCR
7. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนโดยเทคนิค Western blotting
8. การวิเคราะห์การแทรกของยีนและจำนวนชุดยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค Southern blot

วิธีการทดลอง

1. การสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนในข้าว

1.1 การสร้างพลาสมิดสายผสม pBU3 (*Gt1* :: *mrjp2* :: Tnos)

การเตรียมชิ้นยีน

ชิ้นยีน *mrjp2* ได้จากพลาสมิด pET-*mrjp2* โดยยีน *mrjp2* จะอยู่ระหว่างบริเวณจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนคือ F_*Xba*Imrjp2 และ R_*Sac*Imrjp2 ซึ่งได้ออกแบบให้มีลำดับเบสที่เป็นจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I ดังนั้น ชิ้นยีน *mrjp2* ที่เพิ่มจำนวนได้จะสามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I ได้

เพิ่มชิ้นยีน *mrjp2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิด pET-*mrjp2* ความเข้มข้น 50 ng ซึ่งใช้เป็นเส้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 1X PCR buffer (*pfu*-MgSO₄)

MgSO₄ 3.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *pfu* DNA polymerase 1.25 หน่วย โดยใช้ไพรเมอร์ F_Xbalmrjp2 และ R_Saclmrjp2 สภาวะของพีซีอาร์ เครื่อง PTC-100 Thermal Cycler ที่ใช้ คือ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้น เข้าสู่ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Denaturation) 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Annealing) และ 72 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที (Extension) โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น วิเคราะห์ผลของพีซีอาร์ โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การเตรียมเวกเตอร์

พลาสมิด pYW502 โครงสร้างหลักของพลาสมิด pYW502 คือพลาสมิด pCAMBIA1301 (พลาสมิดชนิด Binary vector ซึ่งใช้สำหรับการถ่ายยีนในพืช) โดยจะมีส่วนของ *Gt1* promoter และ *nos* terminator ถูกโคลนอยู่ที่บริเวณ multiple cloning site โดย *Gt1* promoter จะทำให้ยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมมีการแสดงออกอย่างจำเพาะที่เอนโดสเปิร์มของเมล็ด

การเตรียมพลาสมิด pYW502 เพื่อใช้เป็นเวกเตอร์สำหรับการโคลนชิ้นยีน *mrjp2* ให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Gt1* promoter ทำได้โดยเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ DH5 α ที่มีพลาสมิด pYW502 เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นเลือกเซลล์เดี่ยวเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วนำเชื้อที่บ่มไว้ข้ามคืนมา 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารสูตรเดิม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วปั่นเก็บเซลล์ เพื่อนำมาสกัดพลาสมิด pYW502 ด้วยวิธี CTAB (ภาคผนวก ค)

การตัด และเชื่อมชิ้นยีน *mrjp2* กับเวกเตอร์ pYW502

นำพลาสมิด pYW502 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I ซึ่งในปฏิกิริยา 40 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิด pYW502 1.60 ไมโครกรัม 1X NE buffer เบอร์ 4 1X BSA และเอนไซม์ *Xba*I และ *Sac*I อย่างละ 20 หน่วย โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

นำชิ้นยีน *mrjp2* ที่เพิ่มจำนวนได้ จากเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I ซึ่งในปฏิกิริยา 40 ไมโครลิตร ประกอบด้วย *mrjp2* 2.50 ไมโครกรัม 1X NE buffer เบอร์ 4 1X BSA และเอนไซม์ *Xba*I และ *Sac*I อย่างละ 20 หน่วย

นำชิ้นยีน *mrjp2* และ pYW502 ที่ตัดสมบูรณ์แล้ว มาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ GeneClean II Kit แล้วนำชิ้นยีน *mrjp2* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเชื่อมเข้ากับ pYW502 โดยเตรียมปฏิกิริยา ligation โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ชิ้นยีน *mrjp2* และเวกเตอร์ pYW502 ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 1X ligation buffer และ T4 DNA ligase 400 หน่วยโดยบ่มที่ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ยีน *mrjp2* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Gt1* promoter โดยอยู่ระหว่างบริเวณจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *SacI*

การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เชื้อ *E. coli*

ใช้หลอดปฏิกิริยา ligation ซึ่งคาดว่าจะน่าจะมีการเชื่อมกันระหว่างชิ้นยีน *mrjp2* และ pYW502 ถ่ายเข้าในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณ โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่ได้ เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้ามคืน

นำเชื้อที่ได้มาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 คู่ คู่แรก คือ *XbaI* กับ *SacI* คู่ที่สอง คือ *EcoRI* กับ *PstI* คู่ที่สาม คือ *XbaI* กับ *BamHI* และคู่ที่สี่ คือ *XhoI* กับ *PstI* เพื่อยืนยันผลว่าเป็นพลาสมิดสายผสม ซึ่งมียีน *mrjp2* เชื่อมอยู่ในพลาสมิด pYW502 โดยตั้งชื่อพลาสมิดที่ได้ชื่อว่า pBU3

การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

ถ่ายพลาสมิดสายผสม pBU3 (*Gt1* :: *mrjp2* :: Tnos) เข้าในเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เพื่อใช้สำหรับการถ่ายยีนในข้าว โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pBU3 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB

การคัดเลือก และตรวจสอบเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสม

ใช้พลาสมิดที่สกัดได้จากเชื้ออะโกรแบคทีเรียมาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิด pBU3 50 ng 1X PCR buffer, MgCl₂ 2 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรมเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase 1.25 หน่วยโดยใช้ไพรมเมอร์ Fmrjp2 และ Rmrjp2 ซึ่งจำเพาะกับยีน *mrjp2* สภาวะของพีซีอาร์ เครื่อง PTC-100 Thermal Cycler ที่ใช้ คือ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้น เข้าสู่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Denaturation) 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Annealing) และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

(Extension) โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น วิเคราะห์ผลของพีซีอาร์ โดยเทคนิค อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

1.2 การวิเคราะห์ลำดับเบส และลำดับของกรดอะมิโนของยีน *mrjp2* ของพลาสมิด pBU3

ส่งพลาสมิด pBU3 ไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ BSU (Bio Service Unit) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) โดยใช้ไพรเมอร์ 6 เส้น คือ seq5' seq3' Fmrjp Rmrjp F1mrjp และ R1mrjp หลังจากนั้น นำลำดับเบสที่ได้มาทำ contig โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.05 นำ contig ที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีน *mrjp2* (Accession no.AF525777) ที่รายงานใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83

วิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.05 และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *mrjp2* ที่รายงานใน GenBank โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83

2. การถ่ายยีน *mrjp2* เข้าสู่แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake

2.1 การเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake

การวางแผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยแต่ละสภาวะ ใช้เมล็ดข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake 12 เมล็ดต่อเพลท มีทั้งหมด 13 เพลท

วิธีการ

นำเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake มาลอกเปลือกออก แล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 10% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ วางเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร N6D ที่มีปริมาณ โพรลีน 2.88 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส (Toki, 1997)

การบันทึกผลข้อมูล (หลังจากเลี้ยงแคลลัสในที่มืด 4 สัปดาห์)

1 วัดขนาดของแคลลัส โดยวัดความกว้างและความยาวของแต่ละกลุ่มแคลลัสและคำนวณขนาดจาก (ความกว้าง+ความยาว)/2

2.คำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส โดยนับจำนวนเมล็ดข้าวที่ถูกชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสต่อจำนวนเมล็ดข้าวทั้งหมด

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลแคลลัสที่ได้ มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IRRI stat รุ่น 4.03b (International Rice Research Institute (IRRI), Philippines)

2.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002)

การวางแผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ Split plot in CRD โดยแต่ละสภาวะใช้แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake สภาวะละ 2 เฟลท ประกอบด้วยปัจจัยดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ พันธุ์ข้าว ได้แก่ พันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake

ปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการถ่ายยีน ได้แก่ วิธีของ Toki (1997) กับ Endo et al. (2002)

วิธีการ

ถ่ายยีนตามวิธีของ Toki (1997) กับ Endo et al. (2002) แล้วย้ายแคลลัสลงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มีแสงสว่าง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การบันทึกผล

บันทึกจำนวนกลุ่มแคลลัสที่สามารถรอดอยู่ได้บนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 2 สัปดาห์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลจำนวนแคลลัสที่รอด มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IRRI stat รุ่น 4.03b

วิธีการถ่ายยีนที่ดัดแปลงจาก Toki (1997)

วิธีการถ่ายยีนที่ดัดแปลงจาก Toki (1997) ขีดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 ซึ่งมีพลาสมิด pBU3 และ pBU5 บนอาหารแข็งสูตร AB ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในขณะที่เดียวกันก็ทำการย้ายแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ลงอาหารใหม่สูตร N6D และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วันก่อนที่จะทำการถ่ายยีน หลังจากนั้น นำแคลลัสที่เตรียมไว้แล้วบ่มร่วมกับสารละลายอะโกรแบคทีเรียในอาหารสูตร AA ที่มี acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.50 นาที นำแคลลัสวางบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อซับเอาเชื้อ อะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกไป ย้ายแคลลัสวางบนอาหารแข็งสูตร 2N6-AS เพื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเชื้ออะโกรแบคทีเรียและแคลลัส นาน 3 วัน ในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ล้างแคลลัส ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้ง แล้วย้ายลงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และไทเมนทิน 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยย้ายลงอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ หลังจากนั้น ย้ายแคลลัสที่ต้านทานยาไฮโกรมัยซินลงอาหารสูตร MS ที่มี NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดต้น แล้วย้ายต้นอ่อนที่ได้ไปปลูกปรับสภาพในโรงเรือนกระจก

วิธีการถ่ายยีนที่ดัดแปลงจาก Endo et al. (2002)

วิธีการถ่ายยีนที่ดัดแปลงจาก Endo et al. (2002) จะคล้ายกับวิธีของ Toki (1997) แต่แตกต่างกันขั้นตอนการเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ซึ่งวิธีของ Endo et al. (2002) จะเริ่มจากขีดเชื้ออะโกรแบคทีเรียบนอาหารแข็งสูตร YEP แล้วเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาบ่มในอาหารเหลวสูตร YEP ที่มี acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้ววัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ให้ได้ 0.15 แล้วจึงนำสารละลายอะโกรแบคทีเรียไปบ่มร่วมกับแคลลัส

3. การตรวจสอบการถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay

นำชิ้นส่วนใบของต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน มาบ่มร่วมกับสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1–24 ชั่วโมง ชิ้นส่วนใบที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* จะสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase แล้วเปลี่ยน X-gluc ให้ได้สารสีฟ้า หลังจากนั้น ล้างคลอโรฟิลล์ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

4. การวิเคราะห์การแทรกยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์

4.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว (ดัดแปลงจาก Hwang and Kim (2000))

4.1.1 ตัดใบข้าว ให้มีน้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ และใส่ลูกปัด 3 ลูก

4.1.2 แช่หลอดในไนโตรเจนเหลว แล้วนำหลอดมาเขย่าโดยใช้เครื่อง vortex เพื่อบดใบข้าวจนได้ผงละเอียด

4.1.3 เติมสารละลาย mCTAB ซึ่งมี 1% 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือปรับตามความเหมาะสมของปริมาณใบที่บดได้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex

4.1.4 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที ผสมให้เข้ากัน ทุก 10 และ 20 นาที

4.1.5 บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.1.6 ย้ายเอาส่วนใสลงในหลอดใหม่

4.1.7 เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (หรือ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย mCTAB) เพื่อกำจัดโปรตีน แล้วทำการเขย่าด้วยเครื่อง vortex

4.1.8 บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.1.9 ย้ายชั้นน้ำด้านบนลงในหลอดใหม่ (ทำซ้ำข้อ 7 – 8 จนกระทั่งชั้นของโปรตีน (interphase) หายไป หรือเหลือน้อยมาก)

4.1.10 เติม absolute ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

4.1.11 บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.12 เท absolute ethanol ที่แห้งแล้วเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

4.1.13 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.14 ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วย Tris-HCl buffer 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ถ้ายังมีความหนืดของสารละลายมาก ให้เติมบัพเฟอร์เพิ่ม)

4.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในต้นข้าวโดยเทคนิคพีซีอาร์

ตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมดีเอ็นเอ 200 ng 1X PCR buffer $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพริเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1.25 หน่วยโดยใช้ไพริเมอร์ F1mrjp2 และ R1mrjp2 ซึ่งจำเพาะกับยีน *mrjp2* สภาวะของพีซีอาร์ เครื่อง PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) ที่ใช้ คือ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้น เข้าสู่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Denaturation) 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Annealing) และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Extension) โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น วิเคราะห์ผลของพีซีอาร์ โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

5. การวิเคราะห์การถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูก

นำเมล็ดแก่รุ่น T_1 ของต้นข้าวที่ให้ผลบวก เมื่อทดสอบด้วยวิธี GUS Assay และพีซีอาร์ มาเพาะให้งอกในน้ำเป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้น ย้ายต้นกล้าปลูกลงดิน ประมาณ 2 สัปดาห์ ตัดชิ้นส่วนใบมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gusA* โดยเทคนิค GUS Assay แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่า χ^2

6. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยเทคนิค RT-PCR

6.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนของข้าว

6.1.1 สกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Master pure RNA purification (Epicentre Kit) โดยเก็บเมล็ดระยะน้ำนมมา 10 เมล็ด แช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

- 6.1.2 เจือจาง Proteinase K 1 ไมโครลิตรใน Tissue and Cell Lysis Solution ตัวอย่างละ 300 ไมโครลิตร
- 6.1.3 บดเมล็ดอ่อนในไนโตรเจนเหลว และย้ายไปใส่ในหลอดไมโครทิวป์
- 6.1.4 เติมสารละลาย Tissue and Cell lysis solution 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าอย่างแรง
- 6.1.5 บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยนำมาเขย่าอย่างแรง ทุก 5 นาที
- 6.1.6 หลังจากนั้น นำมาวางบนน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติม MPC Protein Precipitation Reagent 175 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าอย่างแรง ประมาณ 10 วินาที
- 6.1.7 นำไปปั่นเหวี่ยง 10 นาที ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที
- 6.1.8 ดูดส่วนใส ใส่หลอดใหม่ ทั้งตะกอน
- 6.1.9 เติม isopropanol 500 ไมโครลิตร ขยับกรอกไปมาให้เข้ากัน 30-40 ครั้ง
- 6.1.10 นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ที่ 12,000 รอบต่อนาที
- 6.1.11 ดูด isopropanol ออกให้หมด โดยใช้ ปิเปต
- 6.1.12 เติม DNase I solution 200 ไมโครลิตร (RNase-Free DNase I 5 ไมโครลิตร 1XDNase buffer 195 ไมโครลิตร) ในแต่ละตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
- 6.1.13 เติมสารละลาย 2 X T and C lysis solution 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน
- 6.1.14 เติมสารละลาย MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 6.1.15 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 6.1.16 นำส่วนใส (อาร์เอ็นเอ) ใส่หลอดใหม่
- 6.1.17 เติม isopropanol 500 ไมโครลิตร ขยับกรอกไปมา 30-40 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ
- 6.1.18 ดูด isopropanol ออกให้หมดโดยใช้ปิเปต ระวังไม่ให้ปิเปตโดนตะกอน
- 6.1.19 ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยง นาน 1 นาที
- 6.1.20 ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง
- 6.1.21 ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอใน Tris HCl buffer 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 30 ไมโครลิตร

6.2 การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอในเมล็ดข้าวโดยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT – PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* ซึ่งในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอทั้งหมด 10 ไมโครลิตร 1X RT PCR buffer (1X *Tth* buffer) $MgCl_2$ 3 มิลลิโมลาร์ 1X Master Amp PCR Enhancer $MnSO_4$ 0.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.4 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.5 มิลลิโมลาร์ และ *Tth* DNA polymerase 2.5 หน่วย โดยใช้ไพรเมอร์ F1mrjp2 และ Rmrjp2 ซึ่งจำเพาะต่อยีน *mrjp2* สภาวะของพีซีอาร์ เครื่อง PTC – 100 Thermal Cycler ที่ใช้ คือ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเข้าสู่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (Denaturation) 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (Annealing) 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Extention) โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำอาร์เอ็นเอที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* ซึ่งในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอทั้งหมด 10 ไมโครลิตร 1X RT PCR buffer (1X *Tth* buffer) $MgCl_2$ 3 มิลลิโมลาร์ 1X Master Amp PCR Enhancer $MnSO_4$ 0.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 400 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Tth* DNA polymerase 2.5 หน่วย โดยใช้ไพรเมอร์ F1mrjp2 และ R1mrjp2 ซึ่งจำเพาะกับยีน *mrjp2* สภาวะของพีซีอาร์ เครื่อง PTC-100 Thermal Cycler ที่ใช้ คือ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเข้าสู่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (Denaturation) 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (Annealing) และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Extension) โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้น วิเคราะห์ผลของพีซีอาร์ โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

7. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนโดยเทคนิค Western Blotting

7.1 สกัดโปรตีนจากเมล็ดอ่อนและแก่ของข้าว

7.1.1 นำเมล็ดข้าวมา 10 เมล็ด แกะเปลือกออก

7.1.2 เติมน้ำโตรเจนเหลว เพื่อช่วยให้บดได้ละเอียดยิ่งขึ้น

7.1.3 เติม Extraction buffer 1 มิลลิเมตรในโกร่งบด แล้วบดอีกครั้งหนึ่ง (Extraction buffer ประกอบด้วย Tris-HCl pH 7.5 25 มิลลิโมลาร์ NaCl 100 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 0.1 มิลลิโมลาร์)

7.1.4 แช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที

7.1.5 ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

7.1.6 ดูดส่วนใส (โปรตีน) ใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน และทำ Western Blotting

7.2 การวัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้เครื่อง Micropate Reader รุ่น 680XR ตามคู่มือ Bio-Rad Protein Assay (Bio Rad, USA)

7.2.1 เตรียม dye reagent โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง Dye Reagent Concentrate กับ DDI water ที่ 1 ต่อ 4

7.2.2 กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman) เบอร์ 1

7.2.3 เตรียมโปรตีนมาตรฐาน (Standard BSA) เพื่อใช้เป็นตัวแทนของสารละลายโปรตีนที่ใช้ทดสอบ โดยเตรียมตั้งแต่ความเข้มข้น 0.1-1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

7.2.4 วิเคราะห์โปรตีนโดยปิเปตโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนตัวอย่างมาอย่างละ 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมใน Micropate โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

7.2.5 เติม dye reagent 200 ไมโครลิตรในแต่ละหลุม ผสมให้เข้ากัน

7.2.6 บ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง

7.2.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

7.3 การแยกโปรตีนโดยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

7.3.1 เตรียมเจลด้วยเครื่อง Vertical Electrophoresis (Mini-PROTEAN 3 cell) (Bio Rad) โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ 10% separating gel กับ 5% stacking gel (ภาคผนวก ก)

7.3.2 ผสมโปรตีนตัวอย่าง 15 ไมโครกรัม กับ 1X SDS loading buffer (Tris-HCl, pH 6.8 0.0625 ไมโครโมลาร์ กลีเซอรอล 25% SDS 2% (w/v) และ bromophenol blue 0.5% (v/v)) โดยให้มีปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มนาน 3-5 นาที ปิเปตโปรตีนตัวอย่างลงในช่องเจลระวังไม่ให้ข้ามช่อง

7.3.3 ให้กระแส 75 โวลต์ นาน 35 นาที หลังจากนั้นปรับขึ้นเป็น 150 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 40 นาที

7.4 การย้ายโปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรน และ Western Blot โดยใช้ QIAexpress Anti-His HRP conjugate Kit (Chemiluminescent method) ตามคู่มือ QIAexpress Detection and Assay handbook (QIAGEN, USA, 2002)

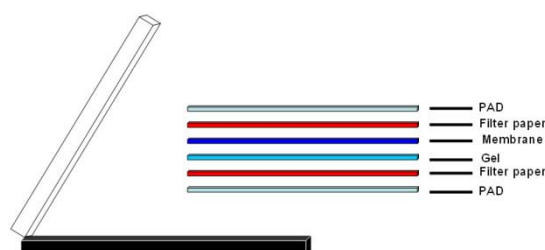
7.4.1 นำเมมเบรน ชนิด PVDF มาแช่ในเมทานอลก่อน ประมาณ 5 นาที

7.4.2 นำเอา PAD กระดาษกรอง และเมมเบรนมาแช่ใน Transfer buffer (Transfer buffer ประกอบด้วย Tris-HCl pH 7.5 25 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน 192 มิลลิโมลาร์ และ เมทานอล 20% (v/v) อย่างน้อย 15 นาที

7.4.3 นำเจลจากเทคนิค SDS-PAGE มาแช่ใน Transfer buffer

7.4.4 ประกอบตามภาพ (ภาพ 2)

7.4.5 ให้กระแส 100 โวลต์ 350 มิลลิแอมป์ นาน 1.5 ชั่วโมง โดยใช้เครื่อง Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell (Bio Rad)



ภาพ 2 ลักษณะการประกอบเจล กับแผ่นเมมเบรนในขั้นตอนการย้ายโปรตีนจากเจลลงบนแผ่นเมมเบรน

การทำ Western Blot

1). ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 1XTBS buffer 10 มิลลิลิตรให้ทั่ว เมมเบรน เขย่าประมาณ 10 นาที (TBS buffer ประกอบด้วย Tris-HCl pH 7.5 10 มิลลิโมลาร์ NaCl 150 มิลลิโมลาร์) แล้วเท บัพเฟอร์ทิ้ง

2). เติม Blocking buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 1 ชั่วโมง (Blocking buffer ประกอบด้วย 3%(w/v) BSA (Sigma, Cat No.A7906 in TBS buffer)

3). ล้างด้วย 1XTBST/Triton buffer นาน 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง (TBS/Triton buffer ประกอบด้วย Tris-HCl pH 7.5 20 มิลลิโมลาร์ NaCl 500 มิลลิโมลาร์ Tween20 0.05% (v/v) และ Triton X-100) 0.2% (v/v)

4). ล้างด้วย 1X TBS buffer นาน 10 นาที

5). บ่มกับ Anti-His HRP conjugate solution ใน Blocking buffer (1/2,000) นาน 2 ชั่วโมง

6). ล้างด้วย 1X TBST/Triton buffer นาน 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง

7). ล้างด้วย 1X TBS buffer นาน 10 นาที

- 8). เติม Chemiluminescent reagent (Pierce, USA) (Enhancer กับ Substrate ในอัตราส่วน 1:1) ใส่ให้ทั่วแผ่นเมมเบรน บ่มนาน 5 นาที ในที่มืด
- 9). ประกบฟิล์ม CL-X PosureTM Film (PIERCE) นาน 24 ชั่วโมง ใน Kodak Medical X-Ray Cassette 8×10 inch (Kodak)
- 10). นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาแช่ในน้ำยา Kodak GBX Developer ที่เจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
- 11). นำแผ่นฟิล์มมาแช่ในน้ำยา Kodak GBX Fixer ที่เจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
- 12). ตากแผ่นฟิล์มให้แห้ง

8. การวิเคราะห์การแทรกของยีนและจำนวนชุดยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิค

Southern blot

- 8.1 นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
- 8.2 แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้ 0.8% agarose gel ความต่างศักย์ 100 V นาน 90 นาที
- 8.3 ถ่ายรูปเจลเพื่อดูการตัดของเอนไซม์ว่าสมบูรณ์หรือไม่ และดูปริมาณดีเอ็นเอก่อนนำไป Blot (บันทึกภาพพร้อมกับไม้บรรทัด)
- 8.4 นำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอมาแช่ในสารละลาย Denaturation และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง
- 8.5 ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- 8.6 นำแผ่นเจลที่มีดีเอ็นเอมาแช่ในสารละลาย Neutralization และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง
- 8.7 แช่เจลอย่างน้อย 10 นาทีใน 20X SSC
- 8.8 ตัดกระดาษกรอง แผ่นไนลอนเมมเบรน ให้พอดีกับแผ่นเจล
- 8.9 นำกระดาษกรอง แผ่นไนลอนเมมเบรน สะพานกระดาษ มาจุ่มใน 20X SSC ให้ชุ่ม
- 8.10 วางสะพานที่ชุ่มไปด้วย 20X SSC และแช่อยู่ใน 20X SSC ก่อนตามด้วยวางกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย 20X SSC วางเจลคว่ำลงบนกระดาษกรอง ไล่ฟองอากาศออกให้หมด ประกบด้วยเมมเบรนที่ชุ่มด้วย 20X SSC ทับด้านบน ไล่ฟองอากาศ ปิดทับด้วยกระดาษกรองที่แห้งและชั้นกระดาษ แล้วกดทับด้วยน้ำหนักประมาณ 200 – 500 กรัม ทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปยังแผ่นเมมเบรน

- 8.11 ทำให้ดีเอ็นเอติดแน่นบนแผ่นเมมเบรนโดยล้างด้วย 2X SSC แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปอบที่อุณหภูมิ 80°C 2 ชั่วโมง
- 8.12 นำแผ่นเมมเบรนมา pre – hybridization ในสารละลาย hybridization 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 48 °C และเตรียมสารละลาย hybridization ให้มีอุณหภูมิ 48 °C ไปพร้อมกันด้วย
- 8.13 ใส่ probe ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีน *mrjp2* ที่ติดฉลากด้วย DIG โดยใช้ PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Germany) 10 µl ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 µl ต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที
- 8.14 ผสม probe ที่แยกสายแล้วลงในสารละลาย hybridization ที่ผ่านการอุ่นแล้ว เท pre – hybridization ที่ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย hybridization ลงใน hybridization bottom
- 8.15 บ่ม blot ร่วมกับ probe ที่ทิ้งไว้ 6 – 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 48 °C และหมุนตลอดเวลา
- 8.16 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Low stringency buffer 200 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 8.17 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย High stringency buffer 200 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 60 °C 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที
- 8.18 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Washing Buffer เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที
- 8.19 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Blocking Solution 100 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- 8.20 บ่มแผ่นเมมเบรนด้วย Antibody Solution เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
- 8.21 ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย Washing Buffer 100 มิลลิลิตร 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที
- 8.22 แช่แผ่นเมมเบรนใน Detection Buffer 20 มิลลิลิตร 3 นาที
- 8.23 เติม Chemiluminescent substrate (Enhancer กับ Substrate ในอัตราส่วน 1:100) ใส่ให้ทั่วแผ่นเมมเบรน บ่มนาน 5 นาทีในที่มืด
- 8.24 บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที
- 8.25 ประกอบฟิล์ม CL-XPosureTM Film (PIERCE) นาน 1 – 24 ชั่วโมง ใน Kodak Medical X-Ray Cassette 8×10 inch (Kodak)
- 8.26 นำแผ่นฟิล์มที่ได้มาแช่ในน้ำยา Kodak GBX Developer ที่เจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
- 8.27 นำแผ่นฟิล์มมาแช่ในน้ำยา Kodak GBX Fixer ที่เจือจางด้วยน้ำ 5 เท่า นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ
- 8.28 ตากแผ่นฟิล์มให้แห้ง

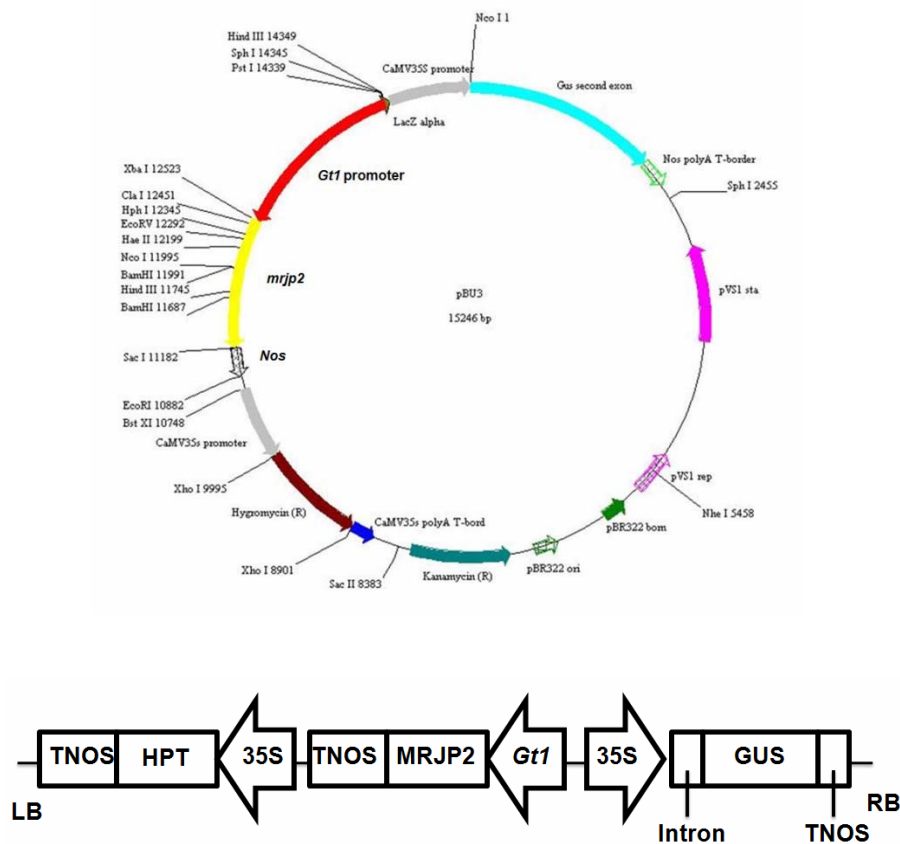
ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาการถ่ายยีน *mrjp2* เข้าสู่ข้าว เพื่อเพิ่มกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ดข้าว โดยการสร้างพลาสมิดสายผสมที่มียีน *mrjp2* สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวโดยวิธีใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* พลาสมิดสายผสมที่สร้างขึ้นมีโครงสร้าง (backbone) มาจากพลาสมิด pCAMBIA1301 ซึ่งเป็น binary vector สำหรับถ่ายยีนในพืช ในงานวิจัยนี้ได้สร้างพลาสมิด pBU3 ซึ่งยีน *mrjp2* อยู่ภายใต้การควบคุมของ *Gt1* promoter ทำให้ยีนมีการแสดงออกอย่างจำเพาะใน เอนโดสเปิร์มของข้าว และอยู่ภายใต้การควบคุมของ *nos* terminator

การสร้างพลาสมิดที่ใช้สำหรับการถ่ายยีนในข้าว

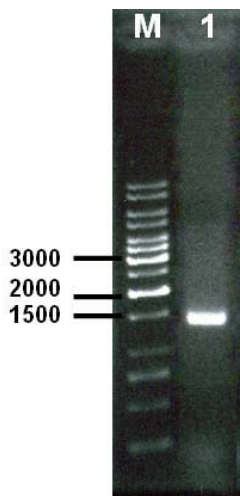
การสร้างพลาสมิดสายผสม pBU3 (*Gt1* :: *mrjp2* :: Tnos)

การสร้างพลาสมิด pBU3 (ภาพ 3) เป็นการนำยีน *mrjp2* ที่เพิ่มจำนวนได้ โดยเทคนิคพีซีอาร์ เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pYW502 ซึ่งเป็น binary vector ที่บริเวณจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *SacI* ดังนั้น การทำงานของยีน *mrjp2* จะอยู่ภายใต้การควบคุมของ *Gt1* promoter ซึ่งจะควบคุมให้มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ที่เอนโดสเปิร์มเท่านั้น เมื่อเพิ่มจำนวนขึ้นยีน *mrjp2* ที่อยู่ในพลาสมิด pET-*mrjp2* ซึ่งมียีน *mrjp2* ถูกโคลนอยู่ในพลาสมิด pET-17b ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F_*XbaI**mrjp2* ซึ่งมีบริเวณจุดตัดของเอนไซม์ *XbaI* ยื่นออกมาที่ปลาย 5' และใช้ไพรเมอร์ R_*SacI**mrjp2* ซึ่งมีบริเวณจุดตัดของเอนไซม์ *SacI* ยื่นออกมาที่ปลาย 3' จากนั้นวิเคราะห์ผลของพีซีอาร์ โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพ 4) ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *mrjp2* ที่มีขนาดประมาณ 1,359 bp



ภาพ 3 โครงสร้างพลาสมิด pBU3 (*Gt1:: mrjp2 ::Tnos*)

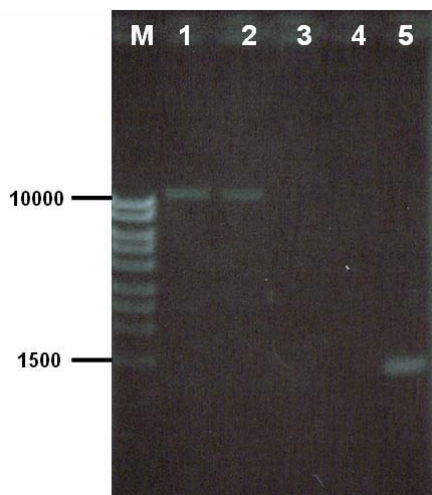
หมายเหตุ RB คือ right border LB คือ left border HPT คือ hygromycin phosphotransferase GUS คือ β -glucuronidase 35S คือ CaMV35s promoter *Gt1* คือ *Gt1* promoter TNOS คือ 3' signal ของ nopaline synthase MRJP2 คือ major royal jelly protein



ภาพ 4 การวิเคราะห์ยีน *mrjp2* ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

หมายเหตุ เลน M คือ แลปดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA ladder เลน 1 คือ ชิ้นยีน *mrjp2* (1,359 bp)

หลังจากนั้น นำพลาสมิด pYW 502 และชิ้นยีน *mrjp2* ที่ได้จากพีซีอาร์ (PCR-*mrjp2*) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I แล้วทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้น นำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดความเข้มข้น พบว่า pYW502 ที่ได้จากขั้นตอนการชะพลาสมิดออกจากคอลัมน์ ครั้งที่ 1 และ 2 (Elute 1 และ 2) มีความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วน PCR-*mrjp2* ที่ทำให้บริสุทธิ์ มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพ 5)



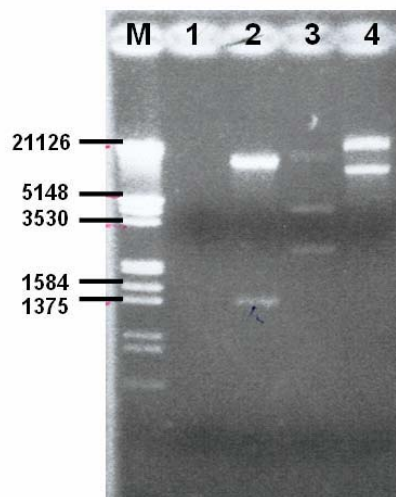
ภาพ 5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของพลาสมิด pYW502 และยีน *mrjp2* ที่ได้จากพีชีอาร์ ซึ่งนำมาตัด

ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I และทำให้บริสุทธิ์แล้ว

หมายเหตุ เลน M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Mass Ruler DNA ladder เลน 1 และ 2 คือ พลาสมิด pYW502 elute 1 และ 2 เลน 5 คือ PCR-*mrjp2*

นำชิ้นยีน *mrjp2* และพลาสมิด pYW502 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I ซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมกันด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase เพื่อให้ได้พลาสมิดสายผสม pBU3 (*Gt*1 :: *mrjp2* :: Tnos) หลังจากนั้นถ่ายเข้าในเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ซึ่งผลจากการทรานฟอร์มเมชันพบว่า ได้โคโลนีสีขาวเกิดขึ้น

เลือกโคโลนีสีขาวมา 4 โคโลนี เพื่อมาสกัดพลาสมิดโดยวิธี CTAB แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I เพื่อยืนยันว่าใช้พลาสมิดสายผสม pBU3 ซึ่งผลจากการทำ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า โคโลนีที่ 2 น่าจะใช้พลาสมิดสายผสม pBU3 เนื่องจาก เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Sac*I แล้ว ได้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง 2 แถบ คือ 13,905 bp และ 1,359 bp ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นส่วนของพลาสมิด pYW502 และชิ้นยีน *mrjp2* ตามลำดับ (ภาพ 6)



ภาพ 6 การวิเคราะห์พลาสมิดสายผสม pBU3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *SacI* โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

หมายเหตุ เลน M คือ แลบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII/EcoRI เลน 1-4 คือ โคลนีสที่ 1-4 ตามลำดับ

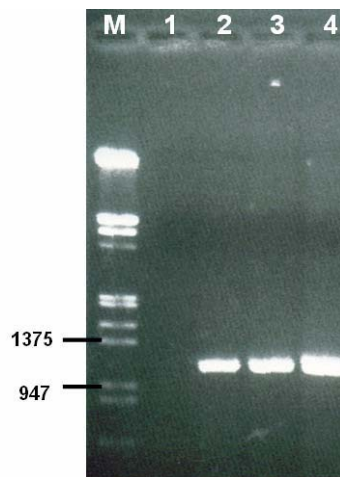
หลังจากนั้น นำพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้จากโคลนีสที่ 2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีก 2 คู่ เพื่อยืนยันความถูกต้องของพลาสมิด pBU3 โดย คู่แรก คือ *EcoRI* กับ *PstI* และคู่ที่สอง คือ *XhoI* กับ *PstI* แล้ววิเคราะห์ผลโดยการทำอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพ 7) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะคู่แรก คือ *EcoRI* กับ *PstI* ได้แลบดีเอ็นเอ 2 แล็บ คือขนาด 11,825 bp และ 3,439 bp ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าได้แลบดีเอ็นเอตรงตามที่คาดหวังไว้ เนื่องจากในแผนที่ของ พลาสมิดสายผสม pBU3 (ภาพ 3) มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *PstI* อย่างละ 1 ตำแหน่ง ซึ่งทั้งคู่อยู่ห่างกันประมาณ 3,439 bp คู่ที่สอง คือ *XhoI* และ *PstI* คาดว่าน่าจะได้แลบดีเอ็นเอ 3 แล็บ คือ 9,000 bp 3,500 bp และ 1,094 bp ซึ่งจากการวิเคราะห์ พบว่าได้แลบดีเอ็นเอตรงตามที่คาดหวังไว้



ภาพ 7 การวิเคราะห์พลาสมิด pBU3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

หมายเหตุ เลน M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII/EcoRI เลน 1 คือการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI กับ PstI เลน 2 คือการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XhoI และ PstI

หลังจากนั้น นำพลาสมิด pBU3 จากโคโลนีที่ 2 ถ่ายเข้าเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ AGL1 พบว่าได้โคโลนีสีขาวเกิดขึ้น หลังจากนั้น เลือกโคโลนีเดี่ยว มา 3 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งจำเพาะกับยีน *mrjp2* ผลจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพ 8) พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นยีน *mrjp2* ได้ ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 bp ซึ่งตรงตามที่คาดหวังไว้ จึงสรุปได้ว่าสามารถถ่าย พลาสมิด pBU3 เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียได้ ซึ่งจะนำ อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pBU3 ไปใช้สำหรับการถ่ายยีนในข้าวต่อไป



ภาพ 8 การวิเคราะห์เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pBU3 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

หมายเหตุ เลน M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน λ HindIII/EcoRI เลน 1 คือ น้ำ เลน 2-4 คือ ชิ้นยีน *mrjp2* ที่เพิ่มจำนวนได้จากพีซีอาร์ โดยใช้พลาสมิดที่สกัดจากเชื้ออะโกรแบคทีเรียโคลนที่ 1-3 เป็นแม่พิมพ์

การวิเคราะห์ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโนของยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pBU3

นำพลาสมิด pBU3 ที่สกัดได้ไปหาลำดับเบสบริเวณยีน *mrjp2* ที่ BSU (Bio Service Unit) แล้วเปรียบเทียบกับ *Gt1* promoter ที่รายงานใน GenBank (Accession no.M28156.1) โดยใช้โปรแกรม Clustal X พบว่า ลำดับเบสของพลาสมิด pBU3 ส่วนก่อนหน้า (upstream) ของยีน *mrjp2* (ภาพ 9) ที่ได้ คือลำดับเบสของ *Gt1* promoter (Accession no. M28156.1) (Okita et al., 1989) โดยพบลำดับเบสบริเวณ CAT box (GACATTAACAAA) และ TATA box (TCACTATAA) ที่ตำแหน่ง 90 และ 137 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบตำแหน่ง +1 ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการถอดรหัส ที่ลำดับเบสที่ 159 ด้วย

เมื่อนำส่วนยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pBU3 มาเปรียบเทียบกับ *mrjp2* ที่รายงานใน GenBank (Accession no.AF525777) พบว่า ลำดับเบสส่วนของยีน *mrjp2* (ภาพ 9) ที่ได้มีลำดับเบสคล้ายกับยีน *mrjp2* (Accession no.AF525777) โดยพบว่าลำดับเบสของยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pBU3 สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ โดยมีลำดับเบสบริเวณ start codon (ATG) และ stop codon (TAG) ที่

ตำแหน่ง 208 และ 1,573 ตามลำดับ โดยบริเวณ start codon จะอยู่ถัดจากตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* (TCTAGA) นอกจากนี้ยังพบบริเวณจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* (GAGCTC) ที่ตำแหน่ง 1,585 ด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *mrjp2* สามารถเชื่อมเข้ากับพลาสมิด pYW502 ที่ตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *SacI* ได้ จากลำดับเบส ยังพบส่วนของ 6XHis tag (CATCATCATCATCATCAT) ที่ตำแหน่ง 217 อีกด้วย โดยบริเวณนี้เป็นรหัสของกรดอะมิโน His ต่อกัน 6 ตัว ซึ่งทำให้โปรตีน MRJP2 สามารถจับกับ Anti-His ซึ่งจะช่วยในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับโปรตีนได้

เมื่อนำลำดับเบสหลังจากตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* ไปเปรียบเทียบกับ *nos terminator* ที่รายงานใน GenBank (Accession no.EU796373) พบว่า ลำดับเบสของพลาสมิด pBU3 ส่วนนี้ (ภาพ 9) คือลำดับเบสของ *nos terminator* (Accession no. EU796373) (Walter M. et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (GAATTC) ที่ตำแหน่ง 1,856 ซึ่งสอดคล้องกับแผนที่โครงสร้างพลาสมิด pBU3 (ภาพ 3) ที่มีตำแหน่งปลายสุดของ *nos terminator* เป็นจุดตัดของเอนไซม์ *EcoRI*

นอกจากนี้ยังพบว่า พลาสมิด pBU3 มีลำดับเบสที่แตกต่างจาก *mrjp2* (Accession no.AF525777) 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกคือตำแหน่ง 645 ซึ่งเปลี่ยนจาก G เป็น A (ภาพ 9) ซึ่งจะทำให้ codon ที่ตำแหน่ง 146 ของพลาสมิด pBU3 เปลี่ยนจาก AAG เป็น AAA (ภาพ 10) ส่วนอีกตำแหน่งที่แตกต่างคือตำแหน่งที่ 883 ซึ่งลำดับเบสเปลี่ยนจาก A เป็น G (ภาพ 9) ซึ่งจะทำให้ codon ที่ตำแหน่ง 226 ของพลาสมิด pBU3 เปลี่ยนจาก AGA เป็น GGA (ภาพ 10)

เนื่องจากยีน *mrjp2* ได้จากการทำพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์ *pfu* DNA polymerase (Fermentas, USA) ที่มีคุณสมบัติ 3'-5' exonuclease (proofreading activity) ซึ่งจะช่วยให้มีความถูกต้องแม่นยำในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเส้นใหม่มากขึ้น โดยมีค่าความผิดพลาดต่อผลผลิต พีซีอาร์ต่อรอบ 2.6×10^{-6} (Lundberg et al., 1991) จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงคาดว่าไม่น่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แต่ในการทดลองนี้พบว่า ยีน *mrjp2* ที่เพิ่มจำนวนได้มีลำดับเบสที่ตำแหน่ง 883 เปลี่ยนไป ซึ่งอาจจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ *pfu* DNA polymerase ที่ใช้ในการทดลองนี้ ส่วนลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 645 ไม่ได้เกิดจากการทำงานที่ผิดพลาดของเอนไซม์ *pfu* DNA polymerase แต่เกิดเนื่องจากพลาสมิด pET-*mrjp2* ที่ได้มา มียีน *mrjp2* ซึ่งมีลำดับเบสที่แตกต่างจากยีน *mrjp2* ที่รายงานใน GenBank (Accession no.AF525777)

อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนของยีน *mrjp2* ของพลาสมิด pBU3 โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.05 พบว่า ลำดับเบสของยีน *mrjp2* ของพลาสมิด pBU3 สามารถแปลรหัสได้ (inframe) โดยได้กรดอะมิโน 455 ตัว และมีมวลโมเลกุล 51.61 kDa (ภาพ 10) และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *mrjp2* (Accession no.AF525777) พบว่าโคดอนของพลาสมิด pBU3 ที่เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งที่ 146 ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง คือยังคงเป็น Lys (K) เหมือนเดิม ส่วนโคดอนที่เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 226 ทำให้ได้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Arg (R) เป็น Gly (G) (ภาพ 11) แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก MRJP ไม่ใช่โปรตีนเอนไซม์ แต่เป็นโปรตีนสารอาหาร (nutritional protein) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียง 1 ตัว ไม่น่าจะทำให้หน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลง

contigpBU3	20	40	60	80	94
mrjp2					-
CAT box					
TATA box					
contigpBU3	100	120	140	160	180
mrjp2					-
XbaI Start codon 6X His tag					
contigpBU3	200	220	240	260	280
mrjp2					-
contigpBU3	300	320	340	360	376
mrjp2					-
contigpBU3	380	400	420	440	460
mrjp2					-
contigpBU3	480	500	520	540	560
mrjp2					-
contigpBU3	580	600	620	640	658
mrjp2					-
contigpBU3	680	700	720	740	752
mrjp2					-
contigpBU3	760	780	800	820	840
mrjp2					-
contigpBU3	860	880	900	920	940
mrjp2					-
contigpBU3	960	980	1000	1020	1034
mrjp2					-
contigpBU3	1040	1060	1080	1100	1120
mrjp2					-
contigpBU3	1140	1160	1180	1200	1220
mrjp2					-
contigpBU3	1240	1260	1280	1300	1316
mrjp2					-

mrjp2 : AAAAAACACTTCAAATGATCGCAGGTATGAAAAATTAAGGAAGAGCTTCCACATTTCTAGGAAGTAACAAACCTGTAAAGGACGAATATATGTT : 1082
 AAAAAACACTTCAAATGATCGCAGGTATGAAAAATTAAGGAAGAGCTTCCACATTTCTAGGAAGTAACAAACCTGTAAAGGACGAATATATGTT
 1320 * 1340 * 1360 * 1380 * 1400 *
 contigpBU3 : ACTTTTAAGTAACAAAATGCAGAAAATAGTAAATATGATTTTAAATTTCAACGACGTAACCTTCCGAATTTTGGGTGCGAATGTAAAGGAATTA : 1410
 mrjp2 : ACTTTTAAGTAACAAAATGCAGAAAATAGTAAATATGATTTTAAATTTCAACGACGTAACCTTCCGAATTTTGGGTGCGAATGTAAAGGAATTA : 1176
 AGTTTAAAGTAACAAAATGCAGAAAATAGTAAATATGATTTTAAATTTCAACGACGTAACCTTCCGAATTTTGGGTGCGAATGTAAAGGAATTA
 1420 * 1440 * 1460 * 1480 * 1500 *
 contigpBU3 : ATGAGAAATACTCATTGCGCAAAATTTTAACAATAAAAAATATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAACAATAACAATCAGAAGA : 1504
 mrjp2 : ATGAGAAATACTCATTGCGCAAAATTTTAACAATAAAAAATATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAACAATAACAATCAGAAGA : 1270
 ATGAGAAATACTCATTGCGCAAAATTTTAACAATAAAAAATATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAACAATAACAATCAGAAGA

Stop SacI

contigpBU3 : ATAACAATCAGAAAAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAATACTAACAATTAGAATGATAATGAGCTCGAATTTCC : 1598
 mrjp2 : ATAACAATCAGAAAAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAATACTAACAATTAGAATGATAAT : 1350
 ATAACAATCAGAAAAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAAGAATAACAATCAGAATACTAACAATTAGAATGATAAT
 00 * 1620 * 1640 * 1660 * 1680 *
 contigpBU3 : CCGATCGTTCAAACTTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTGTAATTACGT : 1692
 mrjp2 : ----- : -

contigpBU3 : TAAGCATGTAATAATTAACTGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATA : 1786
 mrjp2 : ----- : -

EcoRI

contigpBU3 : GAAACAATAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGGAATTCGTAATCATGTCATAGCTGT : 1880
 mrjp2 : ----- : -

ภาพ 9 ลำดับเบสของพลาสมิด pBU3 บริเวณส่วนของชิ้นยีน *mrjp2*

1 ATG GCT AGC CAT CAT CAT CAT CAT GCC ATT ATT CGA CAA AAT 45
 1 M A S H H H H H H A I I R Q N 15
 46 TCT GCA AAA AAC TTG GAA AAT TCG TTG AAC GTA ATT CAC GAA TGG 90
 16 S A K N L E N S L N V I H E W 30
 91 AAA TAT ATC GAT TAT GAT TTC GGT AGC GAA GAA AGA AGA CAA GCT 135
 31 K Y I D Y D F G S E E R R Q A 45
 136 GCG ATT CAA TCT GGC GAA TAC GAT CAT ACG AAA AAT TAT CCC TTC 180
 46 A I Q S G E Y D H T K N Y P F 60
 181 GAT GTC GAT CAA TGG CAT GAT AAG ACT TTT GTC ACC ATA CTA AAG 225
 61 D V D Q W H D K T F V T I L K 75
 226 TAC GAT GGT GTG CCT TCT ACT TTG AAC ATG ATA TCT AAC AAA ATC 270
 76 Y D G V P S T L N M I S N K I 90
 271 GGT AAG GGT GGA CGC CTT CTA CAA CCA TAT CCT GAT TGG TCG TGG 315
 91 G K G G R L L Q P Y P D W S W 105
 316 GCA GAG AAT AAA GAT TGC TCT GGA ATC GTG AGC GCT TTC AAA ATT 360
 106 A E N K D C S G I V S A F K I 120
 361 GCG ATT GAC AAA TTC GAC AGA TTG TGG GTT TTG GAT TCA GGT CTT 405

121 A I D K F D R L W V L D S G L 135

406 ATC AAT AGA ACT GAA CCT ATA TGT GCT CCA **AAA** TTG CAT GTC TTT 450

136 I N R T E P I C A P **K** L H V F 150

451 GAT CTG AAA AAC ACA AAG CAC CTT AAG CAA ATC GAA ATA CCG CAT 495

151 D L K N T K H L K Q I E I P H 165

496 GAT ATT GCC GTA AAT GCC ACC ACA GGA AAG GGA GGG CTA GTC TCT 540

166 D I A V N A T T G K G G L V S 180

541 CTA GTT GTT CAA GCC ATG GAT CCT ATG AAT ACT TTA GTA TAC ATA 585

181 L V V Q A M D P M N T L V Y I 195

586 GCA GAC CAT AAG GGT GAT GCT TTG ATC GTC TAT CAA AAT TCC GAT 630

196 A D H K G D A L I V Y Q N S D 210

631 GAT TCC TTC CAT CGA ATG ACT TCC AAC ACT TTC GAT TAC GAT CCC 675

211 D S F H R M T S N T F D Y D P 225

676 **GGA** TAT GCC AAA ATG ACG ATC AAT GGA GAA AGT TTC aCA TTG AAA 720

226 **C** Y A K M T I N G E S F T L K 240

721 AAT GGA ATT TGT GGA ATG GCT CTT AGT CCC GTG ACG AAC AAT CTT 765

241 N G I C G M A L S P V T N N L 255

766 TAT TAC AGT CCT CTC GCT TCT CAC GGT TTG TAT TAT GTC AAC ACG 810

256 Y Y S P L A S H G L Y Y V N T 270

811 GAA CCA TTT ATG AAA TCA CAA TTT GGA GAC AAT AAT AAC GTG CAA 855

271 E P F M K S Q F G D N N N V Q 285

856 TAT GAA GGA TCC CAA GAT ACT TTG AAC ACG CAA TCA TTG GCT AAA 900

286 Y E G S Q D T L N T Q S L A K 300

901 GCA GTA TCG AAA GAT GGC GTC CTC TTC GTC GGA CTT GTG GGT AAT 945

301 A V S K D G V L F V G L V G N 315

946 TCA GCT CTT GGA TGC TTG AAC GAG CAT CAA CCA CTT CAG AGA GAA 990

316 S A L G C L N E H Q P L Q R E 330

991 AAT TTA GAA CTG GTC GCC CAA AAT GAA AAA ACA CTT CAA ATG ATC 1035

331 N L E L V A Q N E K T L Q M I 345

1036 GCA GGT ATG AAA ATT AAG GAA GAG CTT CCA CAT TTC GTA GGA AGT 1080

346 A G M K I K E E L P H F V G S 360

1081 AAC AAA CCT GTA AAG GAC GAA TAT ATG TTA GTT TTA AGT AAC AAA 1125

361 N K P V K D E Y M L V L S N K 375

```

1126 ATG CAG AAA ATA GTA AAT AAT GAT TTT AAT TTC AAC GAC GTA AAC 1170
376 M Q K I V N N D F N F N D V N 390
1171 TTC CGA ATT TTG GGT GCG AAT GTA AAG GAA TTA ATG AGA AAT ACT 1215
391 F R I L G A N V K E L M R N T 405
1216 CAT TGC GCA AAT TTT AAC AAT AAA AAT AAT CAG AAG AAT AAC AAT 1260
406 H C A N F N N K N N Q K N N N 420
1261 CAG AAG AAT AAC AAT CAG AAC AAT AAC AAT CAG AAG AAT AAC AAT 1305
421 Q K N N N Q N N N N Q K N N N 435
1306 CAG AAA AAT AAC AAT CAG AAG AAT AAC AAT CAG AAG AAT AAC AAT 1350
436 Q K N N N Q K N N N Q K N N N 450
1351 CAG AAT ACT AAC AAT TAG 1368
451 Q N T N N *

```

ภาพ 10 การวิเคราะห์กรดอะมิโนของยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pBU3

```

                *           20           *           40           *
contigpBU3 : MASHHHHHHAIIRQNSAKNLENSLNIHEWKYIDYDFGSEERRQAAIQSGEYDHTKNY : 58
mrjp2      : -----AIIRQNSAKNLENSLNIHEWKYIDYDFGSEERRQAAIQSGEYDHTKNY : 49
                AIIIRQNSAKNLENSLNIHEWKYIDYDFGSEERRQAAIQSGEYDHTKNY

                60           *           80           *           100           *
contigpBU3 : PFDVDQWHDKTFVTILKYDGV PSTLNMISNKIGKGGRLLPYPDWSWAENKDCSGIVS : 116
mrjp2      : PFDVDQWHDKTFVTILKYDGV PSTLNMISNKIGKGGRLLPYPDWSWAENKDCSGIVS : 107
                PFDVDQWHDKTFVTILKYDGV PSTLNMISNKIGKGGRLLPYPDWSWAENKDCSGIVS

                120           *           140           *           160           *
contigpBU3 : AFKIAIDKFDRWLWVLD SGLINRTEPICAPKLHVFDLKN TKHLKQIEIPHDIAVNATTG : 174
mrjp2      : AFKIAIDKFDRWLWVLD SGLINRTEPICAPKLHVFDLKN TKHLKQIEIPHDIAVNATTG : 165
                AFKIAIDKFDRWLWVLD SGLINRTEPICAPKLHVFDLKN TKHLKQIEIPHDIAVNATTG

                180           *           200           *           220           *
contigpBU3 : KGGVLSLVVQAMDPMNTLVYIADHKGDALIVYQNSDDSFHRMTSNTFDYDPRYAKMTI : 232
mrjp2      : KGGVLSLVVQAMDPMNTLVYIADHKGDALIVYQNSDDSFHRMTSNTFDYDPRYAKMTI : 223
                KGGVLSLVVQAMDPMNTLVYIADHKGDALIVYQNSDDSFHRMTSNTFDYDPRYAKMTI

                240           *           260           *           280           *
contigpBU3 : NGESFTLKNGICGMALSPVTNNLYYSP LASHGLYYVNTPEPFMKSQFGDNNNVQYEGSQ : 290
mrjp2      : NGESFTLKNGICGMALSPVTNNLYYSP LASHGLYYVNTPEPFMKSQFGDNNNVQYEGSQ : 281
                NGESFTLKNGICGMALSPVTNNLYYSP LASHGLYYVNTPEPFMKSQFGDNNNVQYEGSQ

                300           *           320           *           340
contigpBU3 : DTLNTQSLAKAVSKDGVLFVGLVGNSALGCLNEHQPLQRENLELVAQNEKTLQMIAGM : 348
mrjp2      : DTLNTQSLAKAVSKDGVLFVGLVGNSALGCLNEHQPLQRENLELVAQNEKTLQMIAGM : 339
                DTLNTQSLAKAVSKDGVLFVGLVGNSALGCLNEHQPLQRENLELVAQNEKTLQMIAGM

                *           360           *           380           *           400
contigpBU3 : KIKEELPHFVGSNKPKVKDEYMLVLSNKMOKIVNNDNFNDVNFRI LGANVKELMRNTH : 406
mrjp2      : KIKEELPHFVGSNKPKVKDEYMLVLSNKMOKIVNNDNFNDVNFRI LGANVKELMRNTH : 397
                KIKEELPHFVGSNKPKVKDEYMLVLSNKMOKIVNNDNFNDVNFRI LGANVKELMRNTH

                *           420           *           440           *           460
contigpBU3 : CANFNKNKNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQNTNN----- : 455
mrjp2      : CANFNKNKNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQNTNN----- : 446
                CANFNKNKNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQKNNNQNTNN

```

ภาพ 11 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *mrjp2* ในพลาสมิด pBU3 กับยีน *mrjp2* ที่

รายงานใน GenBank (Accession no.AF525777)

การถ่ายยีน *mrjp2* เข้าสู่แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง

และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake

การเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake

เพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake ในอาหารสูตร N6D ที่มีปริมาณโพรีน 2.88 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake มีเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส 44.23 และ 73.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตาราง 2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์ Kitaake มีความสามารถในการเกิดแคลลัสได้สูงกว่าข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนแคลลัสของข้าวทั้งสองพันธุ์มีขนาดใกล้เคียงกัน คือ ข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake มีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 1.08 และ 1.07 เซนติเมตร ตามลำดับ

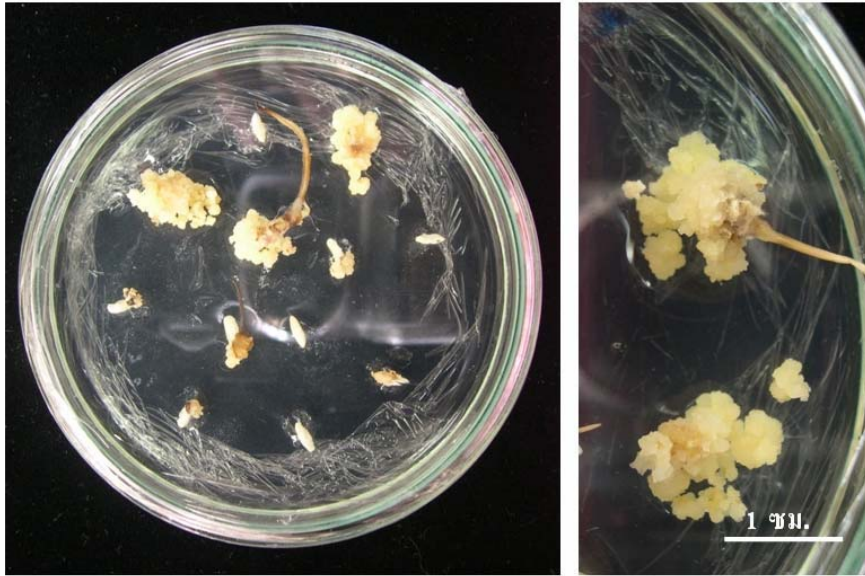
นอกจากนี้ ยังพบว่าลักษณะแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake มีลักษณะที่ดีเหมือนกัน คือมีสีเหลืองอ่อน กลม แน่น (เอมบริโอจินิก แคลลัส) (ภาพ 12 และ ภาพ 13) ซึ่งเป็นลักษณะแคลลัสที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน เนื่องจากแคลลัสสามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นได้

ในการทดลองนี้สภาวะที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือใช้ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ casamino acid 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ประภา และพรทิพย์ (2537) ที่ทดลองโดยใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสสูง 96.3 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับรายงานของ Toki (1997) พบว่าอาหารสูตร N6 ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ casamino acid 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ข้าวเกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

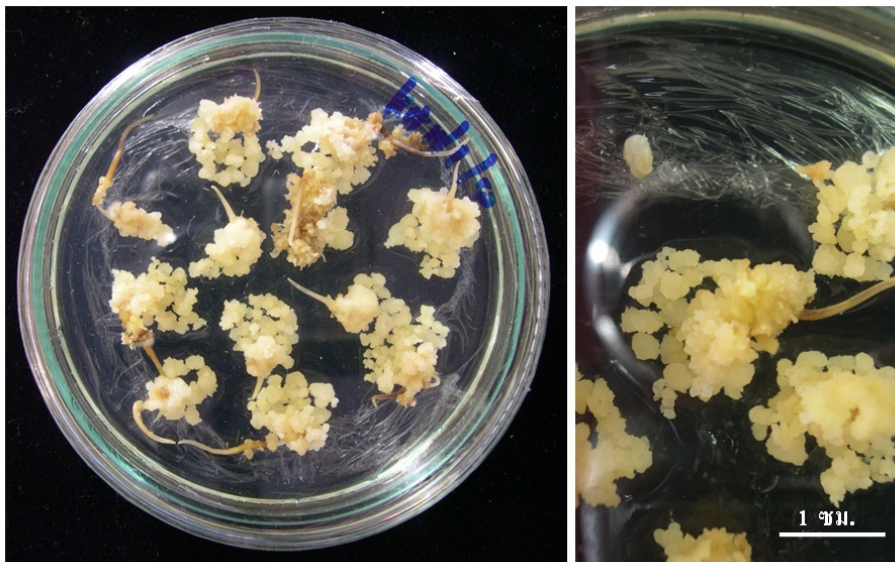
ตาราง 2 การเปรียบเทียบการชักนำให้เกิดแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และ Kitaake

พันธุ์ข้าว	จำนวนเมล็ด ทั้งหมด	จำนวนเมล็ดที่เกิด แคลลัส	เปอร์เซ็นต์การ เกิดแคลลัส	ค่าเฉลี่ยขนาด แคลลัส (ชม.)
เหนียวสันป่าตอง	156	69	44.23 ^b	1.08
Kitaake	156	115	73.71 ^a	1.07
	MEAN		58.97	1.07
	F-test		**	ns
	CV		3.7	28.4

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ** ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p<0.01$ เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพ 12 แคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง อายุ 4 สัปดาห์



ภาพ 13 ลักษณะแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kitaake อายุ 4 สัปดาห์

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002)

บุรณศักดิ์ และคณะ (2549) รายงานการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง โดยพบว่าวิธีของ Toki (1997) ทำให้ได้แคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก 54.37 เปอร์เซ็นต์ แต่แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้เพียง 3 ต้น ในขณะที่รายงานของ Endo et al. (2002) พบว่าแคลลัสของข้าวพันธุ์ Kitaake ที่รอดบนอาหารคัดเลือกสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ถึง 56.6 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงได้นำแคลลัสของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และข้าวพันธุ์ Kitaake ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ที่มี 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และโพรลีน 2.88 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002) โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ AGL1 พบว่า วิธีการถ่ายยีนของ Endo et al. (2002) เหมาะสมสำหรับข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตายมากที่สุด (72.72 เปอร์เซ็นต์) (ตาราง 3 ภาพ 14)

การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี Split-plot in CRD พบว่า เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองมีค่าสูงกว่าข้าวพันธุ์ Kitaake อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และยังพบอีกว่าการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวทั้งสองพันธุ์ด้วยวิธีของ Endo et al. (2002) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนมากกว่าวิธีของ Toki (1997) เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตายสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากแต่ละสภาวะมาชักนำให้เกิดต้น พบว่า แคลลัสของข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) และ Endo et al. (2002) แคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เกิดยอดและราก 4.00 และ 4.34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพ 15 และตาราง 3) แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการเกิดต้นยังน้อยมาก เมื่อเทียบกับการทดลองของ Endo et al. (2002) ซึ่งสามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นได้ในช่วง 34-56 เปอร์เซ็นต์

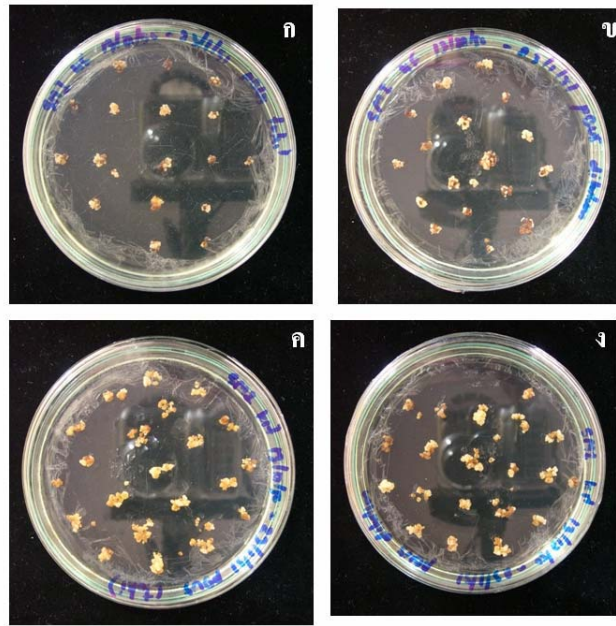
ส่วนข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ถึงแม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดสูงกว่าข้าวพันธุ์ Kitaake แต่แคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ ซึ่งผลที่ได้ตรงข้ามกับการทดลองของ Saharan et al. (2004) ที่ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้แคลลัสของข้าวอินดิกาให้เจริญเป็นต้น พบว่าสูตรอาหาร MS ที่เติม Kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การชักนำให้เกิดต้นสูงถึง 61 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพันธุ์ HKR-46 และ 79.2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพันธุ์ HKR-126

จากผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Aldemita R. and Hodges T.K. (1996) ซึ่งได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายยีนระหว่างข้าวอินดิกา (IR72 และ TCS10) และ จาปอนิกา (G418) พบว่าข้าวจาปอนิกามีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนข้าวอินดิกามีประมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002)

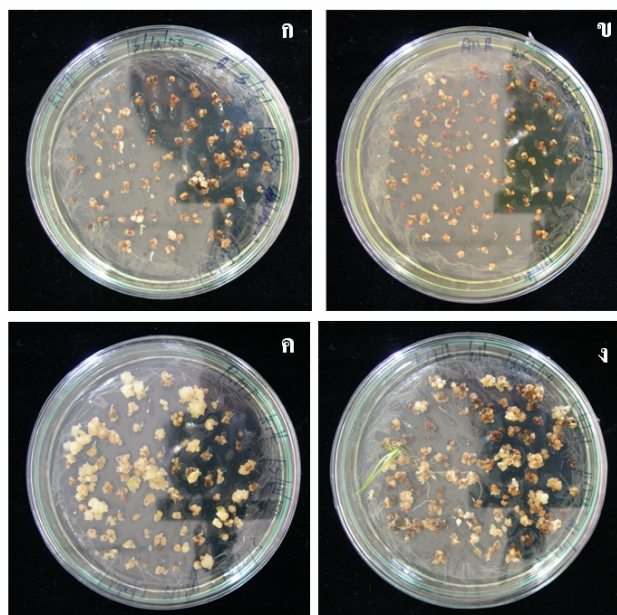
พันธุ์ข้าว	วิธีการถ่ายยีน	จำนวน	% แคลลัส	% แคลลัส	% แคลลัสที่เกิด
		แคลลัสเริ่มต้น	ที่รอด	ที่เกิดจุดเขียว	ยอด และราก
เหนียวสันป่าตอง	Toki (1997)	34	55.88 ^c	-	-
	Endo et al. (2002)	33	72.72 ^a	-	-
Kitaake	Toki (1997)	42	59.52 ^b	20	4.00
	Endo et al. (2002)	41	56.09 ^c		4.34
Mean			61.05		
F-test			**		
CV (%)			2.6		

หมายเหตุ ** ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p < 0.01$ เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



ภาพ 14 ลักษณะแคลลัสบนอาหารคัดเลือก สัปดาห์ที่ 2

หมายเหตุ ก และ ข คือข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีของ Toki (1997) และ Endo et al. (2002) ตามลำดับ ส่วน ค และ ง คือข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีของ Toki (1997) และ Endo et al. (2002) ตามลำดับ



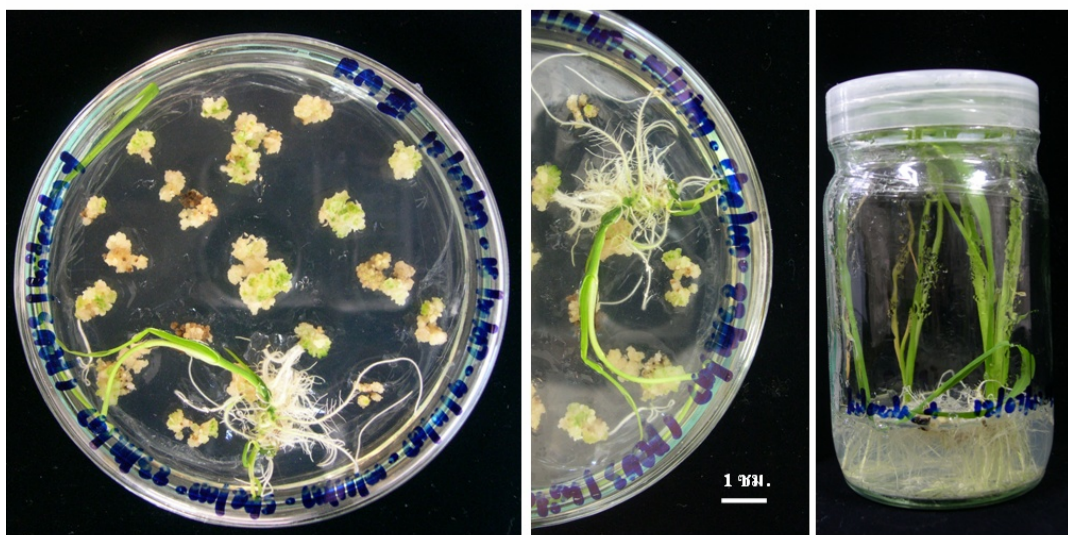
ภาพ 15 ลักษณะแคลลัสบนอาหารชักนำให้เกิดต้น สัปดาห์ที่ 2

หมายเหตุ ก และ ข คือข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีของ Toki (1997) และ Endo et al. (2002) ส่วน ค และ ง คือข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีของ Toki (1997) และ Endo et al. (2002) ตามลำดับ

การตรวจสอบการถ่ายยีนโดยวิธี GUS assay

การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake ด้วยพลาสมิด pBU3 โดยวิธี Toki (1997) พบว่าได้แคลลัสต้านสารปฏิชีวนะไฮโกราไมซิน และเจริญเป็นต้นอ่อนได้ (ภาพ 16) หลังจากนั้น ย้ายปลูกในโรงเรือนกระจก (ภาพ 17) โดยได้ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งหมด 20

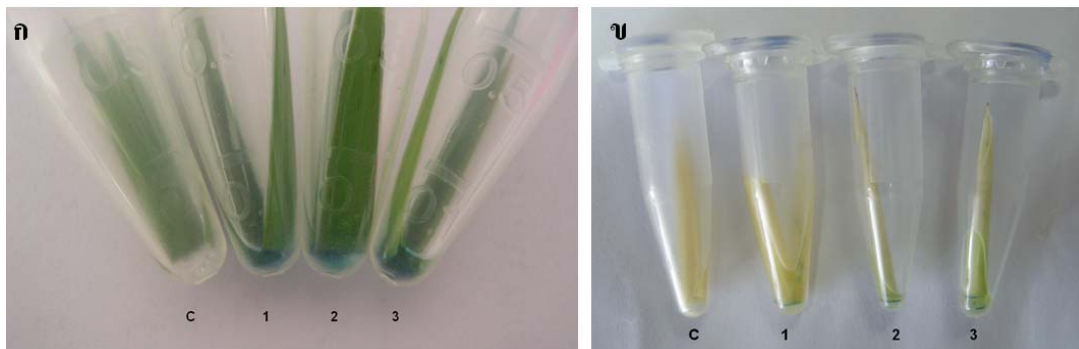
เมื่อนำชิ้นส่วนของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ทั้งหมดที่ได้รับการถ่ายยีน มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* โดยวิธี GUS assay พบว่า ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนด้วย พลาสมิด pBU3 (ต้น BU3) เกิดสีฟ้า ทั้งหมด 12 ต้น คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า ต้นข้าวเหล่านี้ได้รับยีน *gusA* จากการถ่ายยีน และมีการแสดงออกของยีน *gusA* (ตาราง 4 ภาพ 18 สำหรับต้น BU3)



ภาพ 16 แคลลัสที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด pBU3 ที่กำลังพัฒนาเป็นต้นอ่อน



ภาพ 17 ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T₀ ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBU3
ที่ปลูกในโรงเรือน

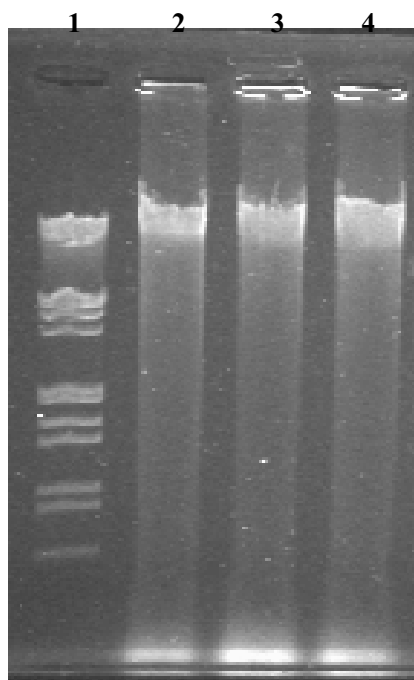


ภาพ 18 ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน *gusA* ของต้น BU3

หมายเหตุ C คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน หลอดที่ 1-3 คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBU3 ต้นที่ 11 16 และ 20 ก) ก่อนเติมเอทานอล และ ข) หลังเติมเอทานอล

การวิเคราะห์การแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์

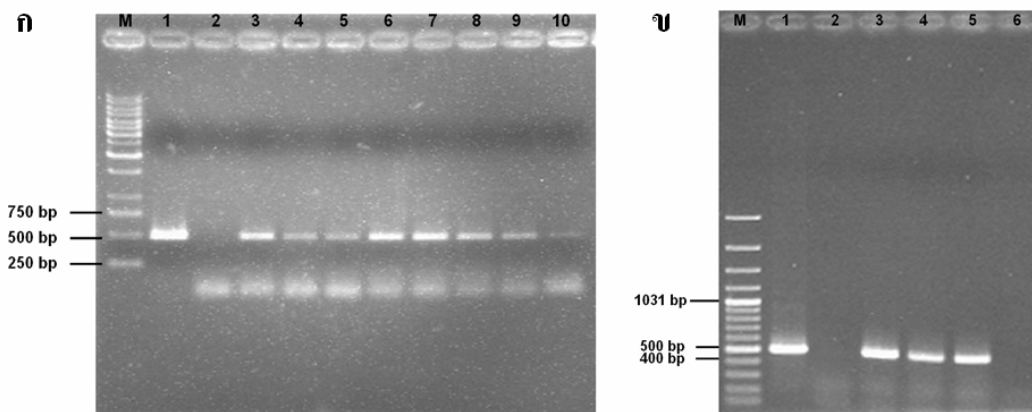
เมื่อนำชิ้นส่วนใบของต้นข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB และตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แสดงว่า จีโนมิกดีเอ็นเอมีคุณภาพดี (ภาพ 19) สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และ Southern blot ได้



ภาพ 19 การวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวของต้น BU3 ที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* ด้วยวิธี CTAB

หมายเหตุ เลน 1 คือ Lambda DNA *HindIII/EcoRI* เลน 2 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าว Kitaake (negative control) เลน 3-4 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวต้น BU3-16-6 และต้น BU3-20-9 ตามลำดับ

เมื่อนำใบของต้นข้าว BU3 ที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* มาสกัด จีโนมิกดีเอ็นเอ และตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* พบว่า ต้นข้าวทั้งหมดที่นำมาทดสอบ โดยวิธีพีซีอาร์ เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp ซึ่งเป็นผลผลิตพีซีอาร์ตามที่คาดหวัง แสดงว่ามีการแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมของข้าว และต้นข้าวเหล่านี้เป็นข้าวตัดแปลงพันธุกรรม (ตาราง 4 และ ภาพ 20)



ภาพ 20 การวิเคราะห์ยีน *mrjp2* ในข้าว Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBU3

หมายเหตุ ก) เลน M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder เลน 1 คือ พลาสมิด pBU3 ซึ่งใช้เป็น positive control เลน 2 คือข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 3-10 คือต้นที่ 1 2 3 4 5 6 8 และ 9 ส่วน ข) เลน M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder เลน 1 คือ พลาสมิด pBU3 ซึ่งใช้เป็น positive control เลน 2 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 3-5 คือต้นที่ 11 16 และ 20 เลน 6 คือน้ำ

ตาราง 4 สรุปการวิเคราะห์หัตถ์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีน โดยเทคนิค GUS Assay และเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *mrjp2*

ต้นที่	GUS	PCR
BU3-1	+	+
BU3-2	+	+
BU3-3	+	+
BU3-4	+	+
BU3-5	++	+
BU3-6	+	+
BU3-7	-	ND
BU3-8	+	+
BU3-9	+	+
BU3-10	+	ND
BU3-11	++	+
BU3-12	-	ND
BU3-13	-	ND
BU3-14	-	ND
BU3-15	-	ND
BU3-16	++	+
BU3-17	-	ND

BU3-18	-	ND
BU3-9	-	ND
BU3-20	++	+

หมายเหตุ ในช่อง GUS - คือ ไม่เกิดสีฟ้า + คือเกิดสีฟ้าอ่อน ++ คือเกิดสีฟ้าเข้ม ในช่อง PCR + คือ มีการเพิ่มจำนวนของชิ้นยีน *mrjp2* ND คือไม่ได้ตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (เนื่องจากต้นข้าวที่ให้ผล GUS เป็นลบ ส่วนใหญ่ไม่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์)

การวิเคราะห์การถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูก

เลือกต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 ของต้น BU3 ที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* และมียีน *mrjp2* แทรกอยู่ในจีโนม นำมาตรวจสอบการถ่ายทอดยีน *gusA* ไปสู่รุ่นลูก T_1 โดยนำเมล็ดรุ่น T_1 มาปลูก และตัดชิ้นส่วนใบมาทดสอบโดยวิธี GUS Assay พบว่า ต้นข้าว BU3 ต้นที่ 1 2 5 6 และ 9 มีอัตราส่วนฟีนไทป์ของรุ่นลูกที่ให้ผล GUS+:GUS- คิดเป็น 3:1 (ตาราง 5) ซึ่งสอดคล้องกับการผลการทดลองของ Dong et al. (1995) ซึ่งได้ถ่ายยีนในข้าวสายพันธุ์จาปอนิกา และจาวานิกาโดยวิธีการใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบว่าข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้มีอัตราส่วนของรุ่นลูกที่ให้ผล Hyg^R : Hyg^S และ GUS+:GUS- ในอัตราส่วน 3:1 เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ จากการนำเมล็ดในรุ่น T_2 ของต้น BU3-5-1 มาตรวจสอบการถ่ายทอดยีน พบว่าทุกต้นมีการแสดงออกของ *gusA* แสดงให้เห็นว่าต้น BU3-5-1 ไม่มีการแยกตัวของยีน *gusA* ในรุ่นลูก แสดงว่ายีนอยู่ในสภาพ homozygous และยีนมีความเสถียร (stable) คือสามารถถ่ายทอดไปได้หลายรุ่นจนถึงรุ่น T_3 (ไม่ได้แสดงผล)

ตาราง 5 สรุปการวิเคราะห์การถ่ายทอดยีน *gusA* ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมจากรุ่น T₀ ไป T₁

	อัตราส่วน	χ^2	อัตราส่วนฟีโนไทป์
ข้าวรุ่น T ₀	GUS+ : GUS- ของข้าวรุ่น T ₁		
BU3-1	20 : 11	1.81	3 : 1
BU3-2	22 : 9	0.26	3 : 1
BU3-5	12 : 8	2.40	3 : 1
BU3-6	15 : 5	0	3 : 1
BU3-9	8 : 1	0.92	3 : 1
BU3-16	15 : 7	0.54	3 : 1
BU3-20	10 : 2	0.44	3 : 1

หมายเหตุ วิเคราะห์ค่า χ^2 ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

การวิเคราะห์ต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Southern blot

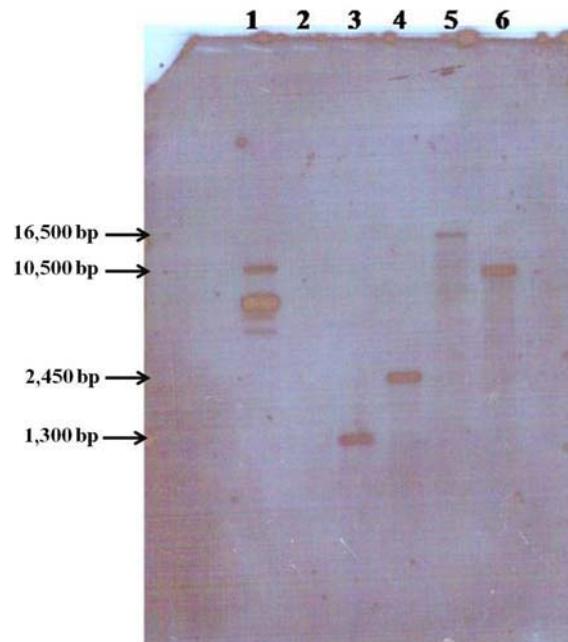
เมื่อนำต้นข้าว BU3 รุ่น T₁ ที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* มายืนยันผลการแทรกตัวของยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าว และตรวจสอบจำนวนชุดยีนในจีโนม โดยเทคนิค Southern blot โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ โดยเลือกใช้เอนไซม์ *XbaI* *SacI* *EcoRV* และ *EcoRI* ซึ่งตัดเพียง 1 ตำแหน่ง ในบริเวณ T-DNA ของพลาสมิด pBU3 (ภาพ 3) และใช้ probe ซึ่งเป็นส่วนของยีน *mrjp2* ที่ติดฉลากด้วย DIG โดยวิธีพีซีอาร์

ต้นข้าว BU3-20-1 ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย *XbaI* ร่วมกับ *SacI* เพื่อตรวจสอบชิ้นยีน *mrjp2* และตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* *XbaI* และ *EcoRI* พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (ภาพ 21) แสดงว่า มี

การแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าว BU3-20-1 ที่ 1 ตำแหน่ง (a single insertion site) (ภาพ 21) หลังจากนั้นทำการยืนยันผลโดยนำต้น BU3-20-9 และ BU3-16-6 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ ได้แก่ *Xba*I *Sac*I *EcoRV* และ *EcoRI* เพื่อยืนยันว่าข้าวทั้ง 2 ต้นเป็น independent transgenic lines

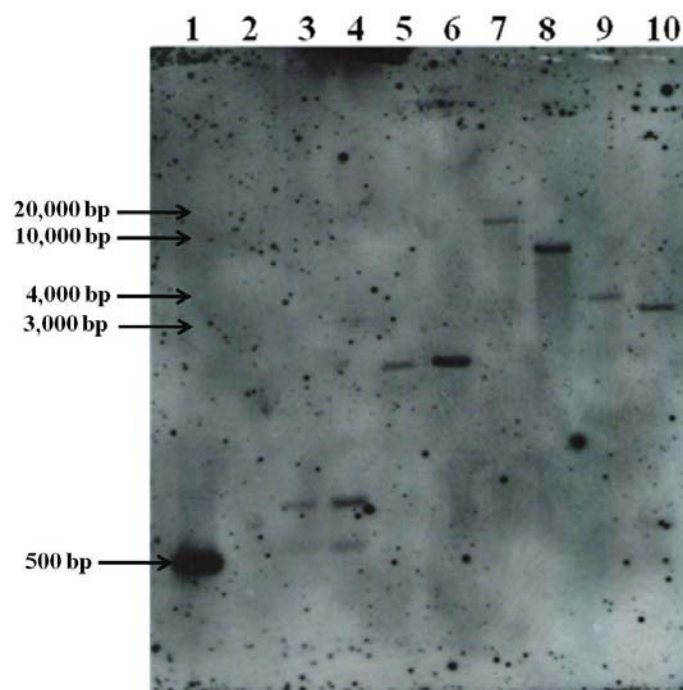
จากการทดสอบต้นข้าว BU3 ทั้งหมด 2 ต้น ได้ผลดังนี้ ต้น BU3-16-6 ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย *Xba*I ร่วมกับ *Sac*I เพื่อตรวจสอบชิ้นยีน *mrjp2* และตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* *Xba*I และ *EcoRI* พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (ภาพ 22) แสดงว่า มีการแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าวต้น BU3-16-6 ที่ 1 ตำแหน่ง (a single insertion site) และต้นข้าว BU3-20-9 ตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วย *Xba*I ร่วมกับ *Sac*I เพื่อตรวจสอบชิ้นยีน *mrjp2* และตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* *Xba*I และ *EcoRI* พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ (ภาพ 22) แสดงว่า มีการแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมข้าว BU3-20-9 ที่ 1 ตำแหน่ง (a single insertion site) (ภาพ 22)

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Southern blot พบว่า ต้นข้าว BU3 ทั้ง 2 ต้น ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ เช่นเดียวกัน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ที่ทดสอบ แต่อย่างไรก็ตามขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน แสดงว่า ต้นข้าวทั้ง 2 นี้เป็น independent transgenic lines



ภาพ 21 ผลการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนและมีการแสดงออกของยีน *gusA* ด้วยเทคนิค Southern blot โดยใช้ probe ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2*

หมายเหตุ เลน 1 คือ plasmid pET-mrjp2 (positive control) เลน 2 คือ ต้นข้าว Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control) ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* เลน 3-6 คือ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมต้น BU3-20-1 ตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI/SacI*, *EcoRV*, *XbaI* และ *EcoRI* ตามลำดับ



ภาพ 22 ผลการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้จากการถ่ายยีนและการแสดงออกของยีน *gusA* ด้วยเทคนิค Southern blot โดยใช้ probe ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2*

หมายเหตุ

เลน 1 คือ PCR-product ของยีน *mrjp2* เจือจาง 1:10,000 เท่า (positive control)

เลน 2 คือ ต้นข้าว Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control) ตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI/SacI*

เลน 3-4 คือ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมต้น BU3-16-6 และ BU3-20-9 ตามลำดับ ตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI/SacI*

เลน 5-6 คือ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมต้น BU3-16-6 และ BU3-20-9 ตามลำดับ ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV*

เลน 7-8 คือ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมต้น BU3-16-6 และ BU3-20-9 ตามลำดับ ตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI*

เลน 9-10 คือ ข้าวตัดแปลงพันธุกรรมต้น BU3-16-6 และ BU3-20-9 ตามลำดับ ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

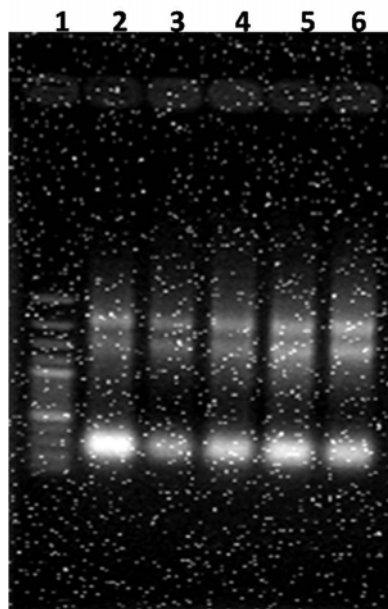
การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับ mRNA โดยเทคนิค RT-PCR

นำต้นข้าวมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mrjp2* โดยนำเมล็ดข้าวอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR (Reverse transcription-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2*

ต้นข้าว BU3 เมื่อวิเคราะห์อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนรุ่น T_2 ของต้น BU3-16-9 โดยใช้ไพรเมอร์ F1mrjp2 และ Rmrjp2 พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 806 bp (ภาพ 24) แสดงว่าต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม BU3-16-9 ที่นำมาทดสอบ มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับ mRNA

ส่วนต้นข้าว BU3-20-9 เมื่อวิเคราะห์อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนรุ่น T_2 พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 806 bp (ภาพ 24) แสดงว่ามีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับ mRNA

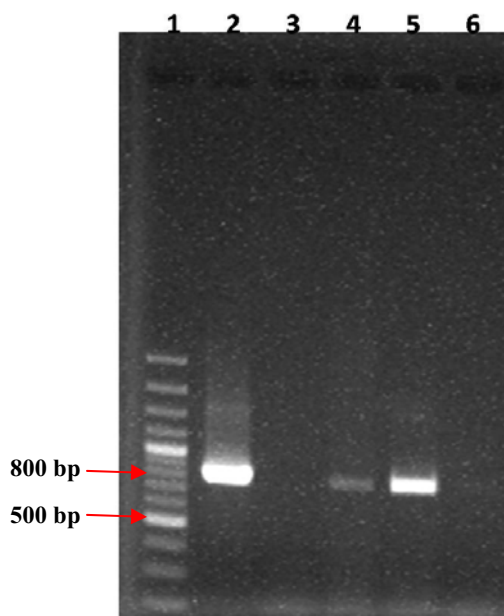
นอกจากนี้ ยังได้นำอาร์เอ็นเอตัวอย่างเดียวกัน มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* เพื่อยืนยันผล RT – PCR พบว่า ไม่มีการเพิ่มปริมาณของชิ้นยีน *mrjp2* (ภาพ 25) แสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนของจีโนมดีเอ็นเอในการเตรียมอาร์เอ็นเอ



ภาพ 23 การวิเคราะห์อาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดจากเมล็ดอ่อนรุ่น T_2 ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

BU3-16 และ BU3-20

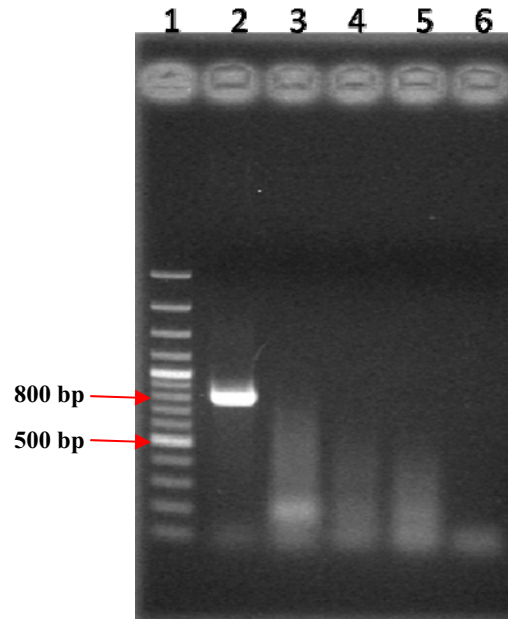
หมายเหตุ เลน 1 คือ 100 bp DNA Ladder Plus เลน 2 คือ อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนของข้าว Kitaake ที่ไม่ได้ถ่ายยีน Lane 3 – 6 คือ อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนของต้นข้าว BU3-16-9, BU3-16-14, BU3-20-9 และ BU3-20-19



ภาพ 24 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับ mRNA ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมด้วย

เทคนิค RT – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2*

หมายเหตุ เลน 1 คือ 1 kb DNA Ladder เลน 2 คือ พลาสมิด pET-mrjp2 (positive control) เลน 3 คือ อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนของข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control) เลน 4-5 คือ อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนของต้นข้าว BU3-16-9 และ BU3-20-9 ตามลำดับ เลน 6 คือ น้ำ



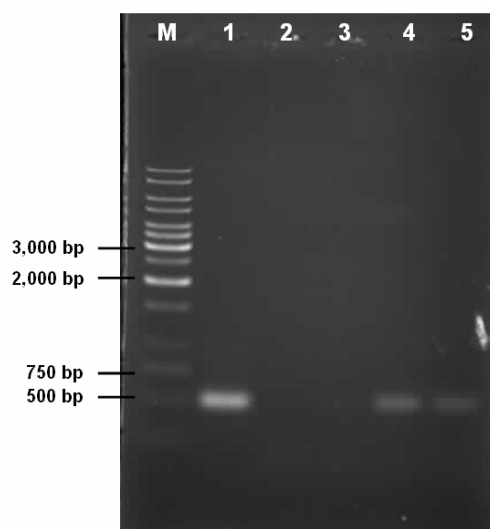
ภาพ 25 การตรวจสอบการปนเปื้อนของจีโนมคติเอ็นเอในอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเมล็ดอ่อนของข้าว

ดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2*

หมายเหตุ เลน 1 คือ 1 kb DNA Ladder เลน 2 คือ พลาสมิด pET-mrjp2 (positive control) เลน 3 คือ อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนของข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (negative control) เลน 4-5 คือ อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนของต้นข้าว BU3-16-9 และ BU3-20-9 ตามลำดับ เลน 6 คือ น้ำ

ต้นข้าว BU3 เมื่อวิเคราะห์อาร์เอ็นเอจากเมล็ดอ่อนรุ่น T₃ ของต้น BU3-5-1-4 และเมล็ดรุ่น T₂ ของต้น BU3-2-26 โดยใช้ไพรเมอร์ F1mrjp2 และ R1mrjp2 พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp (ภาพ 41) แสดงว่าต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม BU3 ที่นำมาทดสอบ มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับ mRNA

นอกจากนี้ ยังได้นำอาร์เอ็นเอตัวอย่างเดียวกัน มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* เพื่อยืนยันผล RT-PCR พบว่าไม่มีการเพิ่มปริมาณของชิ้นยีน *mrjp2* (ไม่ได้แสดงผล) แสดงว่าไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในการเตรียมอาร์เอ็นเอ



ภาพ 26 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับ mRNA ของข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิต pBU3

หมายเหตุ เลน M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder เลน 1 คือ พลาสมิต pBU3 ซึ่งใช้เป็น positive control เลน 2 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 3 คือ น้ำ ส่วนเลน 4 และ 5 คือต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม BU3-5-1-4 และ BU3-2-26

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับโปรตีน

โดยเทคนิค Western blotting

นำเมล็ดแก่ของต้นข้าวตัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_3 ของต้น BU3-2-26 และ BU3-5-1 มาสกัดโปรตีน แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้แอนติบอดี Anti-His ที่จับกับโปรตีนที่มี His tag เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดข้าว

โปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดข้าว เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Bradford พบว่า มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 0.8–1.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และจากการตรวจสอบโปรตีน MRJP2 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ารูปแบบของแถบโปรตีนในเมล็ดข้าวทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีลักษณะคล้ายๆ กัน (ภาพ 27)

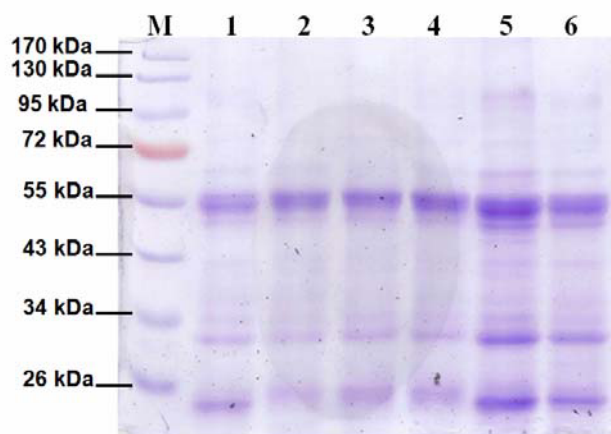
จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้ Anti-His (ภาพ 28) พบแถบโปรตีนด้านบน ขนาดประมาณ 70 kDa ซึ่งคาดว่าจะเป็นแถบของโปรตีน GUS เนื่องจากในเลน 2 ซึ่งเป็นเมล็ดที่ได้จากต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1301 พบแถบโปรตีนขนาด 70 kDa เช่นเดียวกัน ซึ่งจากการวิเคราะห์โปรตีน GUS ในพลาสมิด pCAMBIA 1301 (Accession no. AAF65342) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า โปรตีน GUS ที่ได้มีกรดอะมิโน 630 ตัว และมีขนาดโปรตีน 70 kDa นอกจากนี้ยังมีส่วนของ 6X His tag ที่ด้านปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) อีกด้วย ซึ่งทำให้สามารถจับกับ Anti-His ได้

ส่วนแถบโปรตีนด้านล่างขนาดประมาณ 50 kDa พบในเมล็ดแก่ของข้าวทั้งหมดที่นำมาทดสอบ ซึ่งคาดว่าจะเป็นโปรตีน glutelin เนื่องจากในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดข้าวจะมีการสะสมโปรตีน glutelin มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในเมล็ด โดยจะเก็บไว้ที่แควคิวโอล นอกจากนี้ มีรายงานว่าโปรตีนสะสม glutelin ในรูป precursor มีขนาดประมาณ 51 kDa (Yamagata et al, 1982; Krishan and Okita, 1986) ดังนั้น โปรตีน glutelin ซึ่งมีมากในเมล็ดข้าวอาจมีบางบริเวณที่สามารถจับกับ Anti-His ได้ จึงทำให้เห็นแถบโปรตีนขนาดประมาณ 50 kDa ในข้าวทุกตัวอย่าง

จากผลการทดลอง ไม่สามารถเห็นแถบโปรตีน MRJP2 ซึ่งมีขนาดประมาณ 51 kDa ตามที่คาดหวัง อาจเนื่องจากการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดข้าวน้อย และเนื่องจากโปรตีน

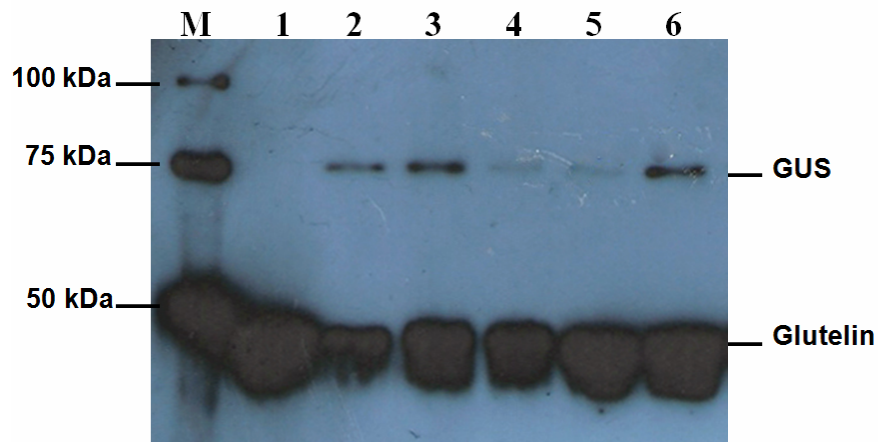
glutelin มีขนาดโปรตีนใกล้เคียงกับโปรตีน MRJP2 ทำให้ Anti-His ไม่สามารถจับกับ 6X His-tag ที่อยู่ด้านปลายหมู่อะมิโน (N-terminal) ของโปรตีน MRJP2 ซึ่งอาจมีปริมาณน้อยได้ แต่สามารถจับกับกรดอะมิโน His ในโปรตีน glutelin ซึ่งมีปริมาณมากในเมล็ดข้าว ทำให้ไม่สามารถพบแถบโปรตีน MRJP2 นอกจากนี้โปรตีน MRJP2 ซึ่งเป็นโปรตีนแปลกปลอมในเมล็ดข้าวอาจถูกย่อยสลายไป และในการทดลองนี้ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Anti-His ซึ่งไม่มีความจำเพาะต่อโปรตีน MRJP2 โดยตรง ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Judova et al. (2004) ที่ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน MRJP1 ตรวจการแสดงออกของยีน *mrjp1* ในต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค Western blotting พบว่า สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MRJP1 ได้ และใช้โปรตีนตัวอย่างเพียง 8 ไมโครกรัม ก็สามารถเห็นแถบของโปรตีน MRJP1

นอกจากนี้ ยังพบว่าต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBU3 มีการเจริญเติบโตปกติ เมื่อเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพ 17)



ภาพ 27 การตรวจสอบโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค SDS-PAGE

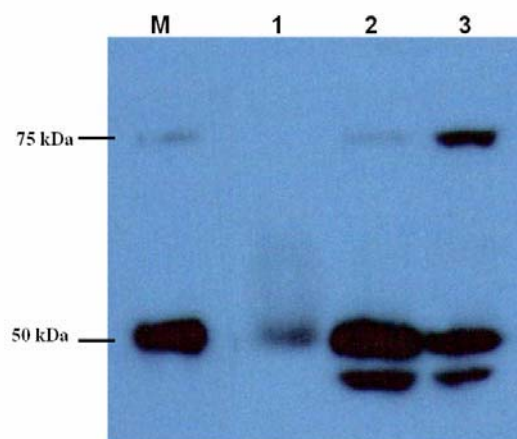
หมายเหตุ เลน M คือ PageRuler prestain ladder เลน 1-2 คือข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1301 ตามลำดับ ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เลน 3-6 คือ ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม BU3-2-26 BU3-5-1 BU3-16 และ BU3-20



ภาพ 28 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดแก่ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค Western blotting ที่ใช้แอนติบอดี Anti-His

หมายเหตุ เลน M คือ His Protein marker เลน 1-2 คือข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA1301 ตามลำดับ ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เลน 3-6 คือต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม BU3-2-26 BU3-5-1 BU3-16 และ BU3-20

เมื่อนำเมล็ดอ่อนรุ่น T_1 ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมต้น BU3-16 และ BU3-20 มาสกัดโปรตีนทั้งหมด และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้แอนติบอดี Anti-His พบว่า เมล็ดอ่อนมีแถบโปรตีน 3 แถบ คือขนาดประมาณ 70 kDa และแถบติดกัน (doublet) ขนาดประมาณ 50 kDa และ 47 kDa (ภาพ 29) ซึ่งคาดว่าแถบโปรตีนที่ขนาด 50 kDa น่าจะเป็นโปรตีน MRJP2 เนื่องจากมีขนาดตามที่คาดหวังไว้ และมีการแสดงออกมากกว่าแถบโปรตีนของต้นข้าว Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ส่วนแถบโปรตีนขนาด 47 kDa คาดว่าอาจจะเป็นโปรตีน MRJP2 เช่นเดียวกัน แต่อยู่ในรูปแบบที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งเมล็ดอ่อนและแก่ มีแถบโปรตีนขนาด 70 kDa ซึ่งคาดว่าโปรตีน GUS เนื่องจากมีขนาดโปรตีนเท่ากับโปรตีนของเมล็ดข้าวที่ได้จากต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAMBIA 1301 ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pBU3 มีการเจริญเติบโตปกติ เมื่อเทียบกับต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และเมื่อนำซังน้ำหนัก 100 เมล็ดพบว่า น้ำหนักเมล็ดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพ 29 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ในเมล็ดอ่อนรุ่น T_1 ของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม โดยเทคนิค Western blotting ที่ใช้แอนติบอดี Anti-His

หมายเหตุ เลน M คือ His Protein marker เลน 1 คือ ข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เลน 2-3 คือ ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม BU3-16 และ BU3-20

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการถ่ายยีน *mrjp2* เข้าสู่ข้าว เพื่อเพิ่มกรดอะมิโนจำเป็นในเมล็ด โดยสร้างพลาสมิด pBU3 (*Gt1::mrjp2::Tnos*) สำหรับถ่ายยีนในข้าว และได้ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรมด้วย จากการทดลองสามารถสรุปผลการทดลองได้ ดังนี้

1. ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าว

1.1 การเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ของข้าวในอาหารสูตร N6D ที่มีปริมาณโพรลิน 2.88 กรัมต่อลิตร และ 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าข้าวพันธุ์ Kitaake สามารถเกิดแคลลัสได้สูงกว่าข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตอง ส่วนแคลลัสของข้าวทั้งสองพันธุ์มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยให้แคลลัสที่มีลักษณะที่ดีเหมือนกัน คือ มีสีเหลืองอ่อน กลม แน่น

1.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธีการถ่ายยีนของ Toki (1997) กับวิธีของ Endo et al. (2002) พบว่า วิธีการถ่ายยีนของ Endo et al. (2002) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนมากกว่าวิธีของ Toki (1997) เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดตายสูงกว่า และยังพบอีกว่า เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่รอดของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองมีค่าสูงกว่าข้าวพันธุ์ Kitaake แต่อย่างไรก็ตาม แคลลัสที่รอดของข้าวพันธุ์เหนียวสันป่าตองไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้

2. การตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

2.1 การถ่ายพลาสมิด pBU3 ให้กับข้าวพันธุ์ Kitaake พบว่า ได้ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนทั้งหมด 20 ต้น และเมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* โดยวิธี GUS assay พบว่า ต้นข้าว BU3 เกิดสีฟ้า 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวได้

2.2 เมื่อนำใบของต้นข้าว BU3 ที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* มาตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* พบว่า ต้นข้าวทั้งหมดที่นำมาทดสอบโดยวิธีพีซีอาร์มีการแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมของข้าว

2.3 เมื่อนำต้นข้าวรุ่น T_1 ของต้น BU3 มาทดสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม พบว่า อัตราส่วนฟีโนไทป์ GUS+ : GUS- มีอัตราส่วน 3:1 แสดงว่า การถ่ายทอดของยีนจากต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมไปยังรุ่นต่อไปเป็นไปตามกฎของเมนเดล นอกจากนี้ยังพบว่า มีการถ่ายทอด

ของยีนไปยังรุ่นถัดไปได้ถึงต้นข้าวรุ่น T_3 และ T_4 แสดงว่า การถ่ายทอดยีนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม เป็นไปอย่างคงตัวหรือมีความเสถียร (stable inheritance)

2.4 เมื่อวิเคราะห์ต้นข้าวด้วยเทคนิค Southern blotting โดยใช้ probe ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของยีน *mrjp2* ที่ติดฉลากด้วย DIG พบว่า มีการแทรกของยีน *mrjp2* ในจีโนมของข้าว ดัดแปลงพันธุกรรมที่นำมาทดสอบโดยมียีนแทรกที่บริเวณ 1 ตำแหน่ง (a single insertion site)

3. การแสดงออกของยีน *mrjp2* ในเมล็ดข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

เมื่อนำอาร์เอ็นเอจากเมล็ดข้าวอ่อนรุ่น T_2 และ T_3 ของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม มา ตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *mrjp2* พบว่า มีการแสดงออกของยีน *mrjp2* ในระดับ mRNA ในเมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดจากเมล็ดข้าวแก่ด้วยเทคนิค Western blotting โดยใช้ แอนติบอดี Anti-His พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน GUS ซึ่งมี His tag อยู่ด้านปลาย carboxyl แต่ ไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 ได้ อาจเนื่องจากการแสดงออกของโปรตีน MRJP2 น้อยมาก หรือโปรตีนมีการสลาย (degraded) ในเมล็ดข้าวแก่ และการใช้ Anti-His ตรวจสอบ His tag ของโปรตีน MRJP2 ทำให้มีความจำเพาะต่อ MRJP2 น้อย และมีความไวในการตรวจสอบต่ำ

อย่างไรก็ตามเมื่อนำเมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blotting พบว่า สามารถตรวจสอบโปรตีนขนาดประมาณ 50 kD ซึ่งมีการแสดงออกสูงมากใน เมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรมสูงกว่าเมล็ดข้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งคาดว่าจะเป็นโปรตีน MRJP2 ที่มีการแสดงออกในเมล็ดอ่อนของข้าวดัดแปลงพันธุกรรม

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน MRJP2 คือ Anti-MRJP2 อาจจะช่วยให้ ตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีน *mrjp2* ได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากมีความจำเพาะกับโปรตีน MRJP2 มากกว่าการใช้ Anti-His ซึ่งจะทำให้เพิ่มความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบโปรตีน MRJP2 ได้ดีขึ้น

2. แคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองหลังผ่านขั้นตอนการถ่ายยีนไม่สามารถพัฒนาไป เป็นต้นอ่อนได้ ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของฮอร์โมนในกลุ่มของออกซิน และไซโตไคนินที่ใช้

ไม่เหมาะสม ดังนั้น ต้องมีการศึกษาการชักนำให้แคลสเกิดเป็นต้นให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเฉพาะการหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้แคลสที่ผ่านการถ่ายยีนแล้วเจริญเป็นต้นให้ได้ โดยอาจทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของฮอร์โมนพืช และอาจทดลองเปลี่ยนฮอร์โมนพืชเป็นชนิดอื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

- กรมการค้าภายใน. 2552. ยุทธศาสตร์ข้าวไทย ปี 2550-2554. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.dit.go.thcontentdetail.asptypeid=16&catid=104&ID=1539.pdf> (23 มีนาคม 2552).
- กษิตติศ ดิษฐบรรจง. 2544. การสร้างสิ่งมีชีวิตที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม. เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. น. 6-13. ใน. เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และนิวเคลียร์เทคนิค กรมวิชาการเกษตร.
- เกศสุคนธ์ มณีวรรณ, สุนันทิพย์ บุณนาค และ อนวัช สุวรรณกุล. 2548. การส่งถ่ายยีนโคทิเนสเข้าสู่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. น.375 - 381. ใน เอกสารการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14. กรุงเทพฯ: สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.
- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์, บุรณศักดิ์ เชื้อทอง และ นลินี รุ่งเรืองศรี. 2548. การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย. น.55-56. ใน รายงานประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ทรงเชาว์ อินสัมพันธ์. 2545. ข้าว (*Oryza sativa* L.). น.2-26. ใน. เอกสารประกอบการสอน วิชาพืชไร่สำคัญของประเทศไทย. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- บุญหงษ์ จงคิด. 2547. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 182 น.
- บุรณศักดิ์ เชื้อทอง, ณิชมน ธรรมรักษ์, ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์, แสงทอง พงษ์เจริญกิต, วราภรณ์ แสงทอง และ นลินี รุ่งเรืองศรี. 2549. ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง. น.363-370. ใน. รายงานประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 7. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- ประภา ศรีพิจิตร และ พรทิพย์ ชีวะเศรษฐธรรม. 2537. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพพะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์.) 28 : 27 – 37.

พรทิพย์ ถิ่นจวงจันทร์. 2539. การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคให้กับข้าวไทยบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 86 น.

มรกต ตันติเจริญ และ ศิริพร จำรัสเลิศลักษณ์. ม.ป.ป. เทคโนโลยีชีวภาพกับการพัฒนาสายพันธุ์ข้าว. ปทุมธานี: ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 10 น.

มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2549. จุดกำเนิดและประวัติข้าวไทย. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.thairice.org/html/aboutrice/about_rice1.htm (23 มีนาคม 2552).

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์กุล, สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล และอมรา ทองปาน. 2543. การแสดงออกของยีน Chymotrypsin inhibitor ของถั่วพูในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. น.252-256. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์แห่ง ครั้งที่ 11. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่. 2547. เอกสารแนะนำพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง. น.1-2. ใน. เอกสารเผยแพร่. เชียงใหม่: ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ สันป่าตอง.

สภาหอการค้าแห่งประเทศไทย. 2552. ปริมาณการส่งออกข้าวของไทย ปี 2548-2551. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา [http://www.dft.moc.go.th/level4Frame.asp?sPage=the_files/\\$8/level4/Yc46.htm&level4=223](http://www.dft.moc.go.th/level4Frame.asp?sPage=the_files/$8/level4/Yc46.htm&level4=223) (23 มีนาคม 2552).

อรรควุฒิ ทศน์สองชั้น. 2526. เรื่องของข้าว. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 312น.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 336 น.

อัมมาร สยามวาลา และ วิโรจน์ สยามวาลา. 2533. ประมวลความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศไทย. 436 น.

Aldemita, R.R. and T. K. Hodges. 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. **Planta** 199: 612-617.

Al-Forkan, M., J.B. Power. and M.R. Davey. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of Bangladeshi indica rices. **Cellular & Mol. Bio. Letters** 13: 577 – 582.

- Cao, M.X., J.Q. Huang. and J.A. Lu. 2004. Engineering higher yield and herbicide resistance in rice by *Agrobacterium*-mediated multiple gene transformation. **Crop Science** 44: 2206 – 2213.
- Chan, M.T., H.H. Chang. and S.M. Yu. 1993. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. **Plant Molecular Biology** 22: 491-509.
- Cheng, X., R. Sardana. and I. Altosaar. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proc. Natl. Acad. Sci** 95: 2767-2772.
- Dong, J.J., W.M. Teng. and Hall T.C. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of an elite cultivar of Texas rice. pp.143-151. In. **Rice genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium 16-20 Oct 1995**. Manila (Philippines): International Rice Research Institute.
- Duangporn, S., K. Sirawut. and S. Siriporn. 2003. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 36(6): 572-579.
- Endo, S., K. Sugita¹. and H. Ebinuma¹. 2002. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the *ipt*-type MAT vector system. **The Plant Journal** 30(1): 115-122.
- Fang, Y. and R.I. Pennell. 2005. Method and materials for improving plant drought tolerance. **International Patent no.WO2005/105836 A2**. 10 November 2005.
- Goto, F., T. Yoshihara. and F. Takaiwa. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. **Nat. Biotechnol** 17: 282–286.
- Haseloff, J., K.R. Siemering. and S. Hodge. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green. fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94(6): 2122-2127.

- Hiei, Y., S. Ohta. and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **Plant J** 6: 271-282.
- Hiei, Y., T. Komari. and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Mol. Bio** 35: 205-218.
- Huw, D.J., D. Angela. and W. Huixia. 2005. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. **Plant Methods** 1:5.
- Hwang, S.K. and Y.M. Kim. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes **J. Biochem. Mo. Biol** 33(6): 537-546.
- Imjongjirak, C., S. Klinbunga. and S. Sittipraneed. 2005. Cloning expression and genomic organization of genes encoding major royal jelly protein 1 and 2 of the honey bee (*Apis cerana*). **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 38(1): 49 – 57.
- Judova, J., R.S. Utko. and J. Simuth. 2004. Transformation of tobacco plants with cDNA encoding honey bee royal jelly MRJP1. **Biologia Plantarum** 48(2): 185 – 191.
- Kan, W. 2009. Growth chamber care for transgenic rice plants of Japonica cv. 'Nipponbare' or 'Kitaake' – soilless mix. **[Online]**. Available <http://www.agron.iastate.edu/ptf/Protocol/Rice%20GC%20soilless%20mix%20protocol.pdf> (23 March 2009).
- Kohno, K., I. Okamoto. and M. Kurimoto. 2004. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. **BioSci BioTechnol BioChem** 68(1):138-45.
- Kimura, Y., T. Takaku. and H. Okuda. 2003. Antitumor and antimetastatic actions by royal jelly in Lewis lung carcinoma-bearing mice. **Journal of Traditional Medicines** 20(5): 195-200.

- Lazzeri, P.A. and P.R. Shewry. 1993. Biotechnology of cereals. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews** 11: 79-145.
- Lundberg, K.S., D.D. Shoemaker. and E.J. Mathur. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene** 108: 1-6.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15: 473-497.
- Okita, T.W., Y.S. Hwang. and H.B. Krishnan. 1989. Structure and expression the rice glutelin multigene family. **The journal of Biological Chemistry** 264(21): 12573-12581.
- Peng, L.A., L.L. Lyznik. and T.K. Hodges. 1990. Co-transformation of indica rice protoplasts with *gus A* and *neo* genes. **Plant cell reports** 9: 168-172.
- Saharan, V., R.C. Yadav. and B.P. Chapagain. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice(*Oryza sativa* L.). **African journal of biotechnology** 3(5): 256-259.
- Schmitzova, J., J. Kludiny. and J. Simuth. 1998. A family of major royal jelly proteins of the honey bee *Apis mellifera* L. **Cell Mol. Life. Sci.** 54: 1020-1030.
- Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. **Crop Science** 35: 301 - 309.
- Takenaka, T. and Y. Takenaka. 1996. Royal jelly from *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. **Biosci. Biotech. Biochem** 60: 518-520.
- Taniguchi, Y., K. Kohno. and M. Kurimoto. 2003. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. **International Immunopharmacology** 3(9): 1313-24.
- Thadavong, S., P. Sripichitt. and P. Jompuk. 2002. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of glutinous rice (*Oryza sativa* L.) cultivar TDK1. **Kasetsart J.(Nat.Sci.)** 36: 334-344.

- Toki, S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. **Plant Molecular Biology** 15(1): 16-21.
- Toki, S., N. Hara. and H. Tanaka. 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **The Plant Journal** 47: 969–976.
- Toki, S., S. Takamatsu. and H. Uchimiya. 1992. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. **Plant Physiol** 100: 1503-1507.
- Ye, X., S. Al-Babili. and I. Potrykus. 2000. Engineering provitamin A (b-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. **Science** 287: 303-305.
- Walter, M., C. Chaban. and J. Kudla. 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. **Plant Journal** 40(3): 428-438.
- Yamagata H. and Tanaka K. 1985. The site of synthesis and accumulation of rice storage protein. **Plant & Cell Physiology** 27(1): 135 – 145.
- Zupan, J.R. and P. Zambryski. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiol** 107: 1041-1047.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. **Chotipa Sakulsingharoj**, Siriporn Sittipraneed and Thomas W. Okita. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice with *mrjp2* cDNA from *Apis cerana*. The meeting of the Thailand Research Fund and The Commission of Higher Education. 13-15 October 2005 Regent hotel, Cha am, Petchburi, Thailand.
ผลงานวิจัยที่ได้รับเกียรติบัตรเสนอผลงานวิจัยดีเยี่ยมแบบโปสเตอร์ในการประชุม
นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. 13-15 ตุลาคม 2548
2. **Chotipa Sakulsingharoj**, Buranasak Cheuthong, Nitchamon Thamaragsa, Saengtong Pongjaroenkit, Siriporn Sittipraneed and Thomas W. Okita. 2005. Expression of *mrjp2* gene from Thai honeybee in rice seeds for enhanced essential amino acid content. The 5th International Rice Genetics Symposium (RG5) and 3rd International Rice Functional Genomics Symposium. The EDSA Shangri-la hotel, Manila, Philippines, 20-23 November 2005.
3. บุรณศักดิ์ เชื้อทอง ณิชมน ธรรมรักษ์ ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ แสงทอง พงษ์เจริญกิต วราภรณ์ แสงทอง และณลินี รุ่งเรืองศรี. 2549. ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 7 25-26 พฤษภาคม 2549 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 363-370.
4. Buranasak Chuethong, Nitchamon Thamaragsa, **Chotipa Sakulsingharoj**, Saengtong Pongjaroenkit, Varaporn Sangtong, Siriporn Sittipraneed and Thomas W. Okita. 2007. Rice Transformation of Major Royal Jelly Protein Gene Using *Agrobacterium tumefaciens*. Proceedings, The 2nd International Conference on Rice for the Future. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. 5-9 November, 2007.
5. **Chotipa Sakulsingharoj**, Buranasak Chueathong, Warunee Hermharn, Nitchamon Thamaragsa, Saengtong Pongjaroenkit, Siriporn Sittipraneed and Thomas W. Okita. Transformation and Expression of Major Royal Jelly Protein (*mrjp2*) Gene in Rice for Increased Seed Protein Quality
In preparation.

ภาคผนวก



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) กระทรวงศึกษาธิการ
COMMISSION ON HIGHER EDUCATION



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
THE THAILAND RESEARCH FUND

เกียรติบัตรเสนอผลงานวิจัยดีเด่นแบบโปสเตอร์

เพื่อแสดงว่า

ดร.ช่อทิพา สกุดสิงหาโรจน์

เป็นผู้เสนอผลงานวิจัยดีเด่น

ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่..พ.บ.เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

ระหว่างวันที่ ๑๓ - ๑๕ ตุลาคม ๒๕๔๘

ของมหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำคุณประโยชน์ในด้านการสร้างสรรค์ปัญญา

เพื่อพัฒนาประเทศสืบต่อไปชั่วกาลนาน

Signature

ศาสตราจารย์พิเศษ ดร. ภาวิฑ์ ทองโรจน์
เลขาธิการคณะกรรมการการอุดมศึกษา

Signature

ศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวัติ บุญ-หลง
ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ABSTRACTS



International Rice Genetics Symposium

A platform for exploring developments in rice
genetics and their applications



and 3rd International Rice Functional Genomics Symposium

19-23 November 2005

Edsa Shangri-La Hotel,
Manila, Philippines

IRRI

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE

P372

Expression of *mrjp2* gene from Thai honeybee in rice seeds for enhanced essential amino acid content

Chotipa Sakulsingharoj¹, Buranasak Cheuthong², Nitchamon Thamaragsa³, Saengtong Pongjaroenkit⁴, Siriporn Sittipraneed⁵, Thomas W. Okita⁶
 Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sunsai, Chiang Mai 50290, Thailand

The nutritional content of rice is deficient in several amino acids essential for human growth and development. To increase the protein quality of this cereal, a gene encoding a 'major royal jelly protein' (MRJP) isolated from Thai honeybee *Apis cerana* was transformed into rice. The MRJP was selected as it is of high protein value, its composition consists of an exceptional content (45-49 %) of essential amino acids. Both japonica and indica rice varieties were transformed with the *mrjp2* cDNA under the control of the endosperm-specific glutelin Gt1 promoter and 3' nos terminator. Hygromycin-resistant calli were obtained for both japonica and indica rice lines and showed GUS expression. PCR analysis of leaf genomic DNA from regenerated plants using *mrjp2* gene specific primers showed the expected amplified product of about 500 bp in many transgenic plants. Developing seeds of PCR-positive lines showed the expression of *mrjp2* transcripts by RT-PCR and protein by immunoblotting. Studies to determine the intracellular location of MRJP mRNA and protein in the cell and the amino acid composition of seeds from selected homozygous lines are currently underway. These results as well as future plans to obtain high protein rice will be discussed.

P373

Pea albumin 1b (PA1b), an entomotoxic cysteine-rich peptide, protects transgenic rice seeds against the stored-product pest *Sitophilus oryzae*

Julie Petit¹, Gabrielle Duport², Yvan Rahbé², Emmanuel Guiderdoni¹, J.C. Breittler¹
¹CIRAD-AMIS, UMR PIA, TA 40/03, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France, ²UMR INRA-INSA de Lyon BF2I (Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions), Bat. Louis-Pasteur, 20 av. A. Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France

Pea albumin 1b (PA1b), a plant entomotoxin isolated from *Pisum sativum* (Delobel et al., 1998), was used to generate transgenic rice lines resistant to the stored-product insect pest *Sitophilus oryzae*. PA1b is the result of the post-transcriptional cleavage of the albumin polypeptide PA1 which also leads to the release of a second peptide, PA1a (53 amino acids). PA1b is a cysteine-rich peptide of 37 amino acids belonging to the cystine-knot family (Jouvencal et al., 2003). In pea, different nucleotide sequences (Louis et al., 2004) and protein extracts (Taylor et al., 2004) corresponding to PA1b have been isolated underlying the multigenic character of this new family of plant entomotoxin. Two isoforms of *pa1* gene (AJ574794 and AJ574795), placed under the control of the maize ubiquitin promoter, were introduced in rice (cv. Zhong Zuo 321) by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (Sallaud et al., 2003) and studied separately. 24 T0 events of each isoform were regenerated and characterized by RT-PCR and Southern blot. T1 and T2 seeds were analyzed by Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) and by in situ western hybridization (Qu et al., 2003). The latter technique allowed to localize PA1b accumulation in embryo and aleurone layer. Resistance of T2 elite lines was tested in bioassay by feeding 20 rice weevil adults with 5 transgenic seeds. Maximum of mortality was raised by line 30.16 after 5 days (AJ574795) and by line 55.19 after 4 days (AJ574794) of bioassay. Resistance of T3 seeds will be examined in selected homozygous T2 lines.



Expression of *mrjp2* gene from Thai honeybee in rice seeds for enhanced essential amino acid content

Chotipa Sakulsingharoj^a, Buranasak Cheuthong^a, Nitchamon Thamaragsa^a, Saengtong Pongjaroenkit^a, Siriporn Sittipraneed^b and Thomas W. Okita^c

^a Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sunai, Chiang Mai, 50290, Thailand.

^b Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

^c Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA, 99164-66340 USA.

Abstract

The nutritional content of rice is deficient in several amino acids essential for human growth and development. To increase the protein quality of this cereal, a gene encoding a 'major royal jelly protein' (MRJP) isolated from Thai honeybee *Apis cerana* was transformed into rice. The MRJP was selected as it is of high protein value as its composition consists of an exceptional content (45 - 49 %) of essential amino acids. Both *japonica* and *indica* rice varieties were transformed with the *mrjp2* cDNA under the control of the endosperm - specific glutelin *Gt1* promoter and 3' *nos* terminator. Hygromycin - resistant calli were obtained for both *japonica* and *indica* rice lines and showed GUS expression. PCR analysis of leaf genomic DNA from regenerated plants using *mrjp2* gene specific primers showed the expected amplified product of about 500 bp in many transgenic plants. Developing seeds of PCR - positive lines showed the expression of *mrjp2* transcripts by RT - PCR. Studies to determine the intracellular location of MRJP mRNA and protein in the cell and the amino acid composition of seeds from selected homozygous lines are currently underway.

Objective

To transform rice with *mrjp2* cDNA from Thai honeybee (*Apis cerana*) for increased essential amino acid content in rice seeds.

Methods

Plasmid construction

mrjp2 cDNA isolated from Thai *Apis cerana* (Imjongirak *et al.*, 2005) was cloned into pYW502 to construct the T - DNA vector, pBU2, for rice transformation. The plasmid pBU2 contains the *mrjp2* cDNA under the control of *Gt1* promoter, endosperm - specific promoter and *nos* terminator.

Rice transformation

Mature seeds of *japonica* rice cv. Kitaake and *indica* rice cv. Niaw Sunpahtawng were dehulled, surface sterilized and then cultured on N6D medium for 4 weeks. The calli were subcultured onto fresh medium for 3 - 4 days. The calli were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 harboring the T - DNA based vector, pBU2 using the protocol modified from Toki (1997).

Molecular analysis

Leaf DNA from primary transgenic plants was extracted and subjected to PCR analysis using primers specific to *mrjp2* cDNA. Total RNA from transgenic developing seeds was extracted and subjected to one - step RT - PCR analysis using primers specific to *mrjp2* cDNA.

Results and Discussion

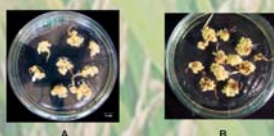


Figure 1. Calli were induced from mature seeds of *japonica* rice, Kitaake (A) and *indica* rice, Niaw Sunpahtawng (B) after culture on N6D medium for 4 weeks.



Figure 2. Hygromycin resistant calli of Kitaake and Niaw Sunpahtawng showed GUS positive, indicating that the calli were transformed.



Figure 3. Leaf segments of some regenerated transformed plants was analyzed by GUS assay, showing GUS expression.

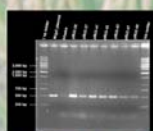


Figure 4. PCR analysis of genomic DNA from primary transgenic plants for *mrjp2* gene. Genomic DNA from control Kitaake and several independent transgenic lines was analyzed using PCR to determine the presence of the *mrjp2* gene. The positive control was plasmid DNA containing *mrjp2* cDNA. All transgenic plants tested showed the expected 500 bp PCR products, indicating the presence of *mrjp2* gene in their genome.

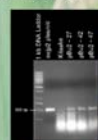


Figure 5. RT - PCR analysis of T_1 developing seeds for *mrjp2* transcripts. Total RNA from control Kitaake and transgenic rice seeds was analyzed using RT - PCR for expression of *mrjp2* transcripts. The result showed that the transgenic rice seeds contained *mrjp2* transcripts.

Table 1. Segregation of *mrjp2* gene in T_1 progeny. Leaf genomic DNA of T_1 progeny was analyzed by PCR using specific primers for *mrjp2* gene. The selected lines (27 and 42) analyzed showed a ratio of 3 positive : 1 negative, suggesting the *mrjp2* gene was inserted at a single locus in the rice genome.

Lines#	<i>mrjp2</i> positive	<i>mrjp2</i> negative	Chi square
27	17	3	1.070
42	14	6	0.267

Conclusions

1. Transformation of rice with *mrjp2* cDNA was successful.
2. Transgenic rice plants expressed *mrjp2* transcripts in developing seeds.
3. T_1 progeny of transgenic lines were segregated as Mendelian pattern of 3: 1 ratio.

References

- Imjongirak, C., Klinbunga, S. and Sittipraneed, S. 2005. Cloning expression and genomic organization of genes encoding major royal jelly protein 1 and 2 of the honey bee (*Apis cerana*). *J. Biochem. Mol. Biol.*, 38 (1), 49-57.
- Rashid H., Yokoi S., Toriyama K. and Hinata K. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. *Plant Cell Report.* 15:727-730.
- Toki S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology Reporter.* 15(1):16-21.

Acknowledgements

This study was supported by the grant from the Thailand Research Fund and the National Research Council of Thailand.

ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง

Transformation Efficiency of Glutinous Rice cv. Niaw Sanpahtawng

บุรณศักดิ์ เชื้อทอง¹ ณิชนน ธรรมรักษ์¹ ช่อทิพา สกกุลสิงหาโรจน์² แสงทอง พงษ์เจริญกิต²

วารารณ แสงทอง² และนลินี รุ่งเรืองศรี²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

การถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์เหนียวสันป่าตองในรายงานวิจัยที่ผ่านมามีประสิทธิภาพต่ำ และยังไม่สามารถได้ต้นข้าวเหนียวดัดแปลงพันธุกรรม ในงานวิจัยนี้ จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายยีน โดยศึกษาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัส พบว่า ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ ได้ศึกษาการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวเหนียวโดยเชื้ออโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ AGL1 ที่มี binary vector pCAMBIA1303 โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากการถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 พบว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มแคลลัสในสารละลายอโกรแบคทีเรีย คือ 15 นาที โดยให้แคลลัสที่ด้านยาไฮโกรมัยซินสูงถึง 54.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าในรายงานที่ผ่านมาประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ด้านยาไฮโกรมัยซิน มีการแสดงออกของยีน *gusA* และสามารถพัฒนาเป็นต้นได้ จากการวิเคราะห์ต้นข้าวในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้โพรบมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าว และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* และ *hptII* พบว่า มีการแทรกของยีนในจีโนมของต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรม จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถสร้างต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม และสามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตองด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมในอนาคตได้

Abstract

Transformation efficiency of glutinous rice cv. Niaw Sanpahtawng has remained low and transgenic plants have not yet been obtained. The objective of this research was to study the effects of certain factors on rice transformation to improve transformation efficiency. It was found that the antibiotic hygromycin concentration for selection of transformed Niaw Sanpahtawng calli was 50 mg/l which inhibited growth of untransformed calli about 92%. *Agrobacterium*-mediated transformation was performed using *A. tumefaciens* AGL1 harboring binary vector pCAMBIA1303 according to the modified method of transformation of RD 6. The infection time of 15 min produced the highest percentage (54.37%) of hygromycin-resistant calli that was about 35% higher than previously reported. PCR analysis of leaf genomic DNA from transformed plants was conducted using primers specific to *gusA* and *hptII* genes. The result indicated that the *hptII* and *gusA* genes were integrated into the rice genome. The first transgenic Niaw Sanpahtawng was grown in the greenhouse. Overall, this research provided the promising result for future improvement of Niaw Sanpahtawng rice variety by genetic engineering.

Key words: transformation, binary vector, PCR, transgenic plant

คำนำ

ข้าวเหนียวที่นิยมบริโภคเป็นอาหารหลักในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ โดยข้าวเหนียวพันธุ์เหนียวสันป่าตองเป็นข้าวเหนียวที่ปลูกมากเป็นอันดับสามของภาคเหนือ และเป็นข้าวที่มีลักษณะที่ดี คุณภาพการขัดสีดี ที่หุงต้มอ่อนนุ่ม น้ำหนักเมล็ดดี โดยให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูง จำหน่ายได้ราคา เกษตรกรจึงนิยมปลูกกันมาก แต่ข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ปลูกได้เฉพาะในฤดูนาปีเท่านั้น (สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง, 2547)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการคัดเลือกหลังการผสมข้ามพันธุ์แบบดั้งเดิม ใช้เวลานานหลายปี กว่า จะคัดเลือกได้พันธุ์ใหม่ที่ดียิ่งขึ้น การนำเอาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเป็นอีกวิธีหนึ่งเพื่อที่จะลดระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง และได้ลักษณะตามที่ต้องการโดยไม่เกิดการสูญเสียลักษณะที่ดีของแต่ละพันธุ์ไป ซึ่งเทคนิคพันธุวิศวกรรมที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ ได้แก่ การใช้เครื่องยิงอนุภาค และการถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอโกรแบคทีเรีย

การถ่ายยีนโดยใช้อโกรแบคทีเรีย เป็นวิธีการถ่ายยีนโดยใช้พาหะเป็นตัวกลางในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช ภายในแบคทีเรียมีดีเอ็นเอที่เป็นวงหรือพลาสมิด Ti (tumor inducing plasmid) เป็นตัวชักนำให้เกิดการส่งถ่ายยีน บน Ti plasmid ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่เรียกว่า T-DNA จะถูกส่งจากแบคทีเรียเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์พืช แล้วรวมตัวเข้ากับโครโมโซมพืช (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2546)

การใช้อโกรแบคทีเรียมีข้อดี คือ ประหยัด เนื่องจากไม่ใช้เครื่องมือและวัสดุที่มีราคาแพง ทำให้สะดวกในการถ่ายยีน อีกทั้ง ดีเอ็นเอที่ถ่ายทอดเข้าไปมีการจัดเรียงตัวใหม่บ่อย และยีนที่ถ่ายเข้าไปนั้นสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้อย่างเสถียร (Hiei *et al.*, 1997)

ความสำเร็จในการถ่ายยีนขึ้นกับปัจจัยสำคัญหลายประการ ได้แก่ การชักนำให้เกิดแคลลัสที่ดี ประสิทธิภาพในการชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้น รวมถึงสภาวะในการถ่ายยีน (Hiei *et al.*, 1997) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัส และระยะเวลาของการบ่มแคลลัสกับเชื้ออโกรแบคทีเรีย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนของข้าวเหนียวสันป่าตอง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงแคลลัส

นำเมล็ดแก่ของข้าวเหนียวสันป่าตองมาลอกเปลือกออก แล้วทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10% วางเมล็ดข้าวบนอาหารสูตร N6D ที่มีปริมาณโพสลิ้น 2.88 ก./ล. และ 2,4-D 2 มก./ล. เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากนั้น ทำการย้ายแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ลงอาหารใหม่สูตร N6D เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเตรียมสำหรับทำการถ่ายยีน

การศึกษาปริมาณยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน

ย้ายแคลลัสที่เพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ ลงบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ที่มียาปฏิชีวนะความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน คือ 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย

ทำการถ่ายยีนโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Pipatpanukul *et al.* (2004) โดยละลายเชื้ออโกรแบคทีเรียลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มก./ล. ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 - 0.5 แล้วเติม acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ ทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง นำแคลลัสที่เตรียมไว้แล้วบ่มร่วมกับสารละลายอโกรแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที แล้วย้ายแคลลัสวางบนอาหารแข็งสูตร 2N6 - AS เพื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเชื้ออโกรแบคทีเรียและแคลลัสนาน 3 วัน ในที่มีด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น ล้างแคลลัส แล้วย้ายลงบนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสม แล้วย้ายแคลลัสที่ต้านทานยาไฮโกรมัยซินลงอาหารสูตร MS ที่มี NAA 0.2 มก./ล. และ Kinetin 2 มก./ล. เพื่อชักนำให้เกิดต้น

การทดสอบการแสดงออกของยีน *gusA*

นำแคลลัสบางส่วนที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มียาไฮโกรมัยซิน และชิ้นส่วนใบของต้นข้าว มาทดสอบการถ่ายยีน โดยบ่มร่วมกับสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-24 ชั่วโมง แคลลัสที่มีการแสดงออกของยีน *gusA* จะสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase แล้วเปลี่ยน X-gluc ให้ได้สารสีฟ้า

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำใบข้าวประมาณ 100 มิลลิกรัม มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Hwang and Kim (2000) โดยบดใบข้าวในไนโตรเจนเหลว จากนั้น เติมสารละลาย mCTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 โมลาร์, Tris-HCl 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, EDTA 50 มิลลิโมลาร์, PVP 1%, sodium metabisulfite 0.5%, β -mercaptoethanol 1%) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสไว้ แล้วเติมคลอโรฟอร์มเพื่อกำจัดโปรตีน จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นน้ำ แล้วเติม absolute ethanol เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอในต้นข้าวโดยเทคนิคพีซีอาร์

ตรวจสอบข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิคพีซีอาร์ในปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยจีโนมิกดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพริเมอร์ 25 พิโคโมล และ Taq DNA polymerase (Fermentas) 1.25 หน่วย โดยใช้ไพริเมอร์ 2 คู่ ดังนี้ คู่ที่ 1 คือ FgusA-1 (Biobasic) 5'-TGA AGA TGC GGA CTT ACG TG-3' และ RgusA-1 (Biobasic) 5'-GGC ACA GCA CAT CAA AGA GA-3' คู่ที่ 2 คือ FhptII (BSU) 5'-CTT GAC ATT GGG GAG TTT AGC GAG A-3' และ RhptII (BSU) 5'-ATC GGC GAG TAC TTC TAC ACA GCC A-3'

ไพริเมอร์คู่ที่ 1 จำเพาะต่อ ยีน *gusA* ไพริเมอร์คู่ที่ 2 จำเพาะต่อยีน *hptII* ซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ สภาวะของพีซีอาร์ เครื่อง PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) ที่ใช้ คือ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเข้าสู่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Denaturation) 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Annealing) และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (Extension) โดยทำซ้ำจำนวน 35 รอบ จึงเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลของพีซีอาร์ โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกแคลลัส

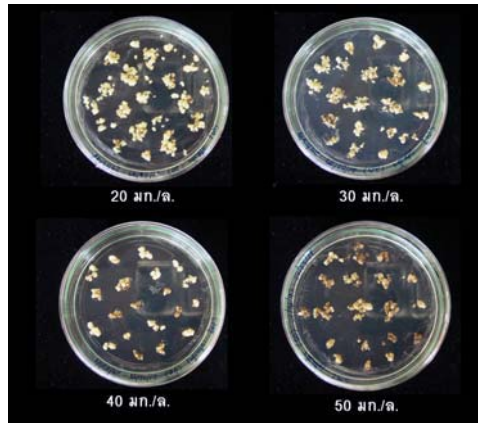
ในขั้นตอนการถ่ายยีน จะต้องทำการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีนออกจากแคลลัสที่ไม่ได้รับยีน โดยอาศัยคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะของแคลลัสที่ได้รับยีน ดังนั้น จึงได้ทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน

เมื่อย้ายแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองที่เลี้ยงบนอาหารสูตร N6D เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มาทดสอบหาความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน โดยนำมาวางบนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 50 มก./ล. ทำให้แคลลัสที่ไม่ได้รับยีนไม่เจริญเติบโตถึง 92 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้คัดเลือกแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตองที่ได้รับยีนและต้านทานต่อยาไฮโกรมัยซิน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) แคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ในระดับที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับ กข 6 และข้าวญี่ปุ่นพันธุ์ Kitaake ซึ่งยาไฮโกรมัยซินที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน คือ 15 มก./ล. (ช่อทิพา และคณะ, 2548ก) และ 30 มก./ล. (Sakulsingharoj *et al.*, 2004) ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าข้าวแต่ละพันธุ์ทนต่อระดับยาต่าง ๆ กัน ในการศึกษาการถ่ายยีน ควรศึกษาความเหมาะสมของระดับยาปฏิชีวนะ ก่อนที่จะทำการถ่ายยีน

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของยาไฮโกรมัยซินที่มีผลต่อการเจริญของแคลลัสของข้าวเหนียวสันป่าตอง

ความเข้มข้นของยาไฮโกรมัยซิน (มก./ล.)	จำนวนแคลลัส เริ่มต้น	จำนวนแคลลัส ที่เจริญได้	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เจริญ ได้บนอาหารคัดเลือก ^{1/}
20	61	54	88.61 ^a
30	61	47	77.05 ^{ab}
40	59	41	69.49 ^b
50	48	4	8.33 ^c
F-test			**
CV(%)			10.30

^{1/}ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (เปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี DMRT)



ภาพที่ 1 ลักษณะแคลลัสที่เจริญบนอาหารคัดเลือกที่มีความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะไฮโครมัยซินต่างๆ กัน

ระยะเวลาสำหรับการบ่มแคลลัสในสารละลายไฮโครมัยซิน

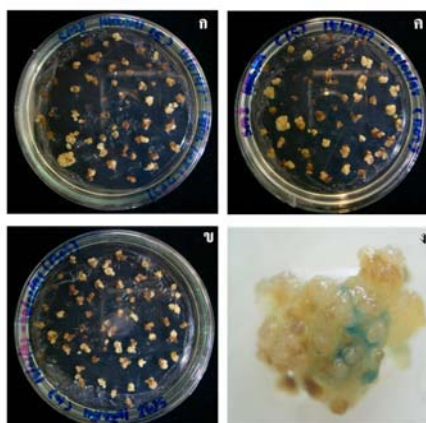
การถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยวิธีที่ดัดแปลงจากการถ่ายยีนในข้าวญี่ปุ่น (Toki, 1997) ซึ่งรายงานโดยช่อทิพา และคณะ (2548ข) มีประสิทธิภาพต่ำ และเมื่อตรวจต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน ไม่พบยีนเครื่องหมายและยีนรายงานผลในจีโนม จึงได้ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีน โดยวิธีที่ดัดแปลงจากการถ่ายยีนในข้าวเหนียว กข 6 (Pipatpanukul *et al.*, 2004; ช่อทิพา และคณะ, 2548ก) ซึ่งต่างจากเดิมที่สูตรอาหารและการเตรียมเชื้อไฮโครมัยซิน พบว่า ระยะเวลาที่ใช้บ่มแคลลัสร่วมกับเชื้อไฮโครมัยซินที่เหมาะสมที่สุด คือ 15 นาที เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ต้านยาไฮโครมัยซินสูงถึง 54.37 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2) ซึ่งสูงกว่าวิธีของช่อทิพา และคณะ (2548ข) ซึ่งให้แคลลัสที่ต้านยาไฮโครมัยซิน 40.38 เปอร์เซ็นต์

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ได้สุ่มแคลลัสมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gusA* พบว่า แคลลัสสามารถเกิดสีฟ้า แสดงว่า แคลลัสได้รับยีนที่ถ่ายเข้าไป

ตารางที่ 2 อิทธิพลของระยะเวลาการบ่มแคลลัสร่วมกับสารละลายไฮโครมัยซิน (infection time) ต่อประสิทธิภาพในการถ่ายยีน

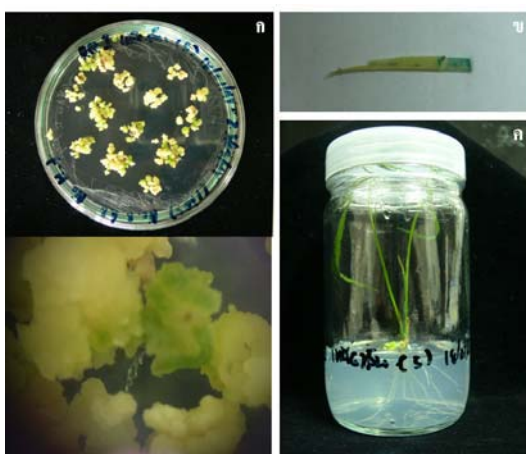
ระยะเวลาบ่ม (นาที)	จำนวนแคลลัส เริ่มต้น	จำนวนแคลลัสที่ ต้านยาไฮโครมัยซิน	เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่เจริญได้ บนอาหารคัดเลือก ^{1/}
5.00	47	12	25.53 ^b
10.00	52	26	50.00 ^a
15.00	46	25	54.37 ^a
F-test			**
CV(%)			4.78

^{1/}ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์ที่มีตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (เปรียบเทียบทางสถิติ ด้วยวิธี DMRT)



ภาพที่ 2 ลักษณะของแคลลัสบนอาหารคัดเลือกที่มีไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากผ่านการถ่ายยีนที่ใช้ช่วงเวลา 5, 10 และ 15 นาที (ก, ข และ ค ตามลำดับ) แคลลัสที่ต้านทานยาไฮโกรมัยซินมีการแสดงออกของยีน *gusA* (ง)

เมื่อนำแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินมาชักนำให้เกิดต้น หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แคลลัสเกิดจุดเขียว และพัฒนาเป็นต้นข้าวได้ 3 ต้น (ภาพที่ 3 ก และ ค) เมื่อนำใบของต้นข้าวเหนียวสันป่าตองมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gusA* พบว่า มีเพียง 1 ต้น ที่ใบข้าวเกิดสีฟ้า (ภาพที่ 3 ข) แสดงว่า มีการแสดงออกของยีน *gusA*

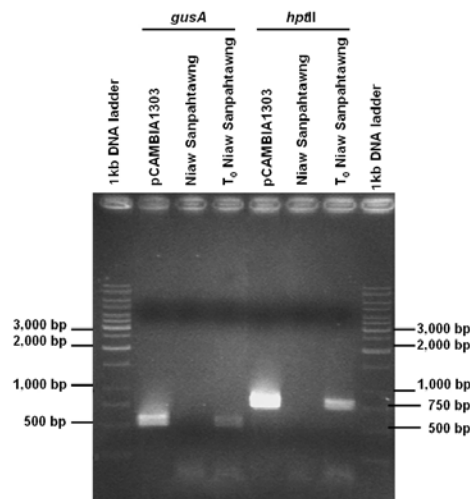


ภาพที่ 3 การพัฒนาเป็นต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม
 ก. ลักษณะแคลลัสที่ต้านยาไฮโกรมัยซินเจริญบนอาหารชักนำให้เกิดต้น
 ข. ใบข้าวเหนียวสันป่าตองที่มีการแสดงออกของยีน *gusA*
 ค. ต้นอ่อนที่เจริญบนอาหารมีการพัฒนารากและยอดที่สมบูรณ์

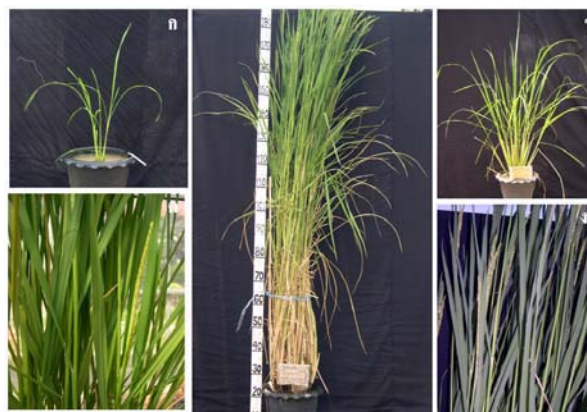
การแทรกของยีน *gusA* และ *hptII* ในจีโนมข้าว

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของข้าวเหนียวสันป่าตองมาตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *gusA* และ *hptII* พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลผลิตพีซีอาร์ตามที่คาดหมายไว้ แสดงว่า มีการแทรกของยีน *gusA* และ *hptII* ในจีโนมของข้าวเหนียวสันป่าตอง (ภาพที่ 4)

ต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรมที่เจริญในโรงเรือน มีความสูงประมาณ 2 เมตร แต่เมล็ดที่เกิดขึ้นมีลักษณะลีบ ฝ่อ (ภาพที่ 5) ไม่สามารถนำไปทดสอบขั้นต่อไปได้ ทั้งนี้ อาจเนื่องจากการส่งถ่ายยีนโดยเชื้ออโกรแบคทีเรียทำให้เกิดการแทรกของยีนในจีโนมพืชแบบสุ่ม ซึ่งอาจไปมีผลต่อการสร้างเมล็ดของข้าวเหนียว



ภาพที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบยีน *gusA* และ *hptII* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งคาดหวังแถบดีเอ็นเอที่ 500 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ โดย pCambia1303 ใช้เป็น positive control, Niaw Sanpahtawng เป็น negative control, T₀ Niaw Sanpahtawng เป็นตัวอย่างจากต้นข้าวเหนียวสันป่าตองที่มีการแสดงออกของยีน *gusA*



ภาพที่ 5 ลักษณะของต้นข้าวเหนียวสันป่าตองดัดแปลงพันธุกรรม อายุ 1 เดือน (ก), 2 เดือน (ข), ตั้งท้อง (ค) และออกรวง (ง) ที่เจริญในโรงเรือน

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตอง พบว่า ยาปฏิชีวนะไฮโครมัยซินที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน คือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มแคลลัสในสารละลายอโกรแบคทีเรียคือ 15 นาที โดยหลังการถ่ายยีน แคลลัสที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกมีการพัฒนาเป็นต้นข้าวที่สมบูรณ์ จากผลการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า มีการแทรกของยีนเครื่องหมาย และยีนรายงานผลในจีโนมข้าว แสดงให้เห็นว่า สามารถถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสและพัฒนาให้

เกิดต้นข้าวเหนียวดัดแปลงพันธุกรรมได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตองด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับความอนุเคราะห์เชื้ออโกรแบคทีเรียและ binary vector และ รศ.ประวิตร พุธานนท์ ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ ณิชมน ธรรมรักษ์ พิชญภา มหาสุข แสงทอง พงษ์เจริญกิต และนลินี รุ่งเรืองศรี. 2548ก. การถ่ายยีนในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6 19-20 พฤษภาคม 2548 มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ บุณศักดิ์ เชื้อทอง พรพนัช มีกุล วราภรณ์ แสงทอง และนลินี รุ่งเรืองศรี. 2548ข. การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในข้าวเหนียวสันป่าตองโดยใช้เชื้ออโกรแบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6 19-20 พฤษภาคม 2548 มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง. 2547. เอกสารแนะนำพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง. สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง, เชียงใหม่.
- มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2546. “การสร้างพืชพันธุวิศวกรรม (Genetically Engineered Crops)”. Hiei Y., T.Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Bio. 35: 205-218.
- Hwang S.K. and Y.M. Kim. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. J. Biochem. Mo. Biol. 33(6): 537-546.
- Pipatpanukul T., S. Bunnag, P. Theerakulpisut and M. Kosittitrakul. 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD 6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Songkhlanakarin J. Sci. Technol. 26(1): 1-13.
- Sakulsingharoj C., S.B. Choi, G.E. Edwards, J. Preiss and T.W. Okita. 2004. Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: The role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase. Plant Sci. 167: 1323-1333.
- Toki S. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Plant Mol. Bio. Reporter. 15(1): 16-21.
- <http://rice.kps.ku.ac.th/lesson/molecular/chapter8>

Life's Innovations
at their Best

bio
asia 2007

The 1st International Trade Exhibition
and Conference for Biotechnology

www.bioasia-2007.com

Proceedings Proceedings

**The 2nd International Conference
on Rice for the Future**

5-9 November 2007
Queen Sirikit National Convention Center
Bangkok, Thailand



Rice Transformation of Major Royal Jelly Protein Gene Using *Agrobacterium tumefaciens*

Buranasak Chuethong^a, Nitchamon Thamaragsa^a, Chotipa Sakulsingharoj^a, Saengtong Pongjaroenkit^a,
Varaporn Sangtong^a, Siriporn Sittipraneed^b and Thomas W. Okita^c

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sunsai, Chiang Mai, 50290, Thailand

^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

^cInstitute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA, 99164-66340 USA

Abstract

Transformation and expression of major royal jelly protein (*mrjp2*) gene in rice were studied. The *mrjp2* gene isolated from Thai honeybee (*Apis cerana*) encodes a protein with high essential amino acids required for human growth and development. Scutella-derived calli established from mature rice seeds were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 harboring pBU3 and pNT5 plasmids containing *mrjp2* gene driven by endosperm-specific *Gtl* promoter and 35S CaMV dual enhancer promoter, respectively. Hygromycin-resistant calli were obtained after secondary cycle of selection on selective medium and regenerated to plantlets. GUS activity was detected on leaf segments of T₀ transgenic plants. PCR analysis of leaf genomic DNA using *mrjp2* specific primers showed the expected products, indicating the integration of *mrjp2* gene in transgenic plant genomes. Then, total RNA from seeds and leaves of transgenic plants transformed with pBU3 and pNT5, respectively, were extracted for RT-PCR analysis. The results showed that the *mrjp2* gene was expressed at mRNA level. Expression of MRJP2 protein in selected transgenic lines has been being investigated.

Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is daily consumed by more than half of the world's population. Rice seeds are rich in carbohydrates but low in proteins (limiting in some essential amino acids), vitamins and minerals. Genetic engineering may be an alternative way to increase protein quality in rice seeds.

Major Royal Jelly Proteins (MRJPs) are abundant proteins in royal jelly (RJ) which plays a nutritional role in larval development of honey bee queen. Royal jelly is isolated from hypopharyngeal glands of nurse bees. MRJPs in royal jelly are divided into 5 families (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4 and MRJP5). The *mrjp1* and *mrjp2* cDNAs isolated from Thai honey bee (*Apis cerana*) were reported (Imjongjirak *et al.*, 2005). The MRJP1 and MRJP2 contain 45-49% essential amino acids. Judova *et al.* (2004) transformed *mrjp1* gene into tobacco and protein analysis of transgenic tobacco leaves showed expression of MRJP1.

The aim of this work was to transform the *mrjp2* gene into rice using endosperm specific *Gtl* promoter and 35S CaMV dual promoter. Furthermore, the expression of this gene in transgenic rice plants containing different promoters would be studied.

Materials and Methods

Mature seeds of *japonica* rice cultivar Kitaake were surface sterilized with 10 % sodium hypochlorite for 15 min, twice and then washed four times with sterile distilled water. The sterile seeds were then cultured on N6D medium (Toki, 1997) under dark conditions at 28 ± 2 °C for 4 weeks. The compact calli derived from scutellum tissues were used for *Agrobacterium*-mediated transformation following a modified protocol of Toki (1997). *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 harboring binary vectors, pBU3 (*Gtl::mrjp2::Tnos*) or pNT5 (35S CaMV dual::*mrjp2::Tnos*), was used for transformation. Both vectors contained the *hptII* gene

conferring hygromycin resistance, as a selectable marker gene and *gusA* gene coding for β -glucuronidase, as a reporter gene. The transformed calli were selected on N6D medium supplemented with hygromycin. Then, hygromycin – resistant calli were transferred to regeneration medium (modified MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 2.5 mg/L kinetin) and cultured under 16 h/day light conditions.

For *Gus* activity, leaf tissues collected from transformed rice plants were incubated with *GUS* solution containing X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronidase) at 37°C, as described by Jefferson *et al.* (1987). Leaf genomic DNA isolated from *Gus*-positive T_0 plants were subjected to PCR analysis. For RT-PCR, total RNA were isolated from seeds at milky stage and from leaves of transgenic rice plants transformed with pBU3 and pNT5 plasmids, respectively. Primer pairs specific for the *myl2* gene were used for both analyses.

Results and Discussion

In this study, Kitaake embryogenic calli (globular, yellow, and compact) were developed from scutellum region of seeds and used for transformation (Fig 1). The transformed calli with pBU3 and pNT5 plasmids that contain *hptII* and *gusA* genes were grown on selective medium supplemented with hygromycin and regenerated to plantlets. Then, the regenerated plants were transferred to soil and grown in the greenhouse. Hygromycin – resistant calli and transformed rice plants showed *GUS* expression when incubated with X-Gluc (Fig 2).

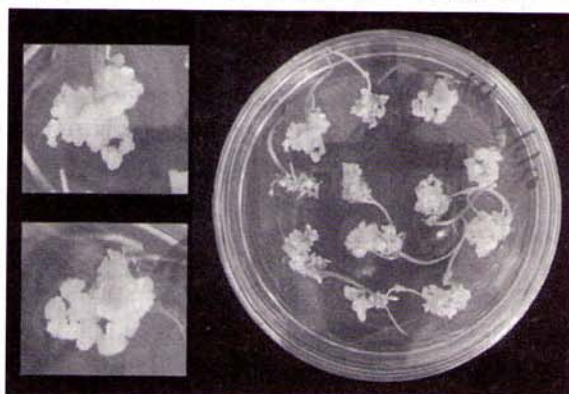


Figure 1 Kitaake calli that were used for *Agrobacterium* – mediated transformation.

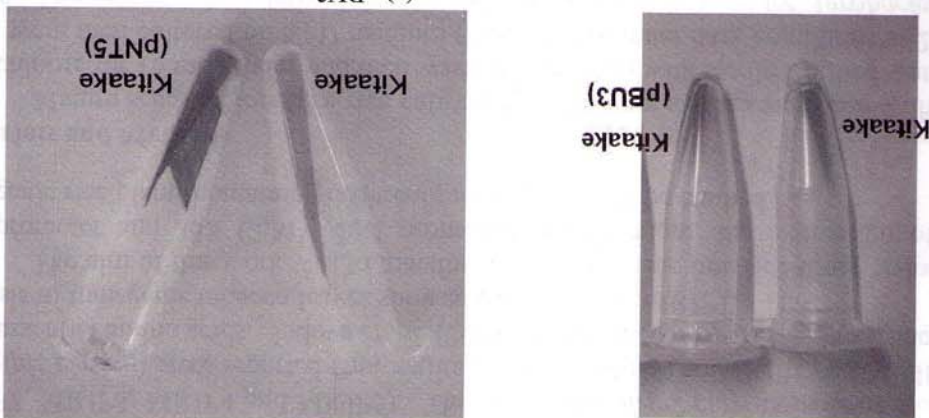


Figure 2 *GUS* expression of transgenic rice plants that were transformed with pBU3 (a) and pNT5 (b) plasmids.

Genomic DNA were extracted from leaves of transformed plants for PCR analysis. The PCR results showed the expected bands of *mrjp2* gene fragments (500 bp) (Fig 3). It indicated that we successfully transformed *mrjp2* gene into rice. The *mrjp2* gene was stably integrated into rice genome of pBU3 and pNT5 plants.

For RT-PCR analysis, the total RNA were extracted from developing seeds and leaves of pBU3 and pNT5 transformed plants, respectively. We found the 500 bp fragments amplified from the RT-PCR reactions. The controls were also performed using the total RNA for the PCR reactions which resulted in no amplified products (data not shown). These results indicated that the *mrjp2* gene was expressed at mRNA levels in transgenic rice plants (Fig 4).

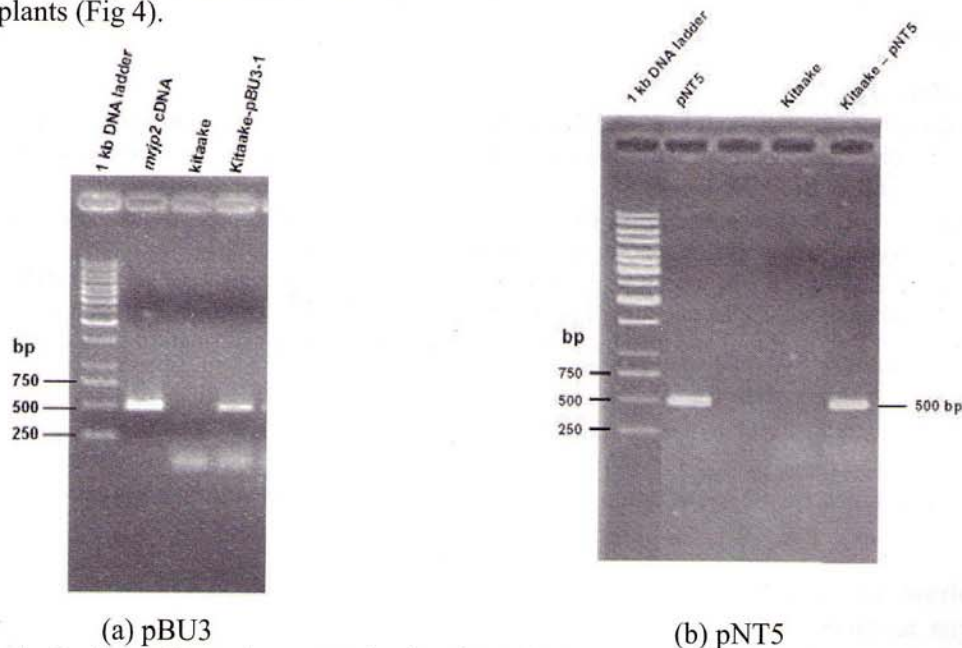


Figure 3. PCR analysis of *mrjp2* gene in transgenic rice plants that were transformed with pBU3 (a) and pNT5 (b).

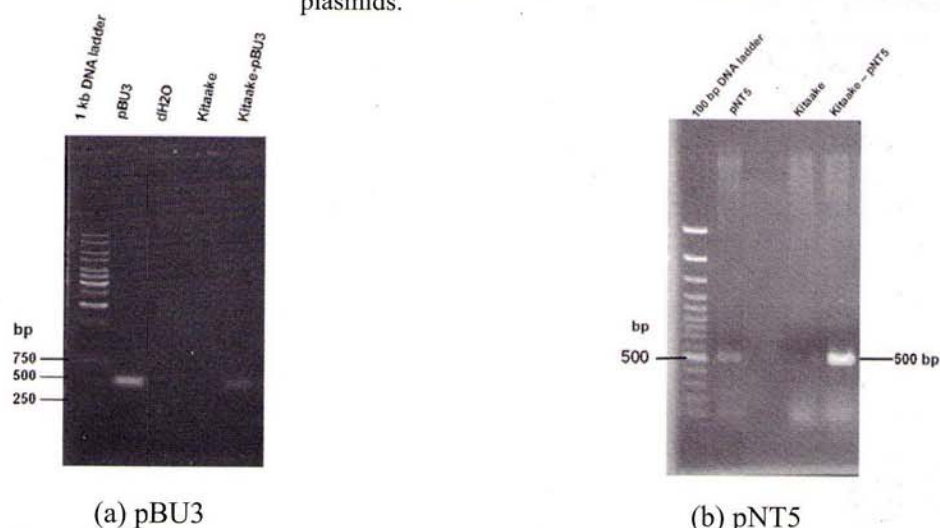
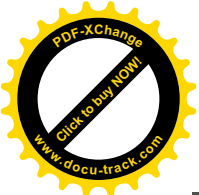


Figure 4. RT-PCR analysis of *mrjp2* gene expression in transgenic rice plants that were transformed with pBU3 (a) and pNT5 (b).



BioAsia2007

Conclusions

Transformed calli with pBU3 and pNT5 could be regenerated to transgenic rice plants. The *mrjp2* gene was inserted in the genome of transgenic rice. The *mrjp2* gene was expressed at mRNA levels under the control of endosperm specific *Gt1* promoter and 35S CaMV dual promoter in seeds and leaves of transgenic rice plants, respectively. A comparison of expression levels of MRJP2 proteins in transgenic plants containing these two different promoters has been being studied.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the National Research Council of Thailand, The Thailand Research Fund and Commission on Higher Education.

References

- Imjongjirak, C., Klinbunga, S. and Sittipraneed, S. (2005). Cloning, expression and genomic organization of genes encoding major royal jelly protein 1 and 2 of the honey bee (*Apis cerana*). *J. Biochem. Molec. Biol.* 38 (1): 49-57.
- Jefferson, R. A., Kavanagh T. A., Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Júdova, J., Šutka, R., Klaudiny, J., Lišková D., Ow, D.W. and Šimúth J. (2004). Transformation of tobacco plants with cDNA encoding honeybee royal jelly MRJP1. *Biologia Plantarum.* 48 (2): 85-191.
- Toki, S. (1997). Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 16-21.