

การโคลน การแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านต่างชนิดและฤทธิ์ต้านจุลชีพของไทโออินินและสแนคินจาก
ข้าว *Oryza sativa* L. subsp. *japonica*



นางสาวกฤษณา บุญภา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLOWING, HETEROLOGOUS EXPRESSION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THIONIN
AND SNAKIN FROM RICE *Oryza sativa* L. subsp. *japonica*

Miss Krissana Boonpa



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การโคลน การแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านต่างชนิดและฤทธิ์
ต้านจุลชีพของไทโออินินและสแนคินจากข้าว *Oryza
sativa* L. subsp. *japonica*

โดย

นางสาวกฤษณา บุญภา

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภอรรจ ศิริกันทรมาศ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ทิศนาขจร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภอรรจ ศิริกันทรมาศ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งศิริจี้)

กฤษฎณา บุญญา : การโคลน การแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านต่างชนิดและฤทธิ์ต้าน
 จุลชีพของไทโอนินและสแนคินจากข้าว *Oryza sativa* L. subsp. *japonica* (CLONING,
 HETEROLOGOUS EXPRESSION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THIONIN AND
 SNAKIN FROM RICE *Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) อ.ที่ปริภษาวิทยานิพนธ์หลัก:
 ผศ. ดร.ศุภอรจรจ ศิริกันทรมาศ, หน้า.

ผู้วิจัยคัดเลือกรีนไทโอนิน (THION15, Os06g0517700) และสแนคิน (GASR3, Os03g0760800) ซึ่งเป็นเปปไทด์ต้านจุลชีพจากข้าว (*Oryza sativa* L.) โดยการวิเคราะห์การแสดงออกกร่วมของยีนและระดับการแสดงออกของยีน ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ THION15 และ GASR3 ทำโดยโคลนยีน THION15 และ GASR3 เข้าสู่เวกเตอร์ pGEX-6p-3 เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน Glutathione (GST)-THION15 และ GST-GASR3 ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-THION15 และ GST-GASR3 คือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นตัด GST ออกด้วยเอนไซม์ PreScission protease ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 และ GASR3 ที่บริสุทธิ์ 0.84 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.65 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่บริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคในพืช ได้แก่ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum* และ *Helminthosporium oryzae* จากการทดสอบในหลอดทดลองพบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของรีคอมบิแนนท์ THION15 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยรา *F. oxysporum* และ *H. oryzae* คือ 0.58 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่รีคอมบิแนนท์ GASR3 ยับยั้งได้ที่ 1.04 ไมโครโมลาร์ และยังพบว่า รีคอมบิแนนท์ THION15 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 8.77 และ 1.09 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ฤทธิ์ทางชีวภาพนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคในข้าวได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีน THION15 และ GASR3 ที่พบในข้าวสายพันธุ์ไทย (*Oryza sativa* L. 'KDML 105') มีรูปแบบเหมือนกับที่พบในข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่น (*O. sativa* L. 'koshihikari')

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5472254723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: ANTIMICROBIAL PEPTIDE (AMP) / RICE (ORYZA SATIVA L.) / THION15 / GASR3
 KRISSANA BOONPA: CLONING, HETEROLOGOUS EXPRESSION AND
 ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THIONIN AND SNAKIN FROM RICE *Oryza sativa* L.
 subsp. *japonica*. ADVISOR: ASST. PROF. SUPAART SIRIKANTARAMAS, Ph.D., pp.

The antimicrobial peptides (AMP), thionin (THION) 15 (Os06g0517700) and snakin (GASR) 3 (Os03g0760800), from rice (*Oryza sativa* L.) were chosen based on the gene co-expression network and *in silico* gene expression level analyses. To investigate their antimicrobial activities, *THION15* and *GASR3* were cloned into pGEX-6P-3 expression vector to produce GST-THION15 and GST-GASR3 fusion protein in *Escherichia coli* strain Rosetta-gami (DE3). The optimal condition for the production of GST-THION15 and GST-GASR3 recombinant fusion protein were at 37⁰C for 24 hours with 0.1 mM IPTG induction. GST proteins were cleaved away from the fusion proteins with PreScission protease, yielding the purified recombinant THION15 and GASR3 at 0.84 mg/L and 0.65 mg/L, respectively. The purified recombinant proteins were then tested for the inhibitory activities against plant pathogenic bacteria and fungi such as *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum* and *Helminthosporium oryzae*. *In vitro* assays revealed that the minimum concentration of recombinant THION15 used in this study that inhibit the hyphal growths of *F. oxysporum* and *H. oryzae* were at 0.58 μ M, while that of recombinant GASR3 were at 1.04 μ M. The recombinant THION15 was able to inhibit the growths of bacteria *X. oryzae* pv. *oryzae* and *E. carotovora* with MIC values of 8.77 and 1.09 μ M, respectively. These activities suggest a possible application of these recombinant proteins for rice disease control. In addition, it was found that the nucleotide sequences and gene expression patterns of *THION15* and *GASR3* in Thai rice (*Oryza sativa* L. 'KDML 105') are the same as that of Japanese rice (*O. sativa* L. 'koshihikari').

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2014

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่ง จากหลาย ๆ ท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภอรจร ศิริกันทรมาศ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ แนวทาง และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย รวมทั้งสละแรงและผลักดันให้ผู้วิจัยเสมอ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคพืช ตลอดจนให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อัญชลี ทัศนากจร ประธานกรรมการการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า และ รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รังษิรุจิ กรรมการการสอบ วิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบ แก้ไข ให้คำแนะนำ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ และให้คำปรึกษาเป็นอย่างดี รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือเป็นอย่างดีในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณทุนจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Special Task Force for Activating Research: Biochemical and Molecular Mechanisms of Rice in Changing Environments และทุน 90 ปี สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์กรมหาชน) (สวก.) ที่สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ นางสาวสุภาลักษณ์ แทนทอง นิสิตระดับดุษฎีบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ในการดำเนินงานโครงการตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา และขอขอบคุณ เพื่อน ๆ พี่น้องในห้องปฏิบัติการ 708 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ แลกเปลี่ยนความรู้ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจในการดำเนินโครงการตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ของผู้วิจัยที่มอบความรัก ความห่วงใย และให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน จนวิทยานิพนธ์นี้ผ่านพ้นอุปสรรคต่าง ๆ และสำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ.....	1
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 AMP.....	3
1.2.1 คุณสมบัติทั่วไปของ AMP.....	3
1.2.2 กลไกการทำงานของ AMP.....	6
1.2.3 ไทโอนิน (thionin).....	9
1.2.4 สแนคิน (snakin).....	11
1.3 AMP ในข้าว.....	12
1.4 การทำนายหน้าที่ยีนโดยอาศัยการวิเคราะห์การแสดงออกพร้อมของยีน (co-expression analysis).....	13
บทที่ 2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง.....	14
2.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	14
2.1.1 ยาปฏิชีวนะ.....	14
2.1.2 สารเคมี.....	14
2.1.3 เอนไซม์.....	15
2.1.4 เครื่องมือ.....	15
2.1.5 เครื่องแก้วและพลาสติก.....	16

2.1.6 ชุดสำเร็จรูป (kit).....	16
2.1.7 จุลชีพ.....	16
2.1.8 พีช.....	16
2.1.9 พลาสติด	17
2.1.10 ซอฟต์แวร์และฐานข้อมูล	17
2.2 วิธีการทดลอง.....	18
2.2.1 คัดเลือกยีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	18
2.2.2 การสร้างพลาสติดลูกผสมที่มียีน <i>GASR3</i> และ <i>THION15</i> จากข้าว.....	18
2.2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์.....	18
2.2.2.2 การโคลนยีน.....	18
2.2.3 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน <i>GASR3</i> และ <i>THION15</i> ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์.....	19
2.2.3.1 การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์	19
2.2.3.2 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>GASR3</i> และ <i>THION15</i>	20
2.2.3.3 การย้อมสีแถบโปรตีน.....	21
2.2.4 ศึกษาฤทธิ์ชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>GASR3</i> และ <i>THION15</i>	22
2.2.4.1 การต้านเชื้อแบคทีเรีย	22
2.2.4.2 การต้านเชื้อรา.....	22
2.2.5 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน <i>GASR3</i> และ <i>THION15</i> ในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105.....	23
2.2.5.1 การปลูกข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105	23
2.2.5.2 การสกัด total RNA และการสังเคราะห์ cDNA.....	24
2.2.5.3 การวัดความเข้มข้น DNA หรือ RNA.....	24

2.2.5.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR ..	24
2.2.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>THION15</i> และ <i>GASR3</i> ในข้าวสายพันธุ์ไทย	
KDML105	25
2.2.6.1 การโคลนยีน.....	25
2.2.6.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์	26
บทที่ 3 ผลการทดลอง.....	27
3.1 <i>THION15</i>	27
3.1.1 <i>THION15</i> จากข้าว.....	27
3.1.2 การทำนายตำแหน่งภายในเซลล์และ signal peptide	34
3.1.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>THION15</i> ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ Rosetta	
gami (DE3)	34
3.1.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>THION15</i>	38
3.1.4.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	38
3.1.4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา.....	38
3.2 <i>GASR3</i>	40
3.2.1 <i>GASR3</i> จากข้าว	40
3.2.2 การทำนายตำแหน่งภายในเซลล์และ signal peptide	44
3.2.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>GASR3</i> ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ Rosetta	
gami (DE3)	44
3.2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน <i>GASR3</i>	48
3.2.4.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย	48
3.2.4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา.....	48
3.3. <i>THION15</i> และ <i>GASR3</i> ในข้าว <i>O. sativa</i> L. subsp. <i>indica</i> สายพันธุ์ไทย KDML105.....	50

3.3.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในข้าว <i>O. sativa</i> L. subsp. <i>indica</i> สายพันธุ์ ไทย KDML105.....	50
3.3.2 การแสดงออกของยีน <i>GASR3</i> และ <i>THION15</i> ในข้าว <i>O. sativa</i> L. subsp. <i>indica</i> สายพันธุ์ไทย KDML105.....	51
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง	53
4.1 การคัดเลือกยีน	53
4.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน	54
4.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน <i>THION15</i> และ <i>GASR3</i>	55
4.3.1 ไทโอนิน.....	55
4.3.1.1 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย.....	55
4.3.1.2 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา.....	56
4.3.2 สแนคิน.....	57
4.3.2.1 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย.....	57
4.3.2.2 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา.....	57
4.4 การแสดงออกของยีน <i>THION15</i> และ <i>GASR3</i> ในข้าวสายพันธุ์ ไทย KDML105 และ	58
ลำดับนิวคลีโอไทด์	58
4.5 ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ <i>THION15</i> และ <i>GASR3</i>	59
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	61
รายการอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก.....	70
ภาคผนวก ก.....	71
ภาคผนวก ข.....	72
ภาคผนวก ค.....	80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	81



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	องค์ประกอบในแผ่นเจล SDS.....	21
ตารางที่ 2	ไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน	26
ตารางที่ 3	ยีน AMP ในกลุ่มไทโอนินจากข้าวสายพันธุ์ <i>Oryza sativa</i> L. subsp. <i>japonica</i>	28
ตารางที่ 4	การแสดงออกร่วมของยีน <i>THION</i> กับโปรตีนที่มีผลต่อเชื้อจุลชีพ	31
ตารางที่ 5	ตำแหน่งภายในเซลล์ของโปรตีนที่มีฤทธิ์ชีวภาพแสดงออกและ signal peptide จาก ด้านปลาย N.....	34
ตารางที่ 6	ยีน AMP ในกลุ่มสแนคินจากข้าวสายพันธุ์ <i>Oryza sativa</i> L. subsp. <i>japonica</i>	41
ตารางที่ 7	การแสดงออกร่วมของยีน <i>GASR</i> กับโปรตีนที่มีผลต่อเชื้อจุลชีพ	42



สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1	โรคต่าง ๆ ที่พบ ในข้าว.....	2
รูปที่ 2	การจัดจำแนก AMP ที่พบในพืช.....	5
รูปที่ 3	การทำงานของ AMP รูปแบบบาร์เรล-สเตฟ.....	6
รูปที่ 4	การทำงานของ AMP รูปแบบคาร์เป็ด.....	7
รูปที่ 5	การทำงานของ AMP รูปแบบโทรอยดัล.....	8
รูปที่ 6	โครงสร้างของไทโอนิน	10
รูปที่ 7	แผนที่ความร้อน (heat map) ของการแสดงออกของยีน THION ต่าง ๆ ในภาวะปกติ ที่บริเวณต่าง ๆ ของต้นข้าว.....	32
รูปที่ 8	แผนที่ความร้อนของการแสดงออกของยีน THION ต่าง ๆ ในภาวะเครียดทางชีวภาพ	33
รูปที่ 9	ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ GST_THION15	35
รูปที่ 10	การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-THION15 โดย SDS-PAGE..	36
รูปที่ 11	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน THION15 โดย SDS-PAGE.....	37
รูปที่ 12	การยับยั้งเชื้อราของรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	39
รูปที่ 13	แผนที่ความร้อนของการแสดงออกของยีน GASR ต่าง ๆ ในภาวะปกติ ที่บริเวณต่าง ๆ ของต้นข้าว	43
รูปที่ 14	แผนที่ความร้อนของการแสดงออกของยีน GASR ต่าง ๆ ในภาวะเครียดทางชีวภาพ.....	43
รูปที่ 15	ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ GST- GASR3.....	45
รูปที่ 16	การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-GASR3 โดย SDS-PAGE	46
รูปที่ 17	การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน GASR3 โดย SDS-PAGE	47
รูปที่ 18	การยับยั้งเชื้อราของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	49
รูปที่ 19	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน THION15 จากข้าว <i>O. sativa</i> L. subsp. <i>indica</i> สายพันธุ์ KDML105 กับข้าว <i>O. sativa</i> L. subsp. <i>japonica</i>	50

รูปที่ 20 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน <i>GASR3</i> จากข้าว <i>O. sativa</i> L. subsp. <i>indica</i> สายพันธุ์ไทย KDML105 กับข้าว <i>O. sativa</i> L. subsp. <i>japonica</i>	51
รูปที่ 21 ระดับการแสดงออกของยีน <i>THION15</i> และ <i>GASR3</i> ในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 ในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ.....	52



บทที่ 1

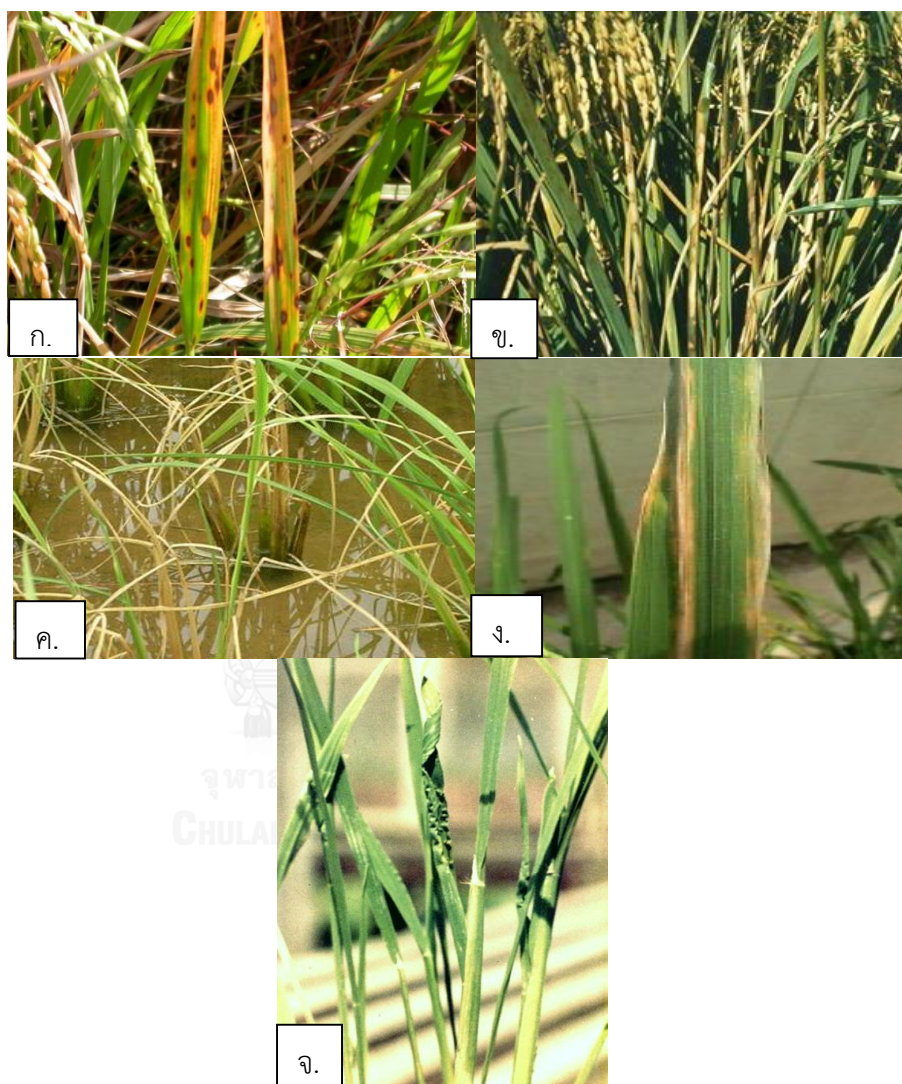
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากที่สุดอันดับหนึ่งของโลก โดยเฉพาะในแถบภูมิภาคเอเชียที่นิยมบริโภคเป็นอาหารหลักและส่งออกมากกว่าภูมิภาคอื่นของโลก โดยประเทศที่มีบทบาทมากในการส่งออกข้าว คือ ไทย อินเดีย เวียดนาม จีนและพม่า ข้าว นับเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ที่นอกจากจะเกี่ยวข้องกับวิถีชีวิตของคนไทยแล้ว ยังสร้างรายได้มหาศาลเข้าสู่ประเทศอีกด้วย อย่างไรก็ตามหนึ่งในปัญหาหลักที่ส่งผลต่อปริมาณผลผลิตข้าว ได้แก่ โรคต่าง ๆ ทั้งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและเชื้อไวรัส ซึ่งได้แก่ โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot disease) เกิดจากเชื้อรา *Helminthosporium oryzae* โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โรคตายพราย (fusarium wilt) เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โรคไหม้ (rice blast) เกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* โรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* และโรคใบหงิก (rice ragged stunt disease) เกิดจากเชื้อไวรัส *rice ragged stunt virus* (RRSV) เป็นต้น (รูปที่ 1) (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2549) จากการประเมินผลกระทบของโรคต่าง ๆ ในข้าวต่อพื้นที่เพาะปลูกพบว่า แม้มีเพียงร้อยละ 10-15 ของพื้นที่เพาะปลูกข้าว แต่ก็ส่งผลต่อปริมาณข้าวที่ลดลงอย่างมหาศาล ซึ่งคิดเป็นมูลค่าความเสียหายกว่าหลายพันล้านบาท ประกอบกับในปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกข้าวลดลงเป็นอย่างมาก ในขณะที่อัตราการเพิ่มของประชากรโลกมีมากขึ้น อาจทำให้เกิดปัญหาการขาดแคลนในอนาคตได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันการลดลงของผลผลิต เกษตรกรจึงนิยมนำสารเคมีมาใช้เพื่อกำจัดศัตรูพืชและป้องกันโรคที่เกิดขึ้นกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งสารเคมีเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภคอีกด้วย ดังนั้นการแก้ปัญหาการสูญเสียผลผลิตของข้าวไปกับโรคต่าง ๆ เหล่านี้ จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าว เพื่อให้พอเพียงต่อความต้องการบริโภคของประชากรโลก และการมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองต่อโรคข้าวที่เกิดจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในระดับโมเลกุลเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งต่อการออกแบบวิธีการควบคุมโรคข้าว ทำให้มีงานวิจัยหลากหลายที่เกี่ยวข้องการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานโรคจากจุลินทรีย์ดังกล่าว

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ศึกษาโปรตีนที่เรียกว่า เปปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide; AMP) ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค โดยสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด โดยในบทแรกนี้ กล่าวถึงความสำคัญและกลไกการทำงานของ AMP รวมทั้ง AMP

ในกลุ่มไทโออินนินและสแนคิน งานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับ AMP ในพืช รวมทั้งการวิเคราะห์การแสดงออก
ร่วมของยีนที่นำมาใช้ในการระบุยีนไทโออินนินและสแนคินที่เกี่ยวข้องกับการต้านโรค



รูปที่ 1 โรคต่าง ๆ ที่พบ ในข้าว ก. โรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot disease) เกิดจากเชื้อรา *H. oryzae* ข. โรคกาบใบแห้ง (sheath blight) เกิดจากเชื้อรา *R. solani* ค. โรคเหี่ยวเกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* ง. โรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* จ. โรคใบหงิก (rice ragged stunt disease) เกิดจากเชื้อไวรัส *rice ragged stunt virus* (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, 2549)

1.2 AMP

พืชได้พัฒนาระบบต่าง ๆ เพื่อป้องกันเชื้อโรคและศัตรูพืช เช่น กระบวนการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด นอกจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตัวเองแล้ว การผลิต AMP ก็เป็นอีกกลไกหนึ่งที่พืชใช้ในการป้องกันเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัส

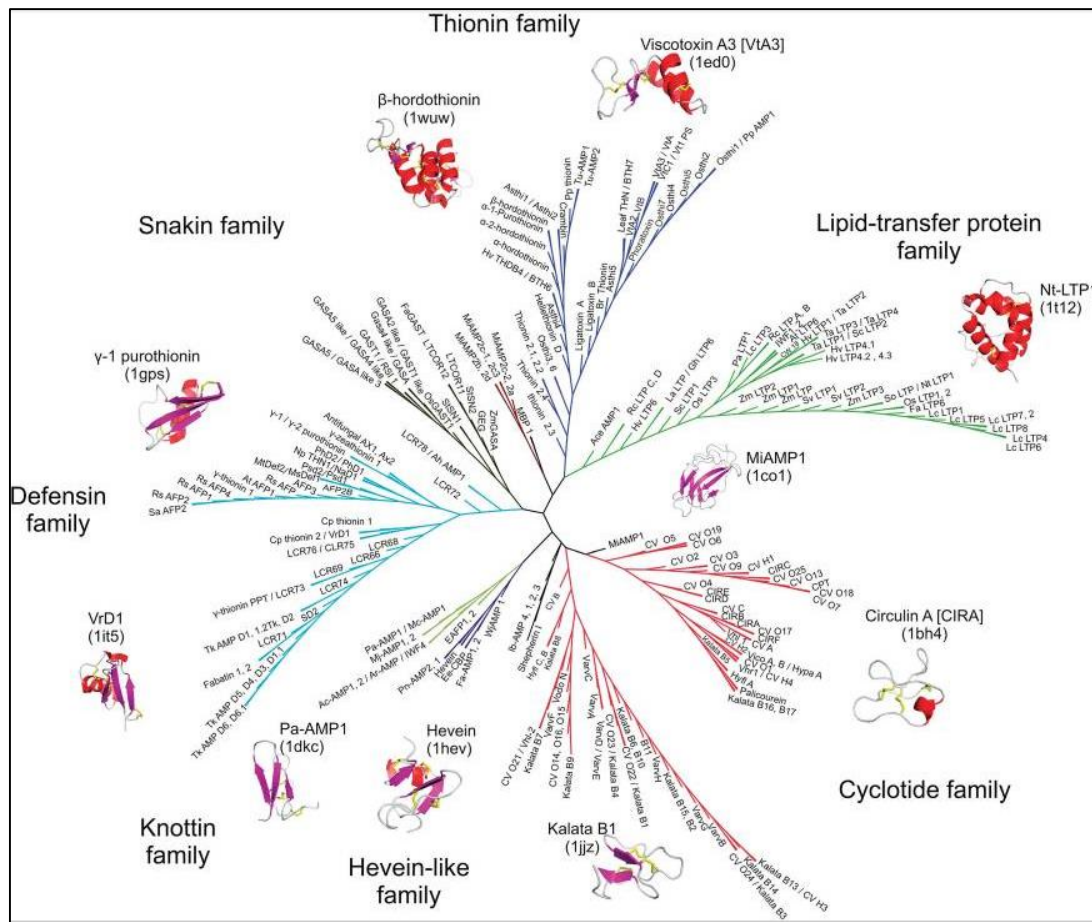
1.2.1 คุณสมบัติทั่วไปของ AMP

AMP เป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดเล็กที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนน้อยกว่า 100 ตัว ส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุบวก และมีกรดอะมิโนซิสเทอีนจำนวนมาก ซึ่งจำเป็นต่อการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่ช่วยสร้างความเสถียรให้แก่โปรตีนขนาดเล็กกลุ่มนี้ (Broekaert et al. 1997; Powers and Hancock 2003) AMP มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันพื้นฐานแบบไม่จำเพาะเจาะจง ทำหน้าที่ในการป้องกันหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในสิ่งมีชีวิตพบได้ทั้งในโปรแคริโอตและยูแคริโอต รวมทั้งพืชและสัตว์ด้วย (Brown and Hancock 2006) จากการศึกษาจนถึงปัจจุบันพบว่า มีการค้นพบ AMP อย่างน้อย 880 ชนิดจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (Hammami et al. 2009) โดย AMP ที่พบในพืชสามารถแบ่งได้ 7 กลุ่มย่อยตามโครงสร้างปฐมภูมิและจำนวนพันธะไดซัลไฟด์ ได้แก่ ไทโอนิน (thionin) ดีเฟนซิน (defensin) สแนคิน/จิบเบอเรลลิกแอซิดสแตติมูลเตเท็ด (snakin/gibberellic acid stimulated (GAS)) ลิพิดทรานสเฟอร์โปรตีน (lipid transfer-protein) เฮเวอีน-ไลค์โปรตีน (hevein-like protein) นีออตทิน (knottin) และ ไซโคลไทด์ (cyclotide) (Broekaert et al. 1997; Hammami et al. 2009) (รูปที่ 2) โดยโครงสร้างของเปปไทด์แต่ละกลุ่มส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน

AMP ในพืชมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเชื้อโรคจำพวกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา Hammami และคณะ (2009b) ศึกษาพบว่า AMP ในเมล็ด *Oudneya africana* มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และยีสต์ *Candida albicans* นอกจากนี้ยังมีรายงานด้วยว่า AMP มีส่วนช่วยป้องกันพืชจากเชื้อไวรัสและแมลงศัตรูพืชอีกด้วย (Castro and Fontes 2005; Padovan et al. 2010) เนื่องจากฤทธิ์ของ AMP ที่หลากหลายนี้ นักวิทยาศาสตร์จึงได้สร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมต้านโรคเพื่อให้สามารถสร้าง AMP จากพืชปกติที่เดิมไม่สามารถสร้างได้หรือมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการต้านโรค เช่น เมตchnikowin (metchnikowin) เป็นเปปไทด์ต้านเชื้อราจากแมลงหวี่ ถูกทำให้สร้างในต้นบาร์เลย์และสามารถกระตุ้นให้ต้นบาร์เลย์ต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคราแป้ง (powdery mildew) ได้ (Rahnamaeian and Vilcinskis 2012) เช่นเดียวกันกับการทำ

ให้เกิดการสร้าง AMP เซโครปิน เอ (cecropin A) จากผีเสื้อไหมยักษ์ (*Hyalophora cecropia*, giant silk moth) ในข้าว ทำให้ข้าวสามารถต้านทานโรคจากเชื้อราก่อโรคไหม้ (*M. grisea*) ได้ นอกจากนี้ Zottich และคณะ (2011) แสดงให้เห็นฤทธิ์ของ AMP ในกลุ่มลิพิดทรานสเฟอร์โปรตีน จากเมล็ดกาแฟ (*Coffea canephora*) ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสของคน จึงอาจมีประโยชน์ในการนำมาใช้ควบคุมน้ำหนักร่างกาย หรือใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า นอกเหนือจากสารออกฤทธิ์ในพืชแล้ว AMP ก็สามารถถูกนำมาพัฒนาเป็นเปปไทด์ออกฤทธิ์สำหรับใช้ทางการแพทย์ได้ จากรายงานทั้งหมดข้างต้นนี้ ชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของ AMP โดยเฉพาะ AMP ในข้าวที่มีการศึกษาน้อยมาก ซึ่ง AMP นี้ น่าจะสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้





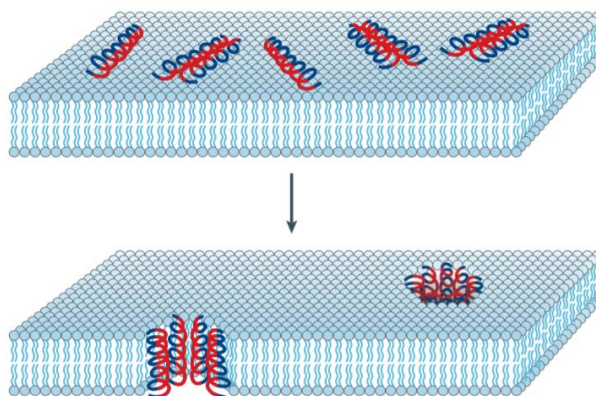
รูปที่ 2 การจัดจำแนก AMP ที่พบในพืช (Hammami et al. 2009)

1.2.2 กลไกการทำงานของ AMP

AMP ซึ่งมีประจุบวกจะถูกดึงดูดเข้ามาใกล้กับผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีประจุลบ กล่าวคือแบคทีเรียแกรมบวกจะมีกรดเทโคอิก (teichoic acid) และแบคทีเรียแกรมลบมีกลุ่มฟอสเฟตของลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) และฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เมื่อ AMP เคลื่อนผ่านผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียมาใกล้กับเยื่อหุ้มเซลล์ AMP จะยึดติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากมีโครงสร้างที่มีลักษณะแอมฟิพาทิก (amphipathic) คือมีทั้งด้านที่ชอบน้ำและด้านที่ไม่ชอบน้ำ โดยด้านที่ไม่ชอบน้ำจะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นฟอสโฟลิปิดสองชั้น (phospholipids bilayer) หลังจากนั้น AMP จะแทรกตัวผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ กลไกในการแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มีผู้เสนอไว้หลายรูปแบบ ซึ่งอาจจะเป็นแบบใดแบบหนึ่ง ดังต่อไปนี้

1. โมเดลบาร์เรล-สเตฟ (barrel-stave model)

AMP จะทำให้เกิดช่องว่าง ด้วยการแทรกตัวเข้าชั้นในของเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะขนานกับชั้นฟอสโฟลิปิดสองชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเรียงตัวด้านที่ไม่ชอบน้ำของ AMP อยู่ชิดกับส่วนเดียวกันนี้ของฟอสโฟลิปิดสองชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ และด้านที่ชอบน้ำของ AMP จะเรียงตัวแนบอยู่ในช่องว่างตรงกลาง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีโมเลกุลของน้ำ ไอออน และสารโมเลกุลเล็กต่าง ๆ ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์เกิดเป็นช่องและสารสำคัญต่าง ๆ ในเซลล์เคลื่อนออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ เมื่อส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เชื้อจุลินทรีย์จะตายในที่สุด (รูปที่ 3)

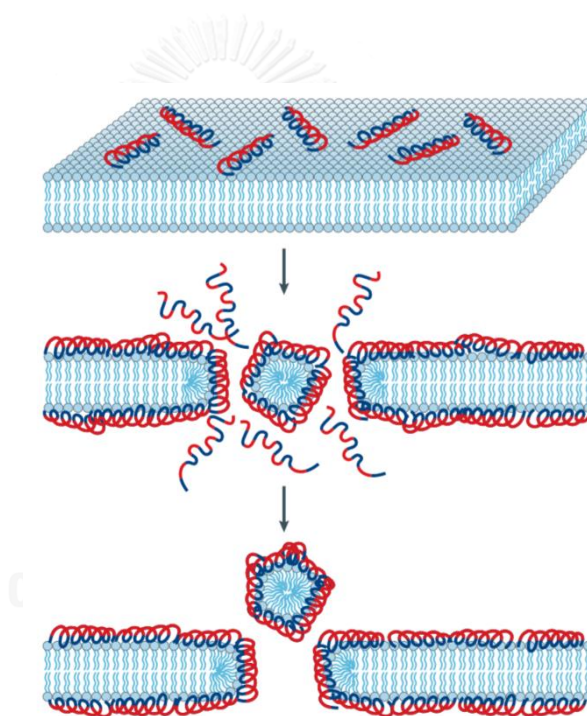


รูปที่ 3 การทำงานของ AMP รูปแบบบาร์เรล-สเตฟ (Brogden 2005)

หมายเหตุ: สีแดง คือ ด้านที่ชอบน้ำของ AMP และสีน้ำเงิน คือ ด้านที่ไม่ชอบน้ำของ AMP

2. โมเดลคาร์เปต (carpet model)

AMP ปกคลุมเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะขนานกับเยื่อหุ้มเซลล์ คล้ายกับการปูพรม โดยเรียงตัวด้านที่ไม่ชอบน้ำของ AMP ให้ชิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ และด้านที่ชอบน้ำของ AMP หันออกสู่ของเหลวที่อยู่ภายนอกเซลล์ จนกระทั่งมีความเข้มข้นของ AMP สูงพอ เยื่อหุ้มเซลล์จะยุบตัว เกิดเป็นช่องในเยื่อหุ้มเซลล์ขึ้นชั่วคราว AMP จึงสามารถแทรกตัวเข้ามาจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของชั้นฟอสโฟลิปิดสองชั้นภายในเซลล์ เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนทำให้เกิดช่องและขาดความต่อเนื่อง ส่วนประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญภายในเซลล์จะออกมาจากเซลล์ ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เชื้อจุลินทรีย์จะตายในที่สุด (รูปที่ 4)

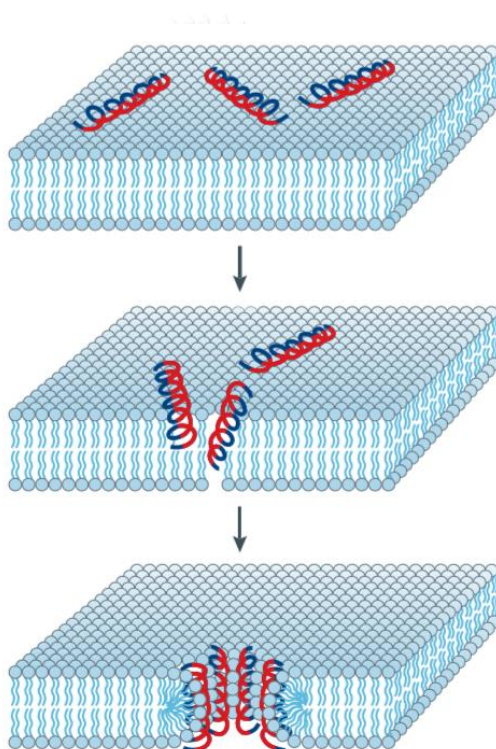


รูปที่ 4 การทำงานของ AMP รูปแบบคาร์เปต (Brogden 2005)

หมายเหตุ: สีแดง คือ ด้านที่ชอบน้ำของ AMP และสีน้ำเงิน คือ ด้านที่ไม่ชอบน้ำของ AMP

3. โมเดลโทรอยดัล (toroidal model)

AMP ที่ปกคลุมเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรวมตัวกัน และเหนี่ยวนำให้ฟอสโฟลิปิดสองชั้นที่เป็นไขมัน (lipid head group) มีการงอตัวเข้าหากัน จึงเกิดเป็นช่องว่างจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ ผนังของช่องว่างนี้จะถูกบุด้วย AMP ที่แทรกตัวเข้ามาและบางส่วนของฟอสโฟลิปิดสองชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนทำให้เกิดช่องและขาดความต่อเนื่อง ส่วนประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญภายในเซลล์จะออกมานอกเซลล์ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ เชื้อจุลินทรีย์จะตายในที่สุด (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 การทำงานของ AMP รูปแบบโทรอยดัล (Brogden 2005)

หมายเหตุ: สีแดง คือ ด้านที่ชอบน้ำของ AMP และสีน้ำเงิน คือ ด้านที่ไม่ชอบน้ำของ AMP

1.2.3 ไทโอนิน (thionin)

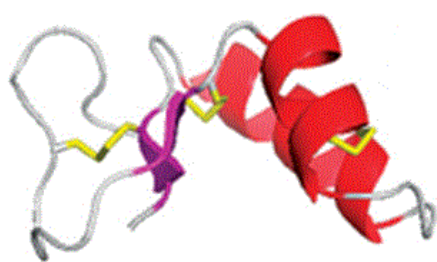
ไทโอนินเป็นกลุ่มของ AMP ที่พบมากที่สุดในพื้นที่ใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Broekaert et al. 1997; Stec 2006) มีรายงานว่า AMP ตัวแรกที่สกัดได้จากพืชและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (Balls et al. 1942) อีกทั้งไทโอนินยังจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรค (pathogenesis-related (PR) protein) เนื่องจากความเป็นพิษต่อเชื้อก่อโรคในพืชด้วย (Epple et al. 1995) ไทโอนินประกอบด้วยซิสเทอีนจำนวน 6 หรือ 8 หน่วย จึงสามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้ 3 และ 4 พันธะ ตามลำดับ (รูปที่ 6) มีการค้นพบไทโอนินในพืชหลายชนิดดังนี้

1. ชนิดที่ 1 พุโรไทโอนิน (purothionin) มีซิสเทอีนที่สามารถสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ 4 ตำแหน่ง พบครั้งแรกในเอนโดสเปิร์มของข้าวสาลี (De Caley et al. 1972)
2. ชนิดที่ 2 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 46-47 หน่วยและมีพันธะไดซัลไฟด์ 4 ตำแหน่งพบครั้งแรกในใบของบาร์เล่ย์ (Rodriguez-Palenzuela et al. 1988)
3. ชนิดที่ 3 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 45-46 หน่วย พบในพืชตระกูลกาฝาก (Samuelsson and Pettersson 1970)
4. ชนิดที่ 4 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 46 หน่วยและมีพันธะไดซัลไฟด์ 3 ตำแหน่ง พบได้ในเมล็ดของพืชผลิตน้ำมัน *Crambe abyssinica*

นอกจากการศึกษาโครงสร้างไทโอนินแล้ว ยังมีรายงานว่าไทโอนินมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา แบคทีเรีย ยีสต์ และตัวอ่อนของแมลง (De Caley et al. 1972; Kramer et al. 1979) Oard และคณะ (2004) พบว่า พุโรไทโอนินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *R. solani* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อให้เกิดโรคใบแห้งในพืชที่สร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก และนอกจากนี้ยังมีการค้นพบ วิสโคทอกซิน เอ 3 และ บี (viscotoxin A3 and B) ซึ่งเป็นไทโอนินชนิดที่ 3 ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของสปอร์และเส้นใยของเชื้อราก่อโรคในพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Phytophthora infestans* (Giudici et al. 2004) มากกว่านั้นยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในคนอีกด้วยเช่น Taveira และคณะ (2014) ค้นพบ thionin-like peptide จากพริก (*Capsicum annum*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ก่อโรคในคน ได้แก่ *Candida albicans* และ *C. tropicalis* เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการสร้างพืชที่มียีน

ไทโอนินจากพืชชนิดอื่นเพื่อเพิ่มความสามารถในการต้านทานโรคพืชต่าง ๆ เช่น การสร้าง แอลฟา-ไทโอนินที่ได้จากบาร์เลย์ ในต้นยาสูบและสามารถกระตุ้นให้ต้นยาสูบต้านทานต่อ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* ได้ (Carmona et al. 1993) รวมถึงการสร้าง ฮอร์ดโดไทโอนิน (hordothionin, *Hth1*) ที่ได้จากบาร์เลย์ในข้าวโอ๊ต เพื่อกระตุ้นให้ข้าวโอ๊ต สามารถต้านเชื้อรา *Fusarium graminearum* ได้ (Carlson et al. 2006) จากประโยชน์ อันน่าสนใจและมากมายที่กล่าวมานี้ จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษายีนในกลุ่มไทโอนินในข้าว

ก.



ข.



รูปที่ 6 โครงสร้างของไทโอนิน ก. และ ข. จำนวนพันธะไดซัลไฟด์ 3 และ 4 พันธะ ตามลำดับ

จุฬาร (Hammami et al. 2009)

หมายเหตุ: สีเหลืองแสดงพันธะไดซัลไฟด์

1.2.4 สแนคิน (snakin)

สแนคิน หรือ GAS เป็นกลุ่มของ AMP ที่ค้นพบครั้งแรกในมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) มีความสามารถในการต้านจุลชีพแบบไม่จำเพาะทั้งต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Segura et al. 1999; Berrocal-Lobo et al. 2002) รวมถึงศัตรูพืชอีกด้วย (Mao et al. 2011) GAS 2 ชนิดซึ่งได้แก่ เอสเอ็น 1 (SN1) และเอสเอ็น 2 (SN2) ถูกค้นพบในหัวมันฝรั่ง โดยทั้งสองกลุ่มมีกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกันร้อยละ 38 ประกอบด้วยซิสเทอีนจำนวนเท่ากันคือ 12 หน่วย (Berrocal-Lobo et al. 2002; Harris et al. 2014) นอกจากนี้ยีนกลุ่มนี้มีสมาชิกบางตัวสามารถถูกควบคุมการแสดงออกด้วยกรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid (GA)) ได้ (Segura et al. 1999) จากคุณสมบัติที่มีจำนวนซิสเทอีนมากถึง 12 หน่วย ทำให้สามารถเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ได้ 6 พันธะ ซึ่งมีความสำคัญต่อการเพิ่มความเสถียรของโครงสร้างภายใต้ภาวะเครียดต่าง ๆ (Pelegriani et al. 2011) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาในระดับยีน รวมถึงหน้าที่และคุณสมบัติต่าง ๆ ของ GAS ในพืชชนิดอื่น ๆ เพิ่มมากขึ้น

มีการค้นพบยีน *GIP* ในดอกพิทูเนีย (*Petunia hybrid*) (Ben-Nissan and Weiss 1996) ยีน *GEG* ในดอกเยอบีร่า (*Gerbera hybrid*) (Kotilainen et al. 1999) ยีน *FaGAST* ในผลสตรอเบอร์รี่ (*Fragaria x ananassa*) (Jose et al. 2006) ซึ่งแปลรหัสเป็นเปปไทด์มีจำนวนกรดอะมิโนซิสเทอีน 12 หน่วยเท่ากับที่พบในมันฝรั่ง และยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา อีกทั้งมีรายงานว่ามีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการเพิ่มการแสดงออกของยีน *SN1* ในมันฝรั่ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา *R. solani* (Almasia et al. 2008) นอกจากนี้การตัดต่อยีน *SN1* ที่ได้จากมันฝรั่งให้เกิดการแสดงออกในข้าวสาลี พบว่าสามารถกระตุ้นให้ข้าวสาลีต้านทานต่อราแป้ง (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจ (Faccio et al. 2011) อีกทั้งยังมีการตัดต่อยีน *SN2* ในมะเขือเทศให้มีการแสดงออกเกินปกติ เพื่อให้ทนต่อเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ที่เป็นสาเหตุของโรคแคงเกอร์และโรคเหี่ยว (Balaji et al. 2011) จากประโยชน์อันน่าสนใจและมากมายนี้จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษา ยีนในกลุ่มสแนคินในข้าว

1.3 AMP ในข้าว

จากการค้นหายีนในจีโนมข้าว ที่แปลรหัสเป็นเปปไทด์ที่มีซิสเทอีนเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก (cysteine-rich peptide) ซึ่งรวม AMP ด้วย พบว่ามีจำนวนประมาณ 600 ยีน (Silverstein et al. 2007) ดังนั้นข้าวจึงเป็นแหล่งของ AMP ที่อาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณค่าต่อการศึกษาเป็นอย่างมาก แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า AMP ในข้าวยังไม่ได้รับการศึกษาเท่าที่ควร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระดบังการแสดงออกมีปริมาณต่ำหรือมีการแสดงออกแบบจำเพาะต่อระยะการเจริญเติบโตและส่วนประกอบของต้นข้าว ดังนั้นการศึกษาส่วนใหญ่จึงมักนำ AMP จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นมาสร้างให้เกิดแสดงออกเกินปกติในข้าว เพื่อให้ข้าวสามารถต้านทานโรคต่าง ๆ ได้

มีรายงานว่า การแสดงออกที่เกินปกติของเซโครปิน บี (cecropin B) ซึ่งเป็น AMP จากหนอนไหม (*Bombyx mori*) ในข้าว ทำให้ข้าวสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคขอบใบแห้งได้ (Prasad et al. 2008) รวมถึงการสร้างเอ็นพี 3 (Np3) และเอ็นพี 5 (Np5) ซึ่งเป็น AMP จากกุ้ง (*Fenneropenaeus chinensis*) ในข้าว พบว่าสามารถกระตุ้นให้ข้าวต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคขอบใบแห้งได้เช่นกัน (Wei et al. 2011) นอกจากนี้การสร้างแทนานิน (thananin) ซึ่งเป็น AMP จากแมลงมวนง่าม (*Podisus maculiventris*) ในข้าว ทำให้ข้าวสามารถต้านเชื้อรา *M. oryzae* ที่ก่อโรคไหม้ได้ (Imamura et al. 2010) และยังพบว่า AMP จากต้นบานเย็น (*Mirabilis jalapa* L.) มีประสิทธิภาพในการป้องกันพืชผลทางเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ยาสูบ ข้าวโพด ข้าวและมันฝรั่ง จากเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในพืช เช่น ไวรัสก่อโรคใบด่างของยาสูบ (tobacco mosaic virus) ไวรัสก่อโรคใบจุด (spotted leaf virus) และไวรัสก่อโรครากเน่า (root rot virus) (Sharma and Ortiz 2000)

จากการศึกษาพบว่า พันธุ์ข้าวตามธรรมชาตินั้นมียีนที่สามารถผลิต AMP อยู่เป็นจำนวนมาก แต่หน้าที่และฤทธิ์ของ AMP ในข้าวยังไม่ได้รับการศึกษามากนัก จึงไม่ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ (Silverstein et al. 2007) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษา AMP จากข้าว เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านทานเชื้อก่อโรคในข้าวได้ โดยศึกษายีน *GASR3* เป็นสมาชิกในกลุ่มสแนคินและ *THION15* เป็นสมาชิกในกลุ่มไทโอนิน

1.4 การทำนายหน้าที่ยีนโดยอาศัยการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมของยีน (co-expression analysis)

การศึกษาหน้าที่ของยีนเป็นอีกหัวข้อที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากปัจจุบันการหาลำดับจีโนมสามารถทำได้สะดวกรวดเร็วขึ้น และข้อมูลทรานสคริปโทม (transcriptome) ก็มีมากขึ้นตามลำดับ แต่ทว่าการระบุหน้าที่ของยีนไม่สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว แม้ว่าการทำนายหน้าที่ของยีนโดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโครงสร้างโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น (comparative genomics) จะสามารถทำได้ แต่ก็ไม่สามารถบ่งบอกหน้าที่ได้อย่างแม่นยำ เมื่อไม่นานนี้ การใช้การวิเคราะห์แสดงออกร่วมของยีน พบว่าสามารถช่วยหาหน้าที่ของยีนได้ โดยยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกันมักจะมีการแสดงออกในรูปแบบเดียวกันในภาวะต่าง ๆ เทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการระบุหน้าที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และสารอื่น ๆ อีกมากมายในต้นอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis thaliana*) (Yonekura-Sakakibara et al. 2008) (Horan et al. 2008) ทั้งนี้ฐานข้อมูลการแสดงออกร่วมของยีนข้าวได้ถูกรวบรวมจากฐานข้อมูลไมโครอะเรย์ RiceArrayNet (Lee et al. 2009) และ GENEVESTIGATOR (Hruz et al. 2008) ตัวอย่างของการใช้เทคนิคการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมในข้าว ได้แก่ การค้นพบ ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ที่ควบคุมกลไกการสร้างแป้งในข้าว (Fu and Xue 2010) การระบุหน้าที่ยีนของข้าวในระยะต้นกล้า (seedling) ที่แสดงออกภายใต้ภาวะเครียดจากความร้อน (Sarkar et al. 2014)

ในวิทยานิพนธ์นี้ได้ใช้การวิเคราะห์การแสดงออกร่วมของยีน มารระบุไทโอโนนินและสแนคิน ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพที่ก่อโรคในข้าว โดยมีสมมติฐานว่า ยีนใด ๆ ที่มีการแสดงออกสูงและแสดงออกร่วมกับยีนต้านเชื้อจุลชีพ จะถูกคาดเดาเบื้องต้นหรือใช้เป็นข้อมูลว่า น่าจะเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของพืชต่อการติดเชื้อ ดังนั้นจากข้อมูลนี้ ยีน AMP ที่มีการแสดงออกร่วมกับยีนที่พบดังกล่าว ก็มีความน่าจะเป็นสูงในการทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเชื้อ

บทที่ 2

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

2.1.1 ยาปฏิชีวนะ

Ampicillin (Sigma Chemical Co., USA)

Tetracyclin (Bio Basic Inc., USA)

Kanamycin (Bio Basic Inc., USA)

Chloramphenicol (Bio Basic Inc., USA)

2.1.2 สารเคมี

Absolute ethanol (Carlo Erba Reagenti, Italy)

Acrylamide (ACROS, Belgium)

Agar powder (Himedia[®], India)

Agarose (Bioline, UK)

Ammonium persulfate: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Sigma Chemical Co., USA)

Beta-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., USA)

bis-Acrylamide (Sigma Chemical Co., USA)

Bromophenol blue (Carlo Erba Reagenti, Italy)

Calcium chloride (Carlo Erba Reagenti, Italy)

Coomassie brilliant blue R-250 (Bio Basic Inc., USA)

dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Fermentas Inc., USA)

di-Sodium hydrogen orthophosphate anhydrous: Na_2HPO_4 (Carlo Erba Reagenti, Italy)

Dithiothreitol: DTT (Bio Basic Inc., USA)

Gelred nucleic acid gel stain (Biotium, USA)

Glacial acetic acid (Merck, Germany)

Glycerol (Ajax Finechem Pty Ltd, New Zealand)

Glycine (Amresco, USA)

Hydrochloric acid (Merck, Germany)

Iso-1-thio- β -D-thio galactopyranoside: IPTG (Bio Basic Inc., USA)

L-Glutathione reduced (Sigma-Aldrich, USA)

Magnesium chloride (Carlo Erba Reagenti, Italy)

Methanol (Merck, Germany)

Peptone (Merck, Germany)

Sodium chloride (Ajax Finechem Pty Ltd, New Zealand)

Sodium dodecyl sulfate (Bio Basic Inc., USA)

TEMED: $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (Invitrogen, USA)

Yeast extract (Merck, Germany)

2.1.3 เอนไซม์

DNase I (New England Biolabs, UK)

Phusion[®] High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, USA)

Restriction endonucleases: *Bam*HI และ *Sal*I (New England Biolabs, USA)

RNase-Free DNase set (Qiagen, Germany)

Taq DNA polymerase (New England Biolabs, UK)

2.1.4 เครื่องมือ

Autoclave: Labo Autoclave MLS-3020 (Sanyo Electric Co., Ltd., Japan)

Balance: PB303-L (Mettler Toledo, USA)

Gel documentation apparatus: Gel Doc[™] (Syngene, England)

Gel electrophoresis apparatus: Mupid[®]-exU (Advance Co., LTD, Japan)

Incubator: Memmert (Wisconsin Oven Distributors, LLC., USA)

Incubator shaker: Innova[™] 4000 (New Brunswick Scientific, UK)

Incubator shaker: Kuhner shaker (Kuhner, Switzerland)

Laminar flow: Bio Clean Bench (SANYO, Japan)

Magnetic stirrer: Fisherbrand (Fisher Scientific, USA)

Magnetic stirrer and heater: C-MAG HS7 (IKA[®], Germany)

Microwave oven: R-362 (SHARP, Thailand)

Mixer mill: MM400 (Retsch[®], Germany)

pH meter: FEP20 – FiveEasy Plus[™] pH (Mettler Toledo, USA)

PCR: T100[™] Thermal Cycle (Bio-Rad, USA)

Power supply: PowerPac™ Basic (Bio-Rad, USA)

Refrigerated centrifuge: Legend XTR (Thermo Scientific, USA)

Refrigerated centrifuge: Universal 320R (Hettich, Switzerland)

SDS-gel electrophoresis apparatus: AE-6530 (ATTO, Japan)

Spectrophotometer: DU® 530 (Beckman Coulter™, USA)

2.1.5 เครื่องแก้วและพลาสติก

1.5-ml microcentrifuge tube (Axygen Hayward, USA)

0.2 ml PCR thin wall microcentrifuge tube (Axygen Hayward, USA)

10-, 100-, 1000- μ l pipette tips (Axygen Hayward, USA)

45 cm diameter polyethylene pots

Glass bottles

Nipro disposable syringe (Nissho, Japan)

2.1.6 ชุดสำเร็จรูป (kit)

ชุดคอลัมน์ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (Glutathione Sepharose™ 4B column, GE Healthcare)

ชุดสกัด RNA (RNeasy® Plant Mini kit, Qiagen, Germany)

ชุดสังเคราะห์ cDNA (iScript™ cDNA Synthesis Kit, BIO-RAD)

ชุดสกัดพลาสมิด (Presto™ Mini Plasmid Kit, Geneaid)

ชุดวัดความเข้มข้นโปรตีน (Bio-Rad protein assay, BIO-RAD)

2.1.7 จุลชีพ

Escherichai coli

-สายพันธุ์ DH5 α

-สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3)

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*

Erwinia carotovora

Fusarium oxysporum

Helminthosporium oryzae

2.1.8 พืช

ข้าว (*Oryza sativa* L. subsp. *indica*) สายพันธุ์ KDML105

2.1.9 พลาสมิด

pBluescript SK-: พลาสมิดที่มียีน *THION15*, *GASR3* (Rice Genome Resource Center (RGRC), Japan)

Expression vector: pGEX-6P-3 (GE Healthcare Life Sciences, UK)

Cloning vector: pJet 1.2/blunt

2.1.10 ซอฟต์แวร์และฐานข้อมูล

ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

ExPaSy Bioinformatics Resource Portal (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)

eP Browser (<http://bar.utoronto.ca>)

GENVESTIGATOR (<https://geneinvestigator.com/gv/>)

Gramene (<http://www.gramene.org>)

iPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/>)

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Phytozome (<http://www.phytozome.net/>)

Plantarraynet (<http://arraynet.mju.ac.kr>)

WOLF PSORT (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 คัดเลือกยีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2.1.1 หาอินทั้งหมดที่เป็นสมาชิกของโปรตีนกลุ่มสแนคินและไทโอนินในข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. subsp. *japonica* โดยใช้ฐานข้อมูล Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) และ Gramene (Ware และคณะ, 2002; <http://www.gramene.org>)

2.2.1.2 หาอินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกร่วม (co-expression) ของอินที่หาได้จาก ข้อ 2.2.1.2 กับโปรตีนต้านโรค (resistance protein) เช่น โปรตีนเกี่ยวกับการก่อโรค (pathogen related protein) หรือเอนไซม์กำจัดจุลชีพ (enzyme eliminating microbes) โดยใช้ฐานข้อมูล Plantarraynet (<http://arraynet.mju.ac.kr>)

2.2.1.3 พิจารณาระดับการแสดงออกของอิน (expression level) ที่ได้จากข้อ 2.2.1.3 โดยใช้ฐานข้อมูล Rice eFP browser (<http://bar.utoronto.ca>) และ GENVESTIGATOR (<https://genevestigator.com/gv/>) เลือกอินที่มีการแสดงออกสูงโดยเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มโปรตีน

2.2.2 การสร้างพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *GASR3* และ *THION15* จากข้าว

2.2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์

2.2.2.1.1 ทำนายตำแหน่งภายในเซลล์ของโปรตีน *GASR3* และ *THION15* ด้วยโปรแกรม WOLF PSORT (<http://wolfpsort.org>) และทำนายส่วนของ signal peptide ด้วยโปรแกรม SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk>)

2.2.2.1.2 ออกแบบไพรเมอร์หลังจากตัด signal peptide ออก โดยเพิ่มบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sal*I ใน forward และ reverse primer ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

2.2.2.2 การโคลนยีน

2.2.2.2.1 เพิ่มจำนวนยีน *GASR3* และ *THION15* โดยใช้พลาสมิด pBluescript SK- ที่มีอินทั้งสองเป็นแม่แบบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 initial denaturation ที่ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 2 denaturation 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ขั้นที่ 3 annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 4 extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45

วินาที โดยขั้นที่ 2-4 ทำทั้งหมด 30 รอบ และ ขั้นที่ 5 final-extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.2.2.2.2 จากนั้นเชื่อมชิ้นยีน *GASR3* และ *THION15* ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ข้างต้นเข้าเวกเตอร์ pGEX-6p-3 ซึ่งมี GST-tag ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Sa*II เช่นกัน ในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 1:3 เติมเอนไซม์ 1X T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร และ 10X T4 buffer 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ DI บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (15-17 ชั่วโมง) จากนั้นทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) ด้วยวิธี heat shock

2.2.2.2.3 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คลอแอมเฟนิคอล 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กานาไมซิน 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเตตระไซคลิน 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยทำโคลนนิ่งพีซีอาร์จากนั้นสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัด Presto™ Mini Plasmid kit และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์

2.2.3 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน *GASR3* และ *THION15* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

2.2.3.1 การวิเคราะห์หาเวลาที่เหมาะสมในการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนและการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *GST-GASR3* หรือ *GST-THION15* ในอาหารเหลว LB 100 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ 4 ชนิด ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น เขย่า 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายโอนหัวเชื้อปริมาตรที่เหมาะสมลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ 4 ชนิดดังที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยใช้อัตราส่วนหัวเชื้อ 2% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงโดยเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเซลล์เจริญถึง log phase โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จากนั้นเติม isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ให้เป็นความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน

โดยทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของ รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-GASR3 และ GST-THION15 โดยการเก็บเซลล์ชั่วโมงที่ 0, 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ตามลำดับ เก็บตะกอนเซลล์โดยการปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย PBS buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมไลโซโซมให้ถึงความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ให้เป็นความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ autopipette ดูดขึ้นลง นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นความถี่สูง (sonicator) ที่สภาวะ pulser on 5 วินาที และ pulser off 15 วินาที ใช้เวลาทั้งหมด 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไปทำบริสุทธิ์โดยใช้ Glutathione Sepharose™ 4B column (GE Healthcare) หลังจากนั้นตัด GST tag โดยใช้ PreScission protease ตรวจสอบความบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน ด้วย SDS-PAGE

2.2.3.2 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 และ THION15

รีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 และ THION15 ถูกแยกขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE ที่มี SDS และ acrylamide เป็นองค์ประกอบในแผ่นเจล ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ 15% separating gel และ 5% stacking gel (ตารางที่ 1)

สำหรับการเตรียมตัวอย่างโปรตีน เริ่มจากละลายเซลล์รีคอมบิแนนท์โปรตีนใน 5X sample buffer (ประกอบด้วย Tris-HCl 60 มิลลิโมลาร์, pH 6.8, 79% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue และ β -mercaptoethanol 14.4 มิลลิโมลาร์) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำ electrophoresis โดยเปิดกระแสไฟคงที่ ที่ 20 mA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

2.2.3.3 การย้อมสีแถบโปรตีน

นำแผ่นเจล SDS ย้อมในภาชนะที่มี staining solution โดยใช้เวลาในการย้อมแผ่นเจล 20 นาที จากนั้นล้างสีในแผ่นเจลด้วย destaining solution เป็นเวลาข้ามคืนหรือจนสามารถเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ตารางที่ 1 องค์ประกอบในแผ่นเจล SDS

Composition	5% Stacking gel (ml)	15% Separating gel (ml)
30% acrylamide-0.8% bisacrylamide stock	0.67	3.76
0.5 M tris-HCl, pH 6.8	0.63	-
1.5 M tris-HCl, pH 8.8	-	2.5
10% ammonium persulphate	0.05	0.1
TEMED	0.005	0.01
DI water	3.65	3.63
Total volume	5	10

2.2.4 ศักยภาพชีวิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 และ THION15

2.2.4.1 การต้านเชื้อแบคทีเรีย

2.2.4.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* โดยเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อมาเจือจางในอาหาร tryptic soy broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, India) โดยปรับให้มีความขุ่นเมื่อวัด OD ที่ 600 นาโนเมตร เป็น 0.08 – 0.13 (McFarland standard 0.5) ซึ่งจะมีจำนวนแบคทีเรียโดยประมาณเท่ากับ 1×10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนแบคทีเรียเป็น 5×10^5 CFU/ml

2.2.4.1.2 การเตรียมโปรตีน THION15 และ GASR3

ละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 และ GASR3 ด้วยน้ำ DI โดยให้ความเข้มข้น 450 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.4.1.3 การทดสอบฤทธิ์

วิเคราะห์จากค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ที่ทดลองด้วยวิธี broth microdilution assay ในหลุม 96-well micro titerplate โดยเริ่มจากการเติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 และ THION15 ความเข้มข้น 450 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุม 96-well microtiter plate จากนั้นเจือจางรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็น two-fold dilution ถึงหลุมสุดท้ายที่ความเข้มข้น 0.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) ตรวจสอบค่า MIC ที่วิเคราะห์จากเครื่อง microplate reader ซึ่งวัดจากหลุมที่มีความเข้มข้นของโปรตีนต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ได้เติมรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 และ THION15 เป็น negative control และเชื้อที่มีการเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เป็น positive control ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.2.4.2 การต้านเชื้อรา

2.2.4.2.1 การเตรียมเชื้อรา

นำเชื้อรา *F. oxysporum* และ *H. oryzae* เลี้ยงในอาหารแข็ง (potato dextrose agar: PDA) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

2.2.4.2.2 การเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีน

ละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 และ GASR3 ด้วยน้ำ DI ให้มีความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 450 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.4.2.3 การทดสอบฤทธิ์

ในการทดสอบเชื้อราใช้วิธี hyphae point technique (Bains and Bisht 1995) โดยเจาะรูที่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วย cork borer จากนั้นวางบนกึ่งกลางของจานอาหารแข็ง PDA ที่มีการผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.58, 1.16 และ 1.75 ไมโครโมลาร์ และรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.04, 2.08, 3.12 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดผลการเจริญของราจากเส้นผ่านศูนย์กลางของการเจริญของเส้นใยเปรียบเทียบกับจานควบคุม (control) ที่ไม่ผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 และ THION15

2.2.5 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *GASR3* และ *THION15* ในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105

2.2.5.1 การปลูกข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105

ทำความสะอาดเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยล้างใน 70% เอทานอลเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างในน้ำยา 35% clorox เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วยน้ำ DI จนไม่มีฟอง แล้วนำไปแช่ในน้ำ DI เป็นเวลา 4-7 วัน ในที่มืด โดยเปลี่ยนน้ำ DI ทุก ๆ วัน จนกระทั่งเมล็ดข้าวงอกเรียกระยะนี้ว่า germinating seed เก็บตัวอย่างบางส่วนโดยตัดเฉพาะส่วนปลายยอดที่งอกออกมาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บใน -80 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายตัวอย่างลงปลูกในสารละลายอาหาร 0.5X Yoshida ในตู้บ่มเพาะพันธุ์พืช (Growth Chamber) ที่มีสภาวะแสงสว่าง 16 ชั่วโมง แสงมืด 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 6000 ลักส์ และความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก ๆ วัน เลี้ยงจนกระทั่ง

ข้าวมีอายุครบ 2 สัปดาห์ เรียกระยะนี้ว่า seedling เก็บตัวอย่างบางส่วนโดยตัดส่วนใบและรากแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวแล้วเก็บใน -80 องศาเซลเซียส จากนั้นเลี้ยงข้าวส่วนที่เหลือต่อประมาณ 30 วัน เพื่อให้ข้าวเจริญเติบโตสู่ระยะ mature แล้วเก็บตัวอย่างบางส่วนโดยตัดส่วนใบและรากแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บใน -80 องศาเซลเซียส จากนั้นย้ายข้าวปลูกลงดินด้านนอกที่มีการควบคุมแสงสว่าง 8 ชั่วโมง และแสงมืด 16 ชั่วโมง จนกระทั่งข้าวออกดอก (flowering) เก็บตัวอย่างโดยตัดเฉพาะช่อดอกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเก็บใน -80 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างทั้งหมด 4 ระยะไปสกัด total RNA

2.2.5.2 การสกัด total RNA และการสังเคราะห์ cDNA

บดตัวอย่างพืชที่ถูกแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ให้ได้ปริมาณ 100 มิลลิกรัม เพื่อสกัด total RNA โดยใช้ชุดสำเร็จ RNeasy® Plant Mini kit จากนั้น กำจัด genomic DNA ด้วย RNase-Free DNase เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และทำการสังเคราะห์ cDNA เส้นแรก ด้วย iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) โดยใช้ RNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม เป็นแม่แบบ

2.2.5.3 การวัดความเข้มข้น DNA หรือ RNA

วัดความเข้มข้นของ DNA หรือ RNA โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 260 nm (A_{260}) และคำนวณหาความเข้มข้น (mg/ml) โดยใช้สมการ:

$$[\text{DNA}] \text{ หรือ } [\text{RNA}] \text{ (mg/ml)} = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 50 \text{ (DNA) or } 40 \text{ (RNA)}$$

2.2.5.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

เพิ่มปริมาณยีน 3 ยีน คือ ยีน *Ef1α* ใช้เป็นยีนควบคุม ยีน *THION15* และยีน *GASR3* เป็นยีนที่ต้องการศึกษาการแสดงออก โดยใช้ cDNA ของข้าวสายพันธุ์ KDML105 ทั้ง 4 ระยะ เป็นแม่แบบและไพรเมอร์จำเพาะ (ตารางที่ 2) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีขั้นตอนดังนี้
 ขั้นที่ 1 initial denaturation ที่ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 ขั้นที่ 2 denaturation 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
 ขั้นที่ 3 annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 ขั้นที่ 4 extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที โดยขั้นที่ 2-4 ทำทั้งหมด 30 รอบ และ
 ขั้นที่ 5 final-extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนด้วยการทำ gel electrophoresis (1% (w/v) agarose gel) โดยเปรียบเทียบผลกับความเข้มข้นแถบยีน *Ef1 α* ที่เป็นยีนควบคุม

2.2.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THION15* และ *GASR3* ในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105

2.2.6.1 การโคลนยีน

2.2.6.1.1 การเพิ่มยีน *GASR3* และ *THION15* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เพิ่มจำนวนยีน *GASR3* และ *THION15* โดยใช้ cDNA จากข้าวสายพันธุ์ KDML105 เป็นแม่แบบและไพรเมอร์จำเพาะ (ตารางที่ 2) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 initial denaturation ที่ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 2 denaturation 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ขั้นที่ 3 annealing 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 4 extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที โดยขั้นที่ 2-4 ทำทั้งหมด 30 รอบ และ ขั้นที่ 5 final-extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.2.6.1.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *THION15* และ *GASR3* เข้ากับเวกเตอร์ pJet cloning vector

เชื่อมต่อชิ้นยีนที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ข้างต้น เข้ากับ pJet cloning vector ในอัตราส่วนโดยโมลเท่ากับ 3:1 เติม 2X reaction buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำ nuclease free ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร และเติม T4 DNA ligase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน คัดเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วย PrestoTM Mini Plasmid kit และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์

2.2.6.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่ง cDNA เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Bio-basic, Canada จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

ตารางที่ 2 โพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน

Gene	Primer	Nucleotides (5'-3')	Length (bp)	Tm
THION15	Forward	AAAGGATCCATGCAAGAGACGATCAA GGTGGG	32	60
	Reverse	AAAGTCGACTTAGGAAACGATAGTGA CAATATCAGCT	37	60
GASR3	Forward	AATGGATCCATGGGATCAGATTTCTG CGACGG	33	60
	Reverse	AAAGTCGACTCATGGGCACTTGGGCC TC	28	60
Ef1 α	Forward	ATGGTTGTGGAGACCTTC	18	60
	Reverse	GAAGGTCTCCACAACCAT	18	60

หมายเหตุ: ขีดเส้นใต้ 1 เส้น คือ บริเวณตัดจำเพาะเอนไซม์ *Bam*HI และขีดเส้นใต้ 2 เส้น คือ บริเวณตัดจำเพาะเอนไซม์ *Sal*II

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 THION15

3.1.1 THION15 จากข้าว

ในการค้นหา ยีนของ AMP ในกลุ่มไทโอนิน (*THION*) จากฐานข้อมูลจีโนมพืช Phytozome (<http://www.phytozome.net>) และ Gramene (<http://www.gramene.org>) พบว่ามียีนในกลุ่มนี้จำนวน 44 ยีน (ตารางที่ 3) เมื่อนำยีนที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกร่วมระหว่าง *THION* ที่พบกับยีนที่ตอบสนองต่อจุลชีพในพืช โดยใช้ฐานข้อมูลไมโครอะเรย์ของพืช (Plantarraynet, GENEVESTIGATOR) พบว่า *THION* ส่วนใหญ่มีการแสดงออกร่วมกับยีนในกลุ่มโปรตีนต้านโรค (disease resistance protein) นอกจากนี้ยังอาจมีการแสดงออกร่วมกับโปรตีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการต้านจุลชีพ เช่น กลูคาเนส (glucanase) โปรตีนยับยั้งอะไมเลส (amylase inhibitor) ไคตินเนส (chitinase) และทาวมาติน-ไลค์โปรตีน (thaumatin-like protein) ซึ่งจากยีน *THION* ทั้งหมด 44 ยีนพบว่ามี 16 ยีน ที่มีข้อมูลในฐานข้อมูล และ 12 ยีน ดังต่อไปนี้ *THION9, THION15, THION18, THION25, THION26, THION27, THION29, THION30, THION32, THION34, THION36* และ *THION39* ที่มีการแสดงออกร่วมกับโปรตีนที่กล่าวมาข้างต้น (ตารางที่ 4) นอกจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเหล่านั้น ยังได้ศึกษาระดับการแสดงของยีนทั้งในภาวะปกติและภาวะที่มีการติดเชื้อ โดยใช้ฐานข้อมูล Rice eFP browser และ GENEVESTIGATOR พบว่าจากยีนไทโอนินทั้งหมด 44 ยีน พบยีนที่มีระดับการแสดงออกสูงในภาวะปกติ 4 ยีน ได้แก่ *THION15* พบที่เมล็ด *THION18* พบที่ช่อดอก *THION27* พบที่ช่อดอก และ *THION36* พบที่รากของระยะ seedling ส่วนในภาวะที่มีการติดเชื้อพบการแสดงออก 4 ยีน ได้แก่ *THION15, THION29, THION30* และ *thionin-like peptide* (LOC_Os07g24830) จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า ยีน *THION15* มีการแสดงออกทั้งในภาวะปกติและภาวะที่มีการติดเชื้อ (รูปที่ 7 และ รูปที่ 8) หลังจากพิจารณา ระดับการแสดงออกร่วมกับการแสดงออกกับยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการต้าน จุลชีพ ผู้วิจัยจึงสนใจเลือกศึกษายีน *THION15* เป็นลำดับแรก

ตารางที่ 3 ยีน AMP ในกลุ่มไทโอนินจากข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. subsp. *japonica*

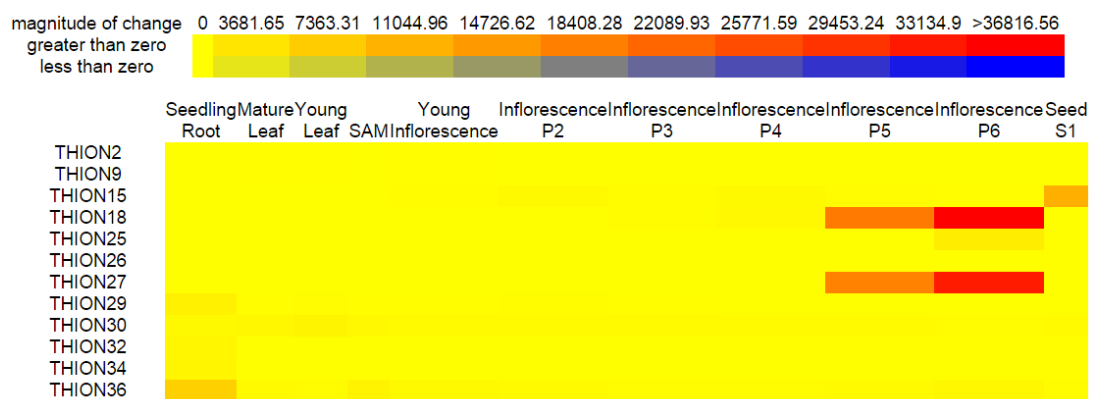
No.	Gene	MSU gene	Probe	BlastP analysis
1	<i>THION1</i>	LOC_Os06g31280	-	-
2	<i>THION3</i>	LOC_Os06g31890	-	-
3	<i>THION5</i>	LOC_Os06g31960	-	-
4	<i>THION6</i>	LOC_Os06g32020	-	-
5	<i>THION7</i>	LOC_Os06g32160	AK062831	Thionin Osthi1
6	<i>THION8</i>	LOC_Os06g32200	-	-
7	<i>THION9</i>	LOC_Os06g32240	AB072337	Phoratoxin
8	<i>THION10</i>	LOC_Os06g32290	-	-
9	<i>THION11</i>	LOC_Os06g32320	-	-
10	<i>THION12</i>	LOC_Os06g32350	-	-
11	<i>THION14</i>	LOC_Os06g32550	-	-
12	<i>THION15</i>	LOC_Os06g32600	Os06g0517700	Thionin Osthi1
13	<i>THION16</i>	LOC_Os06g32370	-	-
14	<i>THION18</i>	LOC_Os01g41140	AK069454	Conserved hypothetical protein
15	<i>THION19</i>	LOC_Os01g41180	-	-
16	<i>THION20</i>	LOC_Os02g02630	-	-
17	<i>THION21</i>	LOC_Os02g02650	-	-
18	<i>THION22</i>	LOC_Os02g03800	-	-
19	<i>THION23</i>	LOC_Os02g04190	-	-
20	<i>THION25</i>	LOC_Os02g03520	AK120793	Conserved hypothetical protein
21	<i>THION26</i>	LOC_Os03g08710	Os03g0185600	Conserved hypothetical protein

No.	Gene	MSU gene	Probe	BlastP analysis
22	<i>THION27</i>	LOC_Os01g41170	AK070921	Conserved hypothetical protein
23	<i>THION28</i>	LOC_Os03g21880	-	-
24	<i>THION29</i>	LOC_Os03g14300	Os03g0247200	Hypothetical protein
25	<i>THION30</i>	LOC_Os03g64300	AK111575	Lissencephaly type-1-like homology motif domain containing protein
26	<i>THION31</i>	LOC_Os11g15250	-	-
27	<i>THION32</i>	LOC_Os09g24350	AK107676	Hypothetical protein
28	<i>THION34</i>	LOC_Os12g26960	AK111239	Conserved hypothetical protein
29	<i>THION35</i>	LOC_Os09g11210	-	-
30	<i>THION36</i>	LOC_Os03g49270	AK107697	Somatomedin B domain containing protein
31	<i>THION37</i>	LOC_Os03g49280	-	-
32	<i>THION38</i>	LOC_Os03g49300	-	-
33	<i>THION39</i>	LOC_Os03g49310	AK119711	Somatomedin B domain containing protein
34	<i>THION44</i>	LOC_Os01g51270	-	-
35	<i>Gamma-thionin</i>	LOC_Os04g11195	-	-

No.	Gene	MSU gene	Probe	BlastP analysis
36	<i>Gamma-thionin</i>	LOC_Os02g07628	-	-
37	<i>Gamma-thionin</i>	LOC_Os02g07624	-	-
38	<i>thionin</i>	LOC_Os06g31930	-	-
39	<i>thionin-like peptide</i>	LOC_Os07g25050	-	-
40	<i>Gamma-thionin</i>	LOC_Os04g11165	-	-
41	<i>thionin-like peptide</i>	LOC_Os07g24820	Os07g0429600	Conserved hypothetical protein
42	<i>thionin-like peptide</i>	LOC_Os07g25060	-	-
43	<i>thionin-like peptide</i>	LOC_Os07g24830	Os07g0429700	Conserved hypothetical protein
44	<i>thionin-like peptide</i>	LOC_Os06g31930	Os06g0513862	thionin precursor protein, putative, expressed

ตารางที่ 4 การแสดงออกร่วมของยีน THION กับโปรตีนที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์

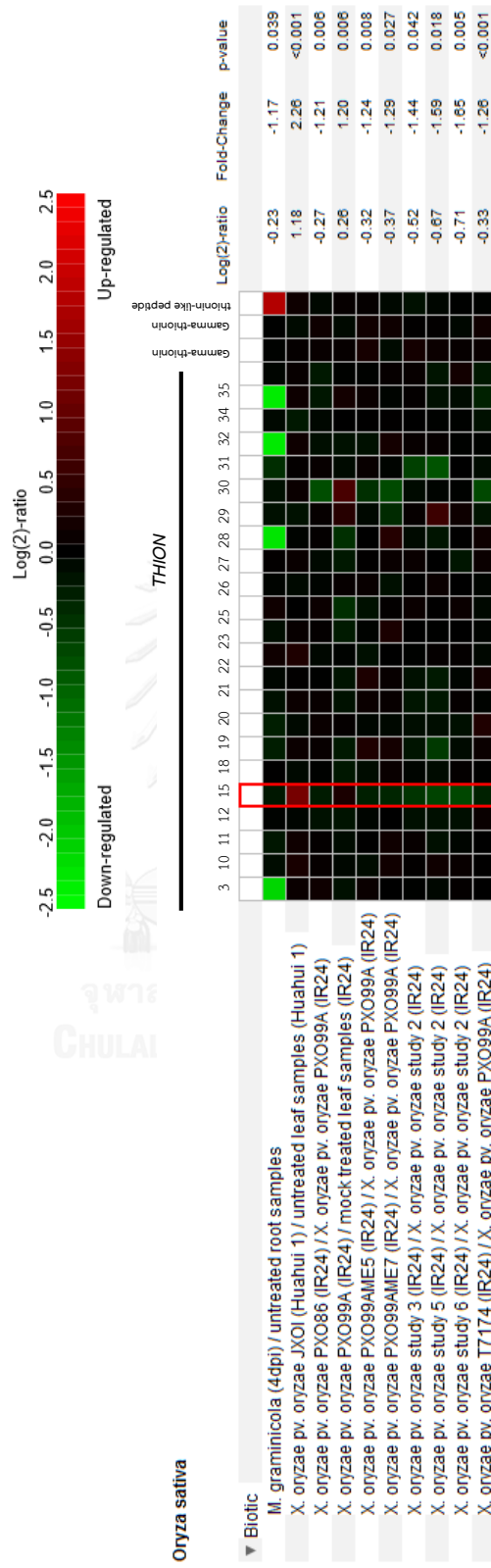
ยีน	ยีน MSU	โปรตีนที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์					
		Plant disease protein	Glucanase	Chitinase	Amylase inhibitor	Thaumatin-like protein	
THION9	LOC_Os06g32240	x	x	✓	✓	x	
THION15	LOC_Os06g32600	✓	x	✓	✓	x	
THION18	LOC_Os01g41140	x	✓	✓	✓	✓	
THION25	LOC_Os02g03520	✓	✓	✓	✓	✓	
THION26	LOC_Os03g08710	✓	x	✓	x	x	
THION27	LOC_Os01g41170	x	✓	✓	✓	x	
THION29	LOC_Os03g14300	✓	✓	✓	✓	x	
THION30	LOC_Os03g64300	✓	x	✓	✓	x	
THION32	LOC_Os09g24350	✓	✓	✓	✓	x	
THION34	LOC_Os12g26960	✓	x	✓	✓	✓	
THION36	LOC_Os03g49270	✓	x	x	x	✓	
THION39	LOC_Os03g49310	✓	x	x	x	✓	



รูปที่ 7 แผนที่ความร้อน (heat map) ของการแสดงออกของยีน THION ต่าง ๆ ในภาวะปกติ ที่บริเวณต่าง ๆ ของต้นข้าว



รูปที่ 8 แผนที่ความร้อนของการแสดงออกของยีน THION ต่าง ๆ ในภาวะเครียดทางชีวภาพ (p-value < 0.05)



3.1.2 การทำนายตำแหน่งภายในเซลล์และ signal peptide

จากการทำนายตำแหน่งภายในเซลล์ของโปรตีน THION15 ด้วยโปรแกรม WOLF PSORT (Horton et al., 2007; <http://wolfpsort.org>) พบว่าโปรตีน THION 15 อยู่ในตำแหน่งภายนอกเซลล์ (extracellular) และทำนายส่วนของ signal peptide พบว่า THION15 มี signal peptide เป็นกรดอะมิโน 19 ตัวแรก จากด้านปลาย N (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ตำแหน่งภายในเซลล์ของโปรตีนที่มีฤทธิ์ชีวภาพแสดงออกและ signal peptide จากด้านปลาย N

AMP gene	Subcellular localization	Signal peptide prediction (amino acid)
<i>THION15</i>	extracellular	19
<i>GASR3</i>	extracellular	27

3.1.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3)

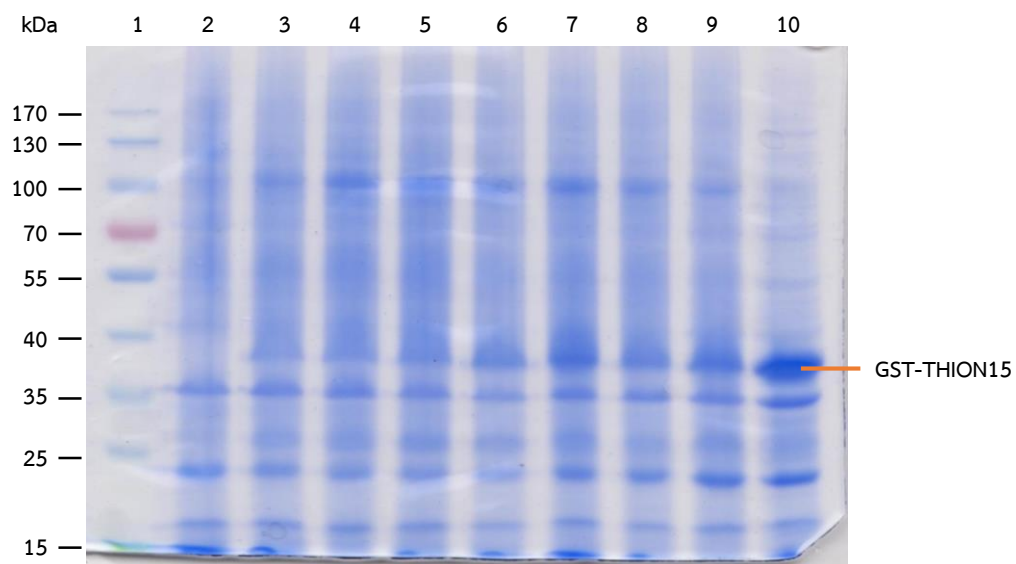
หลังจากเพิ่มจำนวนยีน *THION15* เฉพาะส่วนที่ไม่รวม signal peptide ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และเชื่อมยีน *THION15* กับเวกเตอร์ pGEX-6P-3 ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด *GST-THION15* เมื่อถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) คัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *GST-THION15* ด้วยการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ และตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THION15* ที่ถูกต้องและเชื่อมกับ GST-tag ในทิศทางที่ถูกต้องเช่นกัน โดยยีน *THION15* มีขนาด 354 คู่เบส สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 117 หน่วย (รูปที่ 9)

จากการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด *GST-THION15* เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *GST-THION15* คือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG ให้เป็นความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตโปรตีน *GST-THION15* ที่มีขนาด 39 กิโลดาลตันได้ (รูปที่ 10) เมื่อทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุกลูตาไทโอน เซฟารอส โพรบี (Glutathione sepharose 4B) และใช้เอนไซม์พรีซิชั่นโปรทีเอส (PreScission protease) ในการตัด GST-tag พบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ได้ 0.84 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 11) โดย ธี

คอมบินแนนท์โปรตีน THION15 ที่แยกได้มีขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy ที่คำนวณขนาดโปรตีนได้เท่ากับ 12.83 กิโลดาลตัน

TTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCTCCTCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTG	60
F G G G D H P P K S D L E V L F Q G P L	20
GGATCCATGCAAGAGACGATCAAGGTGGGAGCAAAGAGCTGCTGCCCAACCACCACGGCA	120
G S M Q E T I K V G A K S C C P T T T A	40
AGAAACATCTATAATGCATGCCGTTTTGCGCATGGCACAAGGGAAAGATGTTCTAAACTC	180
R N I Y N A C R F A H G T R E R C S K L	60
TCTGGCTGTAAAATTGTTGATGGGAAATGCAAGCCACCTTACATTACCACACCCTTAC	240
S G C K I V D G K C K P P Y I H H T L H	80
CCTGAGTCTGAGGAATTGGATGTACTTACTTCTGTATGCTGGGATGTACTTCATCCGTG	300
P E S E E L D V L D F C M L G C T S S V	100
TGCAGCAACATAAACACTTTTGCTGGCAACGAAGAAGGAACGGTGCTGTGGAACGTTGC	360
C S N I N T F A G N E E G N G A V E R C	120
AACGAAGCATGCTACCACTTCTGCAACAAGGAAGCTGATATTGTCACTATCGTTTCCTGA	420
N E A C Y H F C N K E A D I V T I V S -	140

รูปที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ GST_THION15 โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ THION15 บริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้น คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์พรีซิสซันโปรทีเอส ลูกศรสีแดง คือ ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์พรีซิสซันโปรทีเอส และตัวหนาสีดำคือ บริเวณส่วนปลาย GST

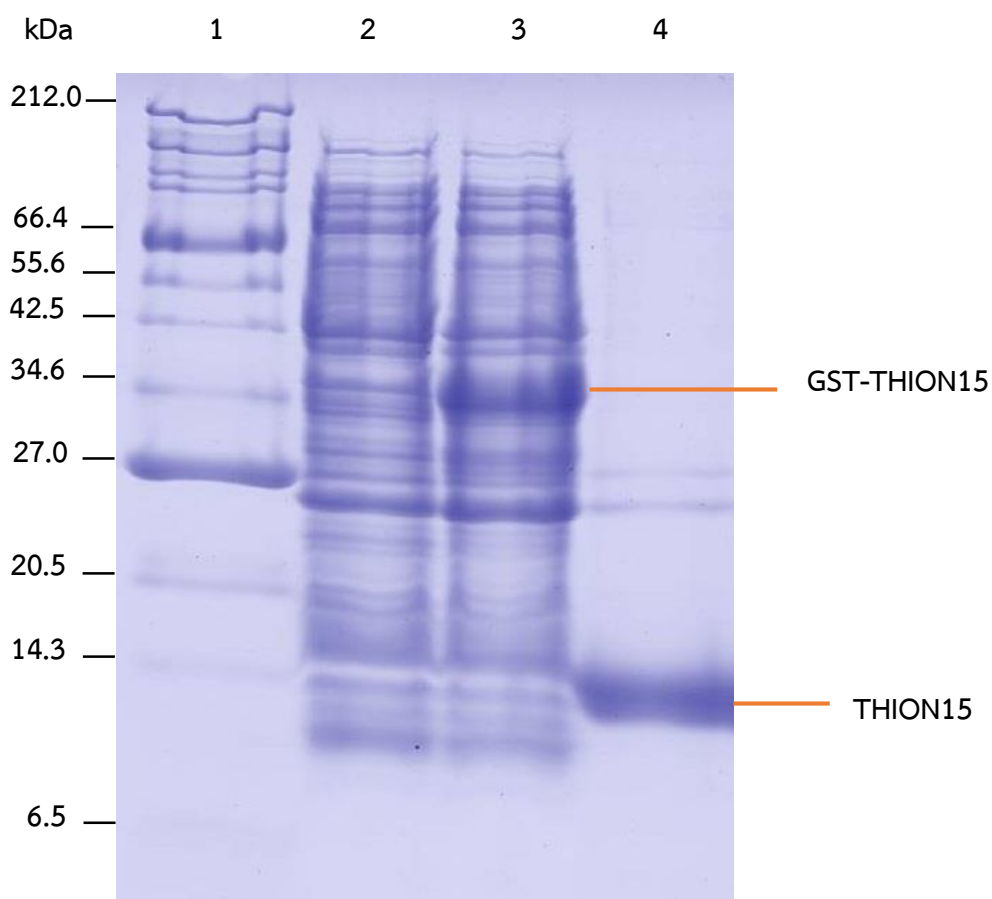


รูปที่ 10 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-THION15 โดย SDS-PAGE

เลนที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน

เลนที่ 2: รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ยังไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG (0 ชั่วโมง)

เลนที่ 3-10: รีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 11 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน THION15 โดย SDS-PAGE หลังจากตัด GST-tag ด้วยเอนไซม์พรีซิซชันโปรทีเอส

เลนที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน

เลนที่ 2: รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-THION15 ที่ยังไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG

เลนที่ 3: รีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เลนที่ 4: รีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ที่บรรจุ กลูตาไทโอน เซฟารอส โพรบี

3.1.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15

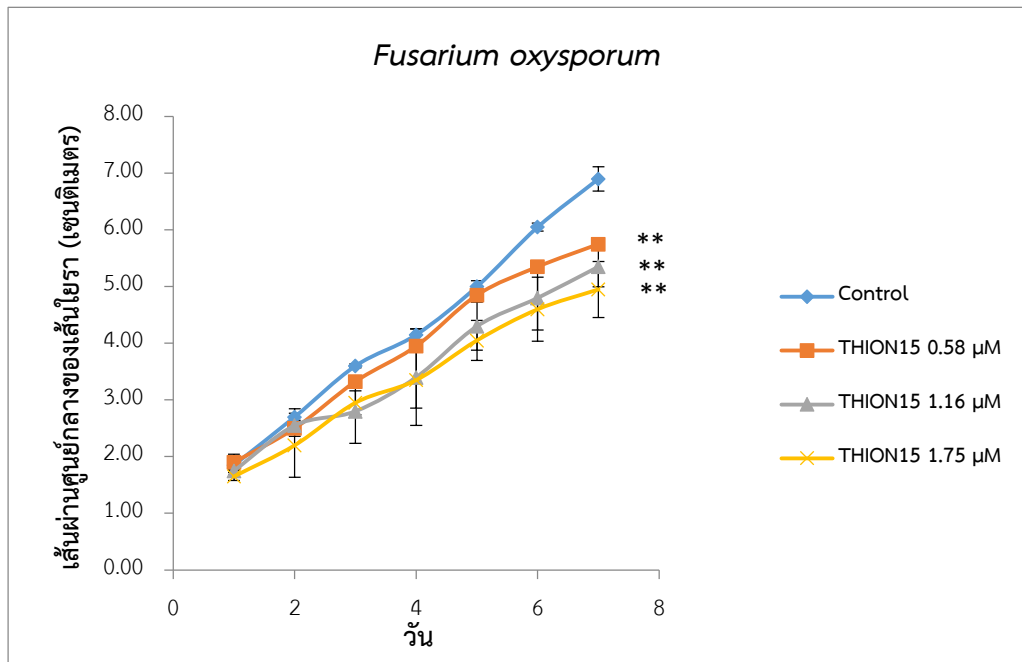
3.1.4.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิเคราะห์จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (MIC) พบว่าโปรตีน THION15 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* กล่าวคือ มีค่า MIC เท่ากับ 8.77 ± 0.003 ไมโครโมลาร์ และ 1.09 ± 0.021 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

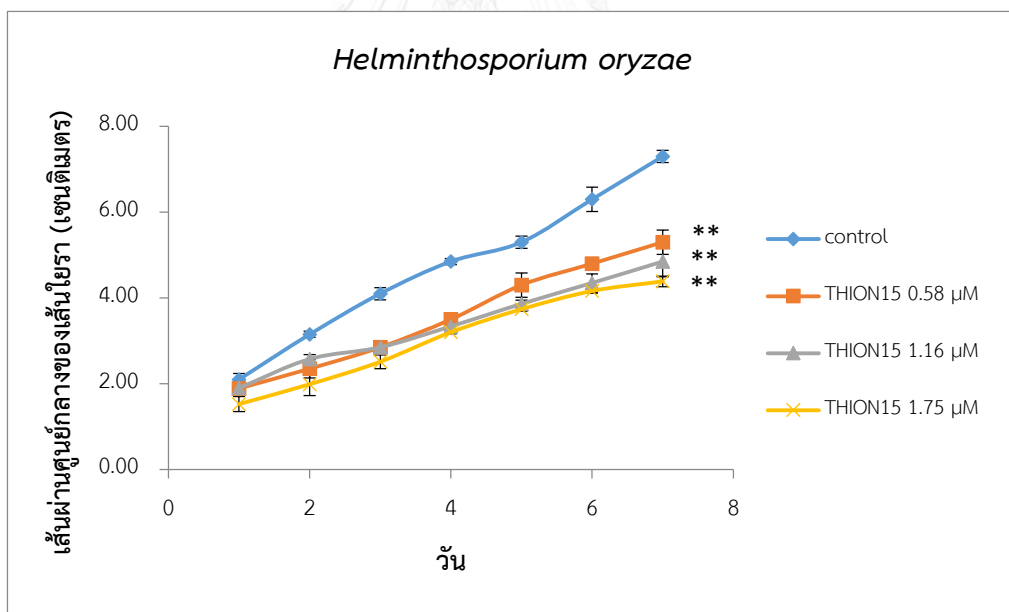
3.1.4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของโปรตีน THION15 โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยของเชื้อรา 2 สายพันธุ์คือ *F. oxysporum* และ *H. oryzae* บนจานอาหารแข็งพีดีเอ (potato-dextrose-agar (PDA)) ที่มีการผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.58, 1.16 และ 22.5 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ไม่ผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จานอาหารที่มีการผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ทั้ง 3 ความเข้มข้นนั้น มีการเจริญของเส้นใยร่าต่ำกว่าจานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (รูปที่ 12) จากการศึกษาฤทธิ์ของ THION15 ในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จะเห็นได้ว่า THION15 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อโดยขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent) คือ ยิ่งมีความเข้มข้นของ THION15 สูง ยิ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดี

ก.



ข.



รูปที่ 12 การยับยั้งเชื้อราของรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ก. การทดสอบกับ *F. oxysporum* ข. การทดสอบกับ *H. oryzae*

หมายเหตุ: **แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

3.2 GASR3

3.2.1 GASR3 จากข้าว

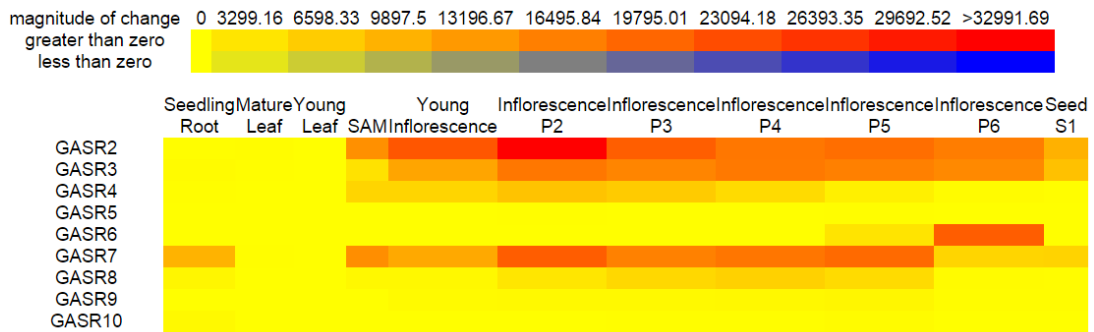
ในการค้นหา ยีนของ AMP ในกลุ่มสแนคิน (GASR) จากฐานข้อมูลจีโนมพืช Phytozome (<http://www.phytozome.net>) และ Gramene (<http://www.gramene.org>) พบว่ามียีนในกลุ่มนี้จำนวน 10 ยีน (ตารางที่ 6) เมื่อนำยีนที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกร่วมระหว่าง GASR กับยีนที่ตอบสนองต่อจุลชีพในพืช โดยใช้ฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์ของพืช (Plantarraynet และ GENEVESTIGATOR) พบว่า GASR ส่วนใหญ่มีการแสดงออกร่วมกับยีนในกลุ่มโปรตีนต้านโรค (disease resistance protein) นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกร่วมกับโปรตีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการต้านจุลชีพ เช่น กลูคาเนส (glucanase) โปรตีเนส (proteinase) โปรตีนยับยั้งอะไมเลส (amylase inhibitor) และ ทาวมาติน-ไลค์โปรตีน (thaumatin-like protein) ซึ่งจากยีน GASR ทั้งหมด 10 ยีน พบว่ามี 9 ยีน ที่มีข้อมูลในฐานข้อมูลและมี 4 ยีน ดังต่อไปนี้ GASR3, GASR6, GASR7 และ GASR8 ที่มีการแสดงออกร่วมกับทุกโปรตีนที่กล่าวมาข้างต้น (ตารางที่ 7) นอกจากการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมของยีนเหล่านั้น ยังได้ศึกษาระดับการแสดงของยีนทั้งในภาวะปกติและภาวะที่มีการติดเชื้อ โดยใช้ฐานข้อมูล Rice eFP browser และ GENEVESTIGATOR พบว่าจากยีนสแนคินทั้งหมด 10 ยีน พบยีนที่มีระดับการแสดงออกสูงในภาวะปกติ 6 ยีน ได้แก่ GASR2, GASR3, GASR4, GASR6, GASR7 และ GASR8 ทั้ง 6 ยีนนี้พบที่ช่อดอกและเมล็ด ส่วนในภาวะที่มีการติดเชื้อพบการแสดงออกที่สูงขึ้น 4 ยีน ได้แก่ GASR2, GASR3, GASR8 และ GASR9 จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า ยีน GASR2 และ GASR3 มีการแสดงออกทั้งในภาวะปกติและภาวะที่มีการติดเชื้อ (รูปที่ 13 และ รูปที่ 14) หลังพิจารณาระดับการแสดงออกของยีนและการแสดงออกร่วมกับยีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการต้านจุลชีพ ผู้วิจัยจึงสนใจเลือกศึกษา ยีน GASR3 เป็นลำดับแรก

ตารางที่ 6 ยีน AMP ในกลุ่มสแนคินจากข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. subsp. *japonica*

No.	Gene	MSU gene	Probe	BlastP analysis
1	<i>GASR1</i>	LOC_Os03g14550	-	-
2	<i>GASR2</i>	LOC_Os03g41060	AK070268	Gibberellin regulated protein family protein
3	<i>GASR3</i>	LOC_Os03g55290	AK121316	Gibberellin regulated protein family protein
4	<i>GASR4</i>	LOC_Os04g39110	Os04g0465300	Gibberellin regulated protein family protein
5	<i>GASR5</i>	LOC_Os05g31280	AK106775	GASA5-like protein (Fragment)
6	<i>GASR6</i>	LOC_Os05g35690	Os05g0432200	Gibberellin-regulated protein 2 precursor
7	<i>GASR7</i>	LOC_Os06g15620	AK062516	GAST1 protein precursor
8	<i>GASR8</i>	LOC_Os06g51320	AK059502	Gibberellin-regulated protein 2 precursor
9	<i>GASR9</i>	LOC_Os07g40240	AK107438	Gibberellin regulated protein family protein
10	<i>GASR10</i>	LOC_Os09g24840	AK059073	GASA5-like protein (Fragment)

ตารางที่ 7 การแสดงออกกว้างของยีน GASR กับโปรตีนที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์

ยีน	ยีน MSU	โปรตีนที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์					
		Plant disease protein	Glucanase	Proteinase	Amylase inhibitor	Thaumatin-like protein	
GASR2	LOC_Os03g41060	✓	✓	✓	x	✓	
GASR3	LOC_Os03g55290	✓	✓	✓	✓	✓	
GASR4	LOC_Os04g39110	✓	✓	✓	x	x	
GASR5	LOC_Os05g31280	✓	x	✓	✓	✓	
GASR6	LOC_Os05g35690	✓	✓	✓	✓	✓	
GASR7	LOC_Os06g15620	✓	✓	✓	✓	✓	
GASR8	LOC_Os06g51320	✓	✓	✓	✓	✓	
GASR9	LOC_Os07g40240	✓	✓	x	x	✓	
GASR10	LOC_Os09g24840	✓	✓	x	x	x	



รูปที่ 13 แผนที่ความร้อนของการแสดงออกของยีน GASR ในภาวะปกติ ที่บริเวณต่าง ๆ ของต้นข้าว



รูปที่ 14 แผนที่ความร้อนของการแสดงออกของยีน GASR ต่าง ๆ ในภาวะเครียดทางชีวภาพ (p-value < 0.05)

3.2.2 การทำนายตำแหน่งภายในเซลล์และ signal peptide

จากการทำนายตำแหน่งภายในเซลล์ของโปรตีน GASR3 ด้วยโปรแกรม WOLF PSORT (Horton et al., 2007; <http://wolfsort.org>) พบว่าโปรตีน GASR3 อยู่ในตำแหน่งภายนอกเซลล์ (extracellular) และทำนายส่วนของ signal peptide พบว่า GASR3 มี signal peptide เป็นกรดอะมิโน 27 ตัวแรก จากด้านปลาย N (ตารางที่ 5)

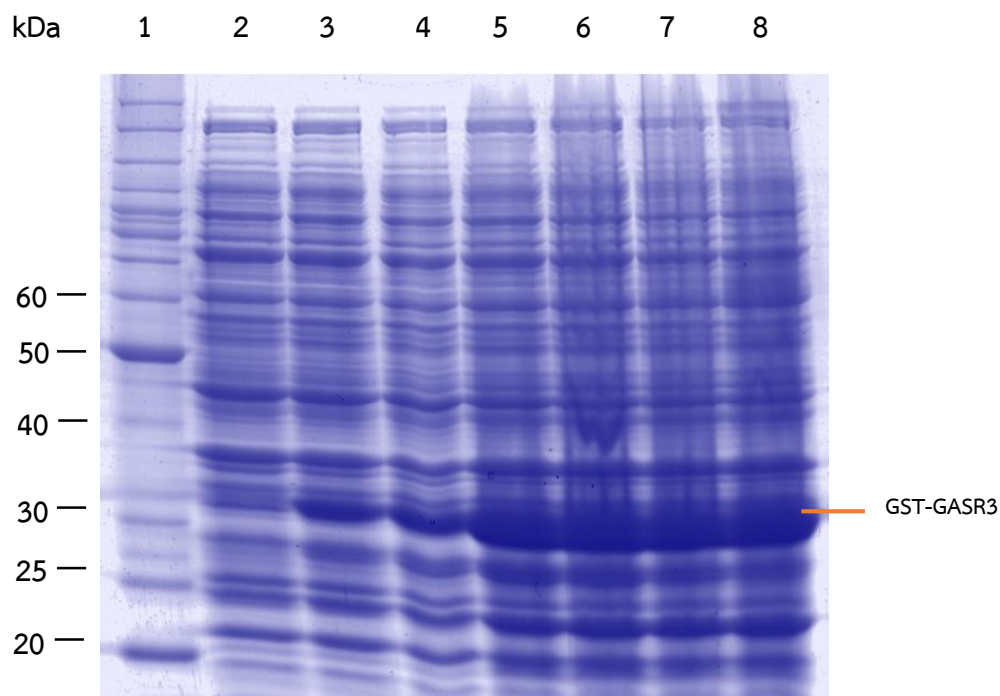
3.2.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3)

หลังจากเพิ่มจำนวนยีน GASR3 เฉพาะส่วนที่ไม่รวม signal peptide ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และเชื่อมยีน GASR3 กับเวกเตอร์ pGEX-6P-3 ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด GST-GASR3 เมื่อถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) คัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด GST-GASR3 ด้วยการทำโคลนพีซีอาร์ และตรวจยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการศึกษาพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GASR3 ที่ถูกต้องและเชื่อมกับ GST-tag ในทิศทางที่ถูกต้องเช่นกัน โดยยีน GASR3 มีขนาด 204 คู่เบส สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโน 67 หน่วย (รูปที่ 15)

จากการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด GST-GASR3 เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-GASR3 คือ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตโปรตีน GST-GASR3 ที่มีขนาด 34 กิโลดาลตันได้ (รูปที่ 16) เมื่อทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ที่บรรจุกลูตาไทโอน เซฟาโรส โพรบี (Glutathione sepharose 4B) และใช้เอนไซม์พรีซิสชันโปรทีเอส (PreScission protease) ในการตัด GST-tag พบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ได้ 0.65 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 17) โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ที่แยกได้มีขนาดประมาณ 14 กิโลดาลตัน ซึ่งมีค่าต่างกับค่าที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy ที่คำนวณขนาดโปรตีนได้เท่ากับ 7.21 กิโลดาลตัน

<u>GGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCATG</u>	60
G D H P P K S D L E V L F Q G P L G S M	20
<u>GGATCAGATTTCTGCGACGGCAAGTGCAAGGTGAGGTGCTCGAAGGCGAGCAGGCACGAC</u>	120
G S D F C D G K C K V R C S K A S R H D	40
<u>GACTGCCTCAAGTACTGCGGCGTGTGCTGCGCCTCCTGCAACTGCGTGCCGTCGGGGACG</u>	180
D C L K Y C G V C C A S C N C V P S G T	60
<u>GCCGGCAACAAGGACGAGTGCCCCTGCTACCGCGACATGACCACCGCCATGGCGCTCGC</u>	240
A G N K D E C P C Y R D M T T G H G A R	80
<u>AAGAGGCCCAAGTGCCCATGA</u>	261
K R P K C P -	86

รูปที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ GST- GASR3 โดยบริเวณที่ขีดเส้นใต้ 1 เส้น คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ GASR3 บริเวณที่ขีดเส้นใต้ 2 เส้น คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์พรีซิสชันโปรทีเอส ลูกศรสีแดง คือ ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์พรีซิสชันโปรทีเอส และตัวหนาสีดำคือ บริเวณส่วนปลาย GST

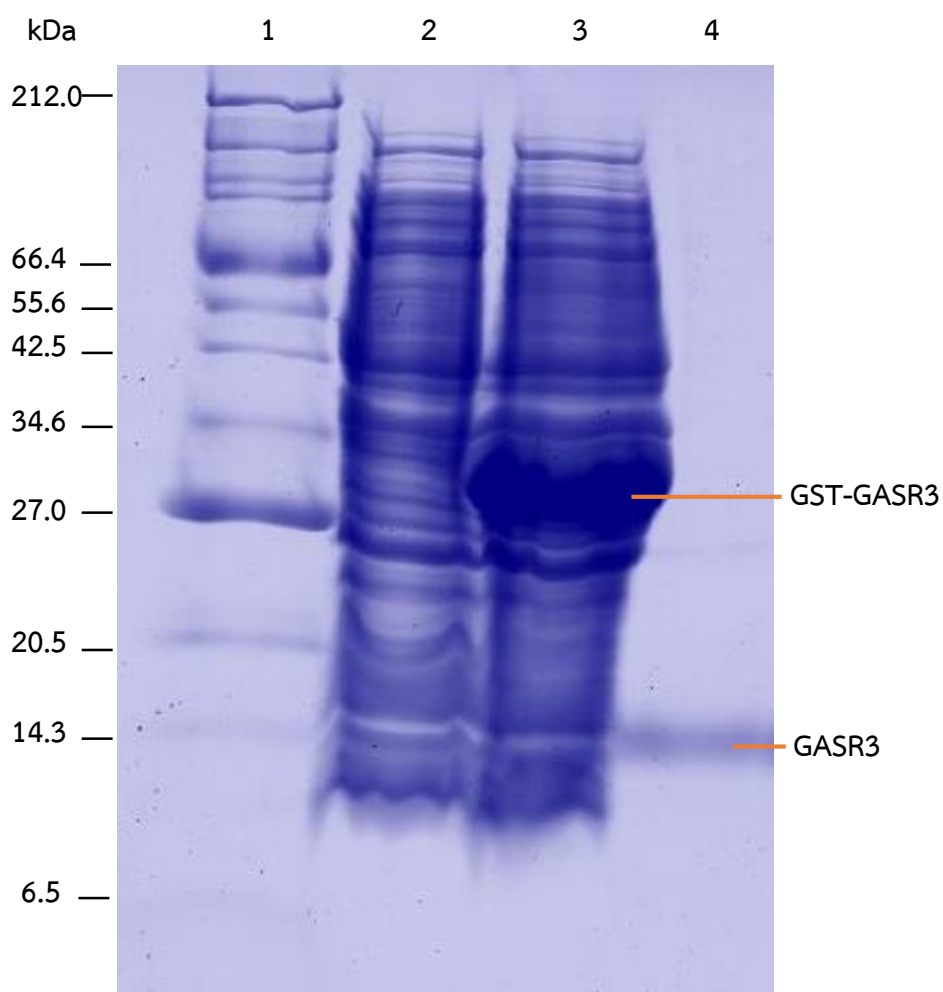


รูปที่ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-GASR3 โดย SDS-PAGE

เลนที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน

เลนที่ 2: รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ยังไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG (0 ชั่วโมง)

เลนที่ 3-8: รีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 17 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน GASR3 โดย SDS-PAGE หลังจากตัด GST-tag ด้วยเอนไซม์พรีซิซชันโปรทีเอส

เลนที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน

เลนที่ 2: รีคอมบิแนนท์โปรตีน GST-GASR3 ที่ยังไม่เหนี่ยวนำด้วย IPTG

เลนที่ 3: รีคอมบิแนนท์โปรตีนหลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เลนที่ 4: รีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ที่บรรจุ กลูตาไธโอน เซฟาโรส โฟร์บี

3.2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3

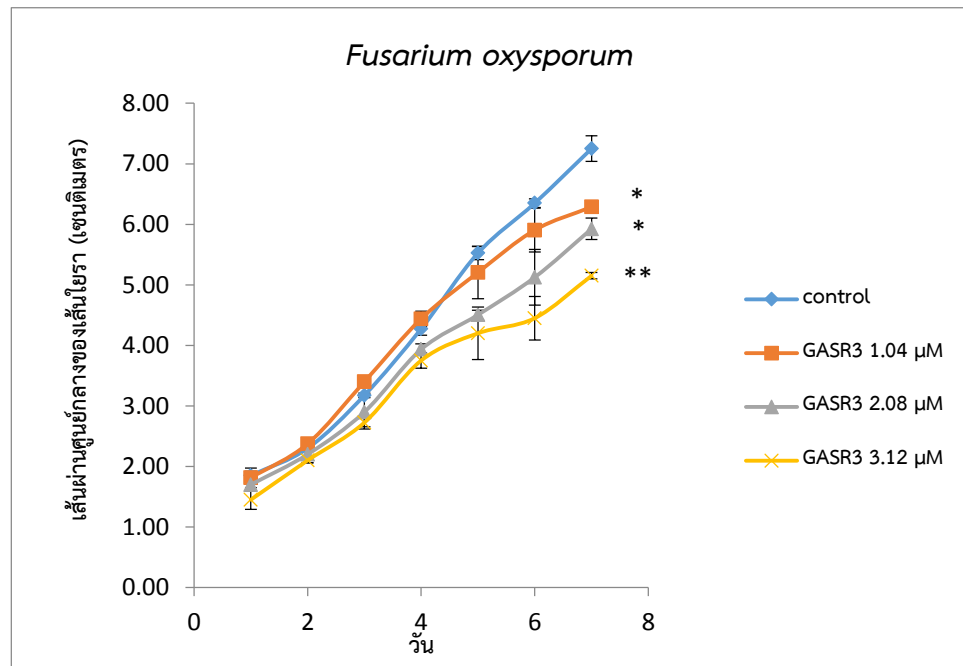
3.2.4.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิเคราะห์จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ (MIC) พบว่าโปรตีน GASR3 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* เป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของ GASR3 ที่ศึกษา ไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์

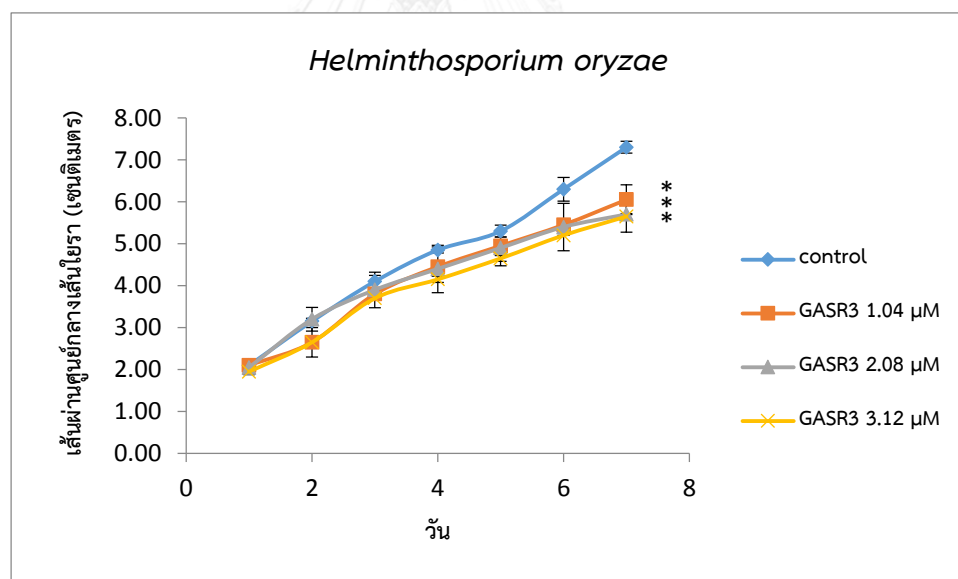
3.2.4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของโปรตีน GASR3 โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยของเชื้อรา 2 สายพันธุ์คือ *F. oxysporum* และ *H. oryzae* บนจานอาหารแข็งพีดีเอ (potato-dextrose-agar (PDA)) ที่มีการผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1.04, 2.08 และ 3.12 ไมโครโมลาร์ เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ไม่ผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จานอาหารที่มีการผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ทั้ง 3 ความเข้มข้น มีการเจริญของเส้นใยร่าต่ำกว่าจานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (รูปที่ 18) จากการศึกษาฤทธิ์ของ GASR3 ในการต้านเชื้อราจะเห็นได้ว่า GASR3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราโดยขึ้นกับความเข้มข้น (dose-dependent) คือ ยิ่งมีความเข้มข้นของ GASR3 สูง ยิ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดี

ก.



ข.



รูปที่ 18 การยับยั้งเชื้อราของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ก. การทดสอบกับ *F. oxysporum* ข. การทดสอบ *H. oryzae*

หมายเหตุ: * แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

** แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P < 0.01$)

3.3. THION15 และ GASR3 ในข้าว *O. sativa* L. subsp. *indica* สายพันธุ์ไทย KDML105

3.3.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในข้าว *O. sativa* L. subsp. *indica* สายพันธุ์ไทย KDML105

จากการโคลนชิ้นส่วนยีน *THION15* และ *GASR3* ที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ KDML105 เชื่อมกับเวกเตอร์ pJet และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* เพื่อสกัดพลาสมิดและส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า เมื่อตรวจสอบความเหมือนโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ยีน ที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ KDML105 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *THION15* และ *GASR3* ในข้าว *O. sativa* L. subsp. *japonica* คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นโปรตีนที่ไม่มี signal peptide (รูปที่ 19 และ รูปที่ 20)



<i>indica</i>	CAAGAGACGATCAAGGTGGGAGCAAAGAGCTGCTGCCCAACCACCACGGCAAGAAACATC	63
<i>japonica</i>	CAAGAGACGATCAAGGTGGGAGCAAAGAGCTGCTGCCCAACCACCACGGCAAGAAACATC	63
<i>indica</i>	TATAATGCATGCCGTTTTGCGCATGGCACAAGGGAAAGATGTTCTAAACTCTCTGGCTGT	123
<i>japonica</i>	TATAATGCATGCCGTTTTGCGCATGGCACAAGGGAAAGATGTTCTAAACTCTCTGGCTGT	123
<i>indica</i>	AAAATTGTTGATGGGAAATGCAAGCCACCTTACATTACCACACCCTTACCCTGAGTCT	183
<i>japonica</i>	AAAATTGTTGATGGGAAATGCAAGCCACCTTACATTACCACACCCTTACCCTGAGTCT	183
<i>indica</i>	GAGGAATTGGATGTACTTGACTTCTGTATGCTGGGATGTACTTCATCCGTGTGCAGCAAC	243
<i>japonica</i>	GAGGAATTGGATGTACTTGACTTCTGTATGCTGGGATGTACTTCATCCGTGTGCAGCAAC	243
<i>indica</i>	ATAAACACTTTTGTGGCAACGAAGAAGGGAACGGTGCTGTGGAACGTTGCAACGAAGCA	303
<i>japonica</i>	ATAAACACTTTTGTGGCAACGAAGAAGGGAACGGTGCTGTGGAACGTTGCAACGAAGCA	303
<i>indica</i>	TGCTACCACTTCTGCAACAAGGAAGCTGATATTGTCACTATCGTTTCCTAA	354
<i>japonica</i>	TGCTACCACTTCTGCAACAAGGAAGCTGATATTGTCACTATCGTTTCCTAA	354

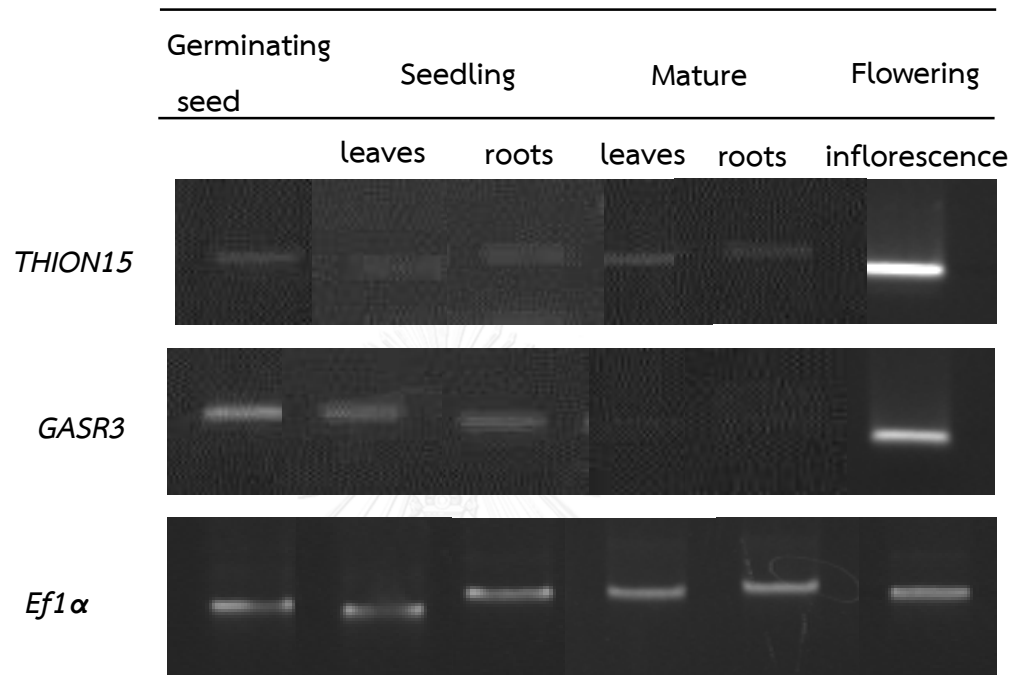
รูปที่ 19 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน *THION15* จากข้าว *O. sativa* L. subsp. *indica* สายพันธุ์ KDML105 กับข้าว *O. sativa* L. subsp. *japonica*

<i>indica</i>	GGATCAGATTTCTGCGACGGCAAGTGCAAGGTGAGGTGCTCGAAGGCGAGCAGGCACGAC	60
<i>japonica</i>	GGATCAGATTTCTGCGACGGCAAGTGCAAGGTGAGGTGCTCGAAGGCGAGCAGGCACGAC	60
<i>indica</i>	GACTGCCTCAAGTACTGCGGCGTGTGCTGCGCCTCCTGCAACTGCGTGCCGTCGGGGACG	120
<i>japonica</i>	GACTGCCTCAAGTACTGCGGCGTGTGCTGCGCCTCCTGCAACTGCGTGCCGTCGGGGACG	120
<i>indica</i>	GCCGGCAACAAGGACGAGTGCCCTGCTACCGCGACATGACCACCGGCCATGGCGCTCGC	180
<i>japonica</i>	GCCGGCAACAAGGACGAGTGCCCTGCTACCGCGACATGACCACCGGCCATGGCGCTCGC	180
<i>indica</i>	AAGAGGCCCAAGTGCCCATGA	201
<i>japonica</i>	AAGAGGCCCAAGTGCCCATGA	201

รูปที่ 20 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างยีน GASR3 จากข้าว *O. sativa* L. subsp. *indica* สายพันธุ์ไทย KDML105 กับข้าว *O. sativa* L. subsp. *japonica*

3.3.2 การแสดงออกของยีน *GASR3* และ *THION15* ในข้าว *O. sativa* L. subsp. *indica* สายพันธุ์ไทย KDML105

จากการทำ Semi-quantitative RT-PCR เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *THION15* และ *GASR3* ในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML 105 ทั้งหมด 4 ระยะของการเจริญเติบโตในข้าว ได้แก่ germinating seed, seedling, mature และ flowering โดยมี *Ef1 α* เป็นยีนมาตรฐาน พบว่ายีน *THION15* มีการแสดงออกในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 ทั้ง 4 ระยะ โดยมีระดับการแสดงออกสูงสุดในระยะ flowering และมีระดับการแสดงออกต่ำในระยะเวลา germinating seed รวมถึงบริเวณใบและรากของระยะ seedling และ mature เช่นกัน ส่วนยีน *GASR3* มีการแสดงออกในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 ทั้ง 4 ระยะ โดยมีระดับการแสดงออกสูงสุดในระยะ flowering อีกทั้งยังพบการแสดงออกในระยะ germinating seed ค่อนข้างสูงใกล้เคียงกับระยะ flowering และพบการแสดงออกต่ำในระยะเวลา seedling และ mature ทั้งบริเวณใบและรากเช่นกัน (รูปที่ 21)



รูปที่ 21 ระดับการแสดงออกของยีน *THION15* และ *GASR3* ในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 ในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกยีน

เนื่องจากปัจจุบันผลผลิตต่อไร่ของข้าวมีปริมาณลดต่ำลง ทั้งนี้ปัจจัยส่วนหนึ่งเกิดจากเชื้อก่อโรคในข้าวได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย เชื้อราและเชื้อไวรัส เป็นต้น ด้วยเหตุนี้เกษตรกรจึงมีการใช้สารเคมีเพิ่มมากขึ้น ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา ดังนั้นการใช้ AMP เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคแทนการใช้สารเคมี ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถก่อให้เกิดการดื้อยาได้ยากกว่า (Schonwetter et al. 1995) อีกทั้งยังปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการค้นหา ยีน AMP ในกลุ่มโปรตีนสแนคินและไทโอนินจากข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* L. subsp. *japonica* ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านทานเชื้อก่อโรคในข้าวและในพืชอื่น ๆ โดยการวิเคราะห์การแสดงออกร่วมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านจุลชีพได้แก่ glucanase, chitinase, amylase inhibitor และ thumatin-like protein (TLP) ซึ่งในกลุ่มโปรตีนไทโอนินพบว่า จากยีนไทโอนินทั้งหมด 44 ยีนมีเพียง 12 ยีน รวมถึง *THION15* ที่มีการแสดงออกร่วมกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านจุลชีพ (ตารางที่ 4) ส่วนในกลุ่มโปรตีนสแนคินพบว่า จากยีนสแนคินทั้งหมด 10 ยีนมี 9 ยีน รวมถึง *GASR3* ที่มีการแสดงออกร่วมกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านจุลชีพ (ตารางที่ 7) จากรายงานก่อนหน้าพบว่า chitinase เป็น pathogenesis-related (PR) protein ที่มีขนาดโปรตีน 26-43 kDa (Nielsen et al. 1997; Watanabe et al. 1999) ถูกค้นพบในแบคทีเรีย รา (Chernin et al. 1997; Kang et al. 1999) และพืชหลายชนิดเช่น ยาสูบ แตงกวา พืชตระกูลถั่ว และข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งพบว่า chitinase มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคในคนและพืช ได้แก่ *Trichoderma reesei*, *Alternaria solani*, *F. oxysporum*, *R. solani* และ *Coprinus comatus* เป็นต้น (Huynh et al. 1992; Terras et al. 1992; Melchers et al. 1994) โดยเข้าทำลาย chitin ที่เป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้ส่วนประกอบต่าง ๆ ที่สำคัญภายในเซลล์จะออกมานอกเซลล์ จึงส่งผลให้เชื้อราไม่สามารถดำรงชีพได้ตามปกติและตายในที่สุด (Jach et al. 1995) glucanase เป็น PR-protein ที่มีการค้นพบในพืชหลายชนิดเช่น อะราบิโดปซิส ยาสูบ ถั่ว และบาร์เลย์ เป็นต้น (Cote et al. 1991; Kim and Hwang 1997; Rezzonico et al. 1998) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อราก่อโรคทั้งในคนและพืช ได้แก่ *R. solani*, *Candida albicans* และ *Aspergillus fumigatus* เป็นต้น โดยมีฤทธิ์ในการย่อย (1,3) β -glucan ที่พบในผนังเซลล์ราได้ และยังมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีน glucanase จากบาร์เลย์ให้มีแสดงออกเกินปกติในต้นยาสูบเพื่อให้มีความต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคอีกด้วย (Jach et al. 1995) amylase inhibitor เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งส่วนใหญ่พบในเมล็ดและส่วนต่าง ๆ ของ

พืช มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ amylase ในคน สัตว์ และแมลง จากรายงานก่อนหน้านี้นี้ มีการค้นพบ phaseolamin เป็น amylase inhibitor สกัดได้จากเมล็ดถั่ว มีฤทธิ์ในการยับยั้ง amylase ในแมลงศัตรูพืชรวมถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้แก่ คน หมู เป็นต้น (Marshall and Lauda 1975) นอกจากนี้ TLP เป็นโปรตีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ thaumatin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีรสหวานสกัดได้จากผลของไม้พุ่ม *Thaumatococcus danielli* (Van der Wel and Loewe 1972; Datta et al. 1999) มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า TLP พบในพืชหลายชนิดเช่น ข้าว อะราบิดอปซิส และมอส เป็นต้น (Liu et al. 2010) มีความสามารถในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น TLP จากต้นเกาลัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *T. viride* และ *F. oxysporum* เป็นต้น และยังมีรายงานว่า TLP จากข้าวสาลีสามารถยับยั้งการทำงานของ xylanase ในเชื้อรา *T. longibrachiatum* ทำให้ไม่สามารถผลิต xylan ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อราได้ (Fierens et al. 2007) และมากกว่านั้น zeamatin เป็น TLP ที่สกัดได้จากข้าวโพด ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง amylase ในแมลงศัตรูพืช (*Tribolium castanum*) และแบคทีเรีย (*Bacillus* sp.) (Schimoler-O'Rourke et al. 2001) ดังนั้น ยีน *THION15* และ *GASR3* ที่มีการแสดงออกพร้อมกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีความน่าจะเป็นสูงในการทำหน้าที่ต้านเชื้อโรคเช่นกัน

นอกจากนี้การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนถือว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพื่อใช้เป็นหลักการในการคัดเลือกยีนทั้งในภาวะปกติและภาวะที่มีการติดเชื้อ ในกลุ่มไทโอนินพบว่า ยีน *THION15* มีการแสดงออกทั้งในภาวะปกติและมีการแสดงออกสูงขึ้นในภาวะที่มีการติดเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* และในกลุ่มสแนคินพบว่า *GASR3* มีการแสดงออกทั้งในภาวะปกติและมีการแสดงสูงขึ้นในภาวะที่มีการติดเชื้อ *M. graminicola*, *M. grisea*, *M. incognita* และ *X. oryzae* pv. *oryzae*

4.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนสแนคินและไทโอนินในการต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืช โดยผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในระบบโปรคาริโอต ไทโอนินและสแนคินเป็น AMP ที่มีความสำคัญ ด้วยคุณสมบัติทั่วไปที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้แก่ ความเป็นสมบัติสองหน้า (amphipathicity) ความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยเมมเบรนของจุลินทรีย์ที่เป็น lipid bilayer หรือเมมเบรนที่มีประจุ และการมีอะมิโนซิสเทอีนเป็นจำนวนมาก ที่จำเป็นต่อการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ช่วยให้เปปไทด์มีโครงสร้างที่เสถียร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Brogden, 2005) ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสแนคินและไทโอนินจากข้าว โดยผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์

Rosetta gami ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้ จึงสำคัญต่อ AMP ที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนอยู่ จะช่วยให้โปรตีนมีโครงสร้างที่ถูกต้องและมีความเสถียร โดยอาศัยเวกเตอร์ pGEX-6P-3 ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่มียีน glutathione S-transferase (GST) ทำให้ผลิตภัณฑ์คอมบิแนนท์โปรตีนในรูปของ fusion protein เพื่อไม่ให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนออกฤทธิ์ ซึ่งอาจจะเป็นพิษต่อแบคทีเรียเจ้าบ้านได้ นอกจากนี้ GST ยังมีประโยชน์ในการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนละลายได้ดีและบริสุทธิ์ (Nakagawa et al. 2007) เมื่อทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองให้บริสุทธิ์และตัด GST ออก สามารถได้โปรตีน THION15 ขนาด 13 กิโลดาลตัน ที่มีขนาดใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy เท่ากับ 12.83 กิโลดาลตัน และในส่วนของโปรตีน GASR3 เมื่อทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่า ขนาดแถบโปรตีนที่ได้เท่ากับ 14 kDa ซึ่งต่างจากค่าที่คำนวณได้จากโปรแกรม ExPASy เท่ากับ 7.21 กิโลดาลตัน โดยต่างกันสองเท่า จากการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่า AMP ในพืชกลุ่มอื่นสามารถฟอร์มโครงสร้างให้อยู่ในรูปไดเมอร์ (dimer form) เช่น โปรตีน ns-LTP ที่สกัดได้จากเมล็ดผักกาดพบว่า สามารถฟอร์มโครงสร้างโปรตีนในรูปไดเมอร์ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรากอโรคิด (Terras et al. 1992) เช่นเดียวกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน Pg-AMP1 เป็น AMP ที่พบในเมล็ดฝรั่ง (*Psidium guajava*) พบว่าเมื่อฟอร์มโครงสร้างเป็นไดเมอร์นั้น สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*Staphylococcus aureus*) และแกรมลบ (*Klebsiella pneumonia*) ได้เช่นกัน (Tavares et al. 2012) ทั้งนี้สแนคินที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการฟอร์มไดเมอร์ แต่อาจมีความเป็นไปได้ว่าจากคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่จำเพาะ เช่น คุณสมบัติ amphipathic โดยมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำรวมกันเป็นกลุ่ม ๆ (cluster) แยกเป็นโดเมน ซึ่งอาจมีแนวโน้มจับกันเป็นโครงสร้างไดเมอร์ได้ (Bundo et al. 2014) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน GASR3 สามารถฟอร์มโครงสร้างเป็นไดเมอร์ได้เช่นเดียวกัน จึงสามารถนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปได้

4.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน THION15 และ GASR3

4.3.1 ไทโอนิน

4.3.1.1 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพืช โดยวิเคราะห์หาค่า MIC ที่มีต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* พบว่าโปรตีน THION15 แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยพบว่าในการต้านเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ให้ค่า MIC เท่ากับ 8.77 ไมโครโมลาร์ (112.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเชื้อ *E. carotovora* ให้ค่า MIC เท่ากับ 1.09 ไมโครโมลาร์ (14.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ไทโอนินที่พบในพืชหลายชนิดนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้ง

เชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกที่ก่อโรคในพืชและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น *Caleyia* และคณะ (1972) สกัดโปรตีนฟูโรไทโอนิน (purothionin) จากเอนโดสเปิร์มในข้าวสาลี พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *X. phaseoli*, *X. campestris* และ *E. amylovora* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคจีนัสเดียวกันกับที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยค่า MIC เท่ากับ 27, 56 และ 540 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Corynebacterium flaccumfaciens* และ *C. michiganense* นอกจากนี้ยังมีการสกัด Tu-AMP1 และ Tu-AMP2 เป็นไทโอนินจากหัวทิวลิป (*Tulipa gesneriana*) พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *E. carotovora* โดยค่า MIC เท่ากับ 11 และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Fujimura et al. 2004)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ในการต้าน *E. carotovora* กับผลที่มีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ให้ค่า MIC เท่ากับ 14.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่า MIC ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันดังที่กล่าวมาข้างต้น ในขณะที่การต้าน *X. oryzae* pv. *oryzae* ให้ค่า MIC เท่ากับ 112.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่า MIC มากกว่า AMP ชนิดอื่น ในการต้าน *Xanthomonas* sp. ที่มีการศึกษาก่อนหน้า

4.3.1.2 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในพืช พบว่าโปรตีน THION15 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. oxysporum* และ *H. oryzae* โดยพบว่าเชื้อราที่มีการเจริญของเส้นใยลดลงทั้ง 3 ความเข้มข้นได้แก่ 0.58 ไมโครโมลาร์ (7.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 1.17 ไมโครโมลาร์ (15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 1.75 ไมโครโมลาร์ (22.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับงานควบคุมที่ไม่ผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ที่มีการเจริญของเส้นใยราได้ปกติ ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่การสกัดโปรตีน Viscotixin A3 และ B จากใบและลำต้นของ *Viscum album* L. พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค *F. solani* ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ และ *Sclerotinia sclerotium* ที่ความเข้มข้น 3.75 ไมโครโมลาร์ (Giudici et al. 2004) มากกว่านั้น Tu-AMP1 และ Tu-AMP2 เป็นไทโอนินที่สกัดจากหัวทิวลิป (*Tulipa gesneriana*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *F. oxysporum* และ *Geotrichum candidum* โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้เท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นกัน (Fujimura et al. 2004)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 ในการต้าน *F. oxysporum* และ *H. oryzae* พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 มีความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดใกล้เคียงกับความเข้มข้นของ AMP ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่รายงานก่อนหน้านี้เช่นกัน

4.3.2 สแนคิน

4.3.2.1 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในพืช โดยวิเคราะห์หาค่า MIC ที่มีต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* โดยใช้โปรตีนในช่วงความเข้มข้นเป็น two-fold dilution ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.08-31.2 ไมโครโมลาร์ (0.59-225 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าโปรตีน GASR3 ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของโปรตีนสแนคินมีการศึกษาค่อนข้างน้อย แต่ทั้งนี้ก็มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น Segura และคณะ (1999) สกัด SN-1 จากมันฝรั่งเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Clavibacter michiganensis* ที่ความเข้มข้น 1-10 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แกรมลบ *Ralstonia solanacearum* ให้ผลเช่นเดียวกันกับ *StSN2* ที่พบในมันฝรั่งซึ่งพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *C. michiganensis* ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *R. solanacearum* ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 20 ไมโครโมลาร์ (Berrocal-Lobo et al. 2002) จากการรายงานนี้พบว่าให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของผนังเซลล์ที่พบเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ ทำหน้าที่ป้องกันสารที่เป็นพิษไม่ให้เข้าสู่ภายในเซลล์ ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 อาจไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ หรืออาจต้องใช้ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนค่อนข้างสูง นั่นหมายความว่า โปรตีน GASR3 มีประสิทธิภาพไม่ดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* ได้

4.3.2.2 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในพืช พบว่าโปรตีน GASR3 มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราก่อโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *F. oxysporum* และ *H. oryzae* โดยพบว่าเชื้อรามีค่าการเจริญของเส้นใยลดลงทั้ง 3 ความเข้มข้นได้แก่ 1.04 ไมโครโมลาร์ (7.5 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร) 2.08 ไมโครโมลาร์ (15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 3.12 ไมโครโมลาร์ (22.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับงานควบคุมที่ไม่ผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ที่มีการเจริญเติบโตได้ปกติ ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่มีการสกัดโปรตีน StSn1 และ StSn2 จากมันฝรั่ง พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค *F. solani* ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรค *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* ที่ความเข้มข้น 13 และ 10 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่ความเข้มข้น 13 และ 20 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (Berrocal-Lobo et al. 2002)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 กับ AMP ตัวอื่นที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 ให้ค่าความเข้มข้นที่น้อยกว่า AMP ตัวอื่นในการยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum*

ดังนั้นการมีฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีน GASR3 และ THION15 อาจเนื่องจากคุณสมบัติของ AMP ที่กล่าวมาข้างต้น จึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. oxysporum* และ *H. oryzae* และ THION15 ยังมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมลบ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* ได้อีกด้วย จึงเป็นประโยชน์ที่จะศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อโรคอื่น ๆ ทั้งที่ก่อโรคในพืช แมลงและสัตว์ต่อไป

4.4 การแสดงออกของยีน *THION15* และ *GASR3* ในข้าวสายพันธุ์ ไทย KDML105 และ

ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการโคลนยีนเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THION15* และ *GASR3* จากข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชในฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้งสองยีนมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *THION15* และ *GASR3* ที่พบในข้าวญี่ปุ่น *O. sativa* L. subsp. *japonica* 100% จากยีนของ *THION15* และ *GASR3* ที่เหมือนกันในข้าวสองสายพันธุ์นี้จึงทำให้มีโปรตีนเหมือนกัน ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านโรคเช่นเดียวกันกับที่พบในข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่น

เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *THION15* โดยการทำให้ semi-quantitative RT-PCR ซึ่งใช้ cDNA จากข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 เป็นแม่แบบนั้น พบการแสดงออกของยีนทั้งสองในข้าวสายพันธุ์ KDML105 ทั้ง 4 ระยะ โดยพบการแสดงออกสูงสุดที่ช่อดอกของระยะ flowering และมีการแสดงออกต่ำที่ใบและรากของระยะ seedling และ mature จากผลการแสดงออกของยีนนี้พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับที่พบในข้าวญี่ปุ่น *O. sativa* L. subsp. *japonica* (รูปที่ 21) ซึ่งสอดคล้อง

กับงานวิจัยที่รายงานก่อนหน้านี้ว่า AMP ในพืชส่วนใหญ่มีการแสดงออกสูงในส่วนของช่อดอกและเมล็ดซึ่งเป็นบริเวณที่มีการติดเชื้อโรคน้อยมาก (Ponz et al. 1983; Jain et al. 2007) Ponz และคณะ (1983) ได้ศึกษาการแสดงออกของไทโอนินในบาร์เลย์พบว่า มีการแสดงออกสูงที่เอนโดสเปิร์มในเมล็ด เช่นกันกับ *Crambe abyssinica* เป็นพืชใบเลี้ยงคู่พบว่า มีการแสดงออกของไทโอนินที่เมล็ดและใบ (Schrader Fischer and Apel 1994) ซึ่งมากกว่านั้นยังพบว่าในอะราบิสตอปซิสมีการแสดงออกของยีนไทโอนินที่ดอก ฝัก ใบและเมล็ด และมีการแสดงออกสูงเมื่อมีการติดเชื้อราก่อโรค *F. oxysporum* f.sp. *matthiolae* (Epple et al. 1995) ซึ่งสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของยีน *THION15* ที่พบในเมล็ดเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า viscotoxin ซึ่งเป็นไทโอนินที่พบในเมล็ด ยังทำหน้าที่เป็นโปรตีนสะสม (storage protein) โดยเป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีการพบ viscotoxin ในระดับต่ำมากในใบที่กำลังเขียว (Johnson et al. 1987)

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GASR3* โดยการทำให้ Semi-quantitative RT-PCR ซึ่งใช้ cDNA จากข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 เป็นแม่แบบนั้น ให้ผลเช่นเดียวกับยีน *THION15* คือพบการแสดงออกของยีนในข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 ทั้ง 4 ระยะ โดยพบการแสดงออกสูงสุดที่ช่อดอกของระยะ flowering และมีการแสดงออกต่ำที่ใบและรากของระยะ seedling และ mature จากผลการแสดงออกของยีน *GASR3* พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับที่พบในข้าวญี่ปุ่น *O. sativa* L. subsp. *japonica* (รูปที่ 21) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น (Jain et al. 2007) เช่นเดียวกับยีน *FaGAST* ซึ่งเป็นสแนคินที่พบในสตรอเบอร์รี่ พบว่ามีการแสดงออกสูงที่ผลและรากบริเวณที่มีการยึดตัว แต่มีการแสดงออกต่ำที่ใบและสโตลอน (stolon) (Jose et al. 2006) ยีน *GIP2* เป็นสแนคินในพืษเนี่ยก็พบว่า มีการแสดงออกสูงที่ดอกเช่นกัน (Ben-Nissan and Weiss 1996) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ยีน *snakin-1* ที่พบในมันฝรั่งมีการแสดงออกสูงที่กลีบดอกและคาร์เพล (carpel) โดยพบในส่วนป้องกันเชิงกายภาพ เช่น ผนังเซลล์ (cell wall) และคิวติเคิล (cuticle) เพื่อไม่ให้เชื้อก่อโรคบุกกรุกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของพืช (reproductive organs) (Segura et al. 1999)

4.5 ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ *THION15* และ *GASR3*

จากงานวิจัยครั้งนี้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *THION15* และ *GASR3* จากข้าว ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราก่อโรคในพืชได้ จึงเป็นประโยชน์ต่อนักวิจัยในการศึกษาต่อยอดเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคนิชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังสามารถพัฒนาการผลิตพืชดัดแปลงพันธุกรรมโดยการถ่ายยีน *THION15* หรือ *GASR3* ที่มีฤทธิ์จากการศึกษาครั้งนี้เพื่อประโยชน์

ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* และเชื้อรา *F. oxysporum* และ *H. oryzae* ได้อีกด้วย และยังสามารถนำมาประยุกต์โดยการผลิตโปรตีน THION15 หรือ GASR3 ในพืชซึ่งทำให้ลดขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ Wu และคณะ (2011) ได้ผลิตรีคอมบิแนนท์ AMP จากเมล็ดหัวหอมในแบคทีเรีย เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์โดยการเคลือบลงบนต้นมะเขือเทศ ทำให้ต้นมะเขือเทศมีความต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคได้มากขึ้น ดังนั้นจึงอาจนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่อไป โดยนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน THION15 และ GASR3 ที่ผลิตได้ไปทดสอบโดยการสเปรย์ในแปลงปลูกเพื่อประโยชน์ในการเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อโรคในข้าวหรือพืชชนิดอื่น ๆ เช่น มันสำปะหลัง อ้อย และข้าวโพด เป็นต้น



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากฐานข้อมูลจีโนมข้าวที่ค้นพบ AMP ในกลุ่มต่าง ๆ เป็นจำนวนมากและยังไม่มีรายงานการศึกษาเท่าที่ควร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ AMP ในกลุ่มไทโอนิน และสแนคินจากข้าวในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* และเชื้อรา *F. oxysporum* และ *H. oryzae* โดยใช้การวิเคราะห์การแสดงออกพร้อมของยีนและระดับการแสดงออกของยีนนั้นในการคัดเลือกยีน

จากการวิเคราะห์การแสดงออกพร้อมของยีนและระดับการแสดงออกของยีน สามารถคัดเลือกยีนไทโอนิน ได้แก่ *THION15* ที่มีการแสดงออกพร้อมกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อก่อโรคพืชและมีระดับการแสดงออกสูงที่ช่อดอกในภาวะปกติอีกทั้งยังแสดงออกสูงในภาวะที่มีการติดเชื้อจุลชีพ และสามารถระบุยีนสแนคิน ได้แก่ *GASR3* ที่มีการแสดงออกพร้อมกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อก่อโรคพืชและมีระดับการแสดงออกสูงที่ช่อดอกและเมล็ดในภาวะปกติอีกทั้งยังแสดงออกสูงในภาวะที่มีการติดเชื้อจุลชีพอีกด้วย โดยสามารถโคลนยีน *THION15* และ *GASR3* และผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Rosetta gami (DE3) ได้ในสภาวะที่เหมาะสมที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

รีคอมบิแนนท์โปรตีน *THION15* มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* โดยพบว่า *THION15* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8.77 ไมโครโมลาร์ และเชื้อ *E. carotovora* ให้ค่า MIC เท่ากับ 1.09 ไมโครโมลาร์ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา *F. oxysporum* และ *H. oryzae* โดยพบว่าเชื้อราที่มีการเจริญของเส้นใยลดลงทั้ง 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.58, 1.17 และ 1.75 ไมโครโมลาร์

รีคอมบิแนนท์โปรตีน *GASR3* ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *X. oryzae* pv. *oryzae* และ *E. carotovora* แต่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อรา *F. oxysporum* และ *H. oryzae* โดยพบว่าเชื้อราที่มีการเจริญของเส้นใยลดลงทั้ง 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 1.04, 2.08 และ 3.12 ไมโครโมลาร์

จากการโคลนยีนเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *THION15* และ *GASR3* จากข้าวสายพันธุ์ไทย KDML105 พบว่าทั้งสองยีนมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน *THION15* และ *GASR3* ที่พบในข้าวญี่ปุ่น *O. sativa* L. subsp. *japonica* 100% ซึ่งอาจมีฤทธิ์ในการต้านโรคเช่นเดียวกัน

กับที่พบในข้าวสายพันธุ์ญี่ปุ่น และเมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนทั้งสองด้วยการทำ Semi-quantitative RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกสูงสุดในระยะช่อดอก ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับที่พบในญี่ปุ่น *O. sativa* L. subsp. *japonica*



รายการอ้างอิง

- Almasia NI, Bazzini AA, Hopp HE, Vazquez-Rovere C (2008) Overexpression of snakin-1 gene enhances resistance to *Rhizoctonia solani* and *Erwinia carotovora* in transgenic potato plants. *Mol Plant Pathol* 9:329-338
- Bains PS, Bisht VS (1995) Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. *Plant Dis* 79:241-242
- Balaji V, Sessa G, Smart CD (2011) Silencing of host basal defense response-related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathol* 101:349-357
- Balls AK, Hale WS, and Harris TH (1942) A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem* 19:279-288
- Ben-Nissan G, Weiss D (1996) The petunia homologue of tomato *gast1*: Transcript accumulation coincides with gibberellin-induced corolla cell elongation. *Plant Mol Biol* 32:1067-1074
- Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, Garcia-Olmedo F, Molina A (2002) Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol* 128:951-961
- Broekaert WF, Bolle MFC, Thevissen K, Samblanx GW, Osborn RW (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci* 16:297-323
- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3:238-250
- Brown KL, Hancock RE (2006) Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* 18:24-30
- Bundo M, Montesinos L, Izquierdo E, Campo S, Mieulet D, Guiderdoni E, Rossignol M, Badosa E, Montesinos E, San Segundo B, Coca M (2014) Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm. *BMC Plant Biol* 14:102
- Carlson A, Skadsen R, Kaeppler HF (2006) Barley hordothionin accumulates in transgenic oat seeds and purified protein retains anti-fungal properties *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol* 42:318-323

- Carmona MJ, Molina A, Fernandez JA, Lopez-Fando JJ, Garcia-Olmedo F (1993) Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J* 33:457-462
- Castro MS, Fontes W (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett* 12:11-16
- Chernin LS, De La Fuente L, Sobolev V, Haran S, Vorgias CE, Oppenheim AB, Chet I (1997) Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Appl Environ Microbiol* 63:834-839
- Cote F, Cutt JR, Asselin A, Klessig DF (1991) Pathogenesis-related acidic beta-1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Mol Plant-Microbe Interact* 4:173-181
- Datta K, Velazhahan R, Oliva N, Ona I, Mew T, Khush GS, Muthukrishnan S, Datta SK (1999) Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmentally friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. *Theor Appl Genet* 98:1138-1145
- De Caleyra RF, Gonzalez-Pascual B, Garcia-Olmedo F, Carbonero P (1972) Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins *in vitro*. *Appl Microbiol* 23:998-1000
- Eppl P, Apel K, Bohlmann H (1995) An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* 109:813-820
- Faccio P, Vazquez-Rovere C, Hopp E, Gonzalez G, Decima-Oneto C, Favret E, Diaz Paleo A, Franzone P (2011) Increased tolerance to wheat powdery mildew by heterologous constitutive expression of the *Solanum chacoense snakin-1* gene. *Czech J Genet Plant Breed* 47:S135-S141
- Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, Goesaert H, Brijs K, Beaugrand J, Volckaert G, Van Campenhout S, Proost P, Courtin CM, Delcour JA (2007) TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochem J* 403:583-591

- Fu FF, Xue HW (2010) Coexpression analysis identifies rice starch regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator. *Plant Physiol* 154:927-938
- Fujimura M, Ideguchi M, Minami Y, Watanabe K, Tadera K (2004) Purification, characterization, and sequencing of novel antimicrobial peptides, Tu-AMP 1 and Tu-AMP 2, from bulbs of tulip (*Tulipa gesneriana* L.). *Biosci Biotechnol, Biochem* 68:571-577
- Giudici AM, Regente MC, Villalain J, Pfuller K, Pfuller U, Canal L (2004) Mistletoe viscotoxins induce membrane permeabilization and spore death in phytopathogenic fungi. *Physiol Plant* 121:2-7
- Hammami R, Ben Hamida J, Vergoten G, Fliss I (2009) PhytAMP: a database dedicated to antimicrobial plant peptides. *Nucleic Acids Res* 37:D963-D968
- Harris PWR, Yang S, Molina A, Lopez G, Middleditch M, Brimble MA (2014) Plant antimicrobial peptides snakin-1 and snakin-2: chemical synthesis and insights into the disulfide connectivity *Chem Eur J* 20:5102-5110
- Horan K, Jang C, Bailey-Serres J, Mittler R, Shelton C, Harper JF, Zhu JK, Cushman JC, Gollery M, Girke T (2008) Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. *Plant Physiol* 147:41-57
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008:420747
- Huynh Q, Borgmeyer J, Zobel J (1992) Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochem Biophys Res Commun* 182:1-5
- Imamura T, Yasuda M, Kusano H, Nakashita H, Ohno Y, Kamakura T, Taguchi S, Shimada H (2010) Acquired resistance to the rice blast in transgenic rice accumulating the antimicrobial peptide thanatin. *Transgenic Res* 19:415-424
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* 8:97-109

- Jain M, Nijhawan A, Arora R, Agarwal P, Ray S, Sharma P, Kapoor S, Tyagi AK, Khurana JP (2007) F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. *Plant Physiol* 143:1467-1483
- Johnson TC, Wada K, Buchanan BB, Holmgren A (1987) Reduction of purothionin by the wheat seed thioredoxin system. *Plant Physiol* 85:446-451
- Jose I, Amaya I, Castillejo C, Sanchez-Sevilla JF, Quesada MA, Botella MA, Valpuesta V (2006) The strawberry gene *FaGAST* affects plant growth through inhibition of cell elongation. *J Exp Bot* 10:2401-2411
- Kang SC, Park S, Lee DG (1999) Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 73:276-281
- Kim YJ, Hwang BK (1997) Isolation of a basic 34 kilodalton β -1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiol Mol Plant Pathol* 50:103-115
- Kotilainen M, Helariutta Y, Mehto M, Pollanen E, Albert VA, Elomaa P, Teeri TH (1999) GEG participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in *Gerbera hybrida*. *Plant Cell* 11:1093-1104
- Kramer KJ, Jones BL, Speirs RD, Klassen LW, Kammer AE (1979) Toxicity of purothionin and its homologues to the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). *Toxicol Appl Pharmacol* 48:179-183
- Lee TH, Kim YK, Pham TT, Song SI, Kim JK, Kang KY, An G, Jung KH, Galbraith DW, Kim M, Yoon UH, Nahm BH (2009) RiceArrayNet: a database for correlating gene expression from transcriptome profiling, and its application to the analysis of coexpressed genes in rice. *Plant Physiol* 151:16-33
- Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AK (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep* 29:419-436
- Mao Z, Zheng J, Wang Y, Chen G, Yang Y, Feng D, Xie B (2011) The new *CaSn* gene belonging to the snakin family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper. *Phytoparasitica* 39:151-164

- Marshall JJ, Lauda CM (1975) Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. J Biol Chem 250:8030-8037
- Melchers LS, Groot MAD, Knaap JA, Ponstein AS, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJ, Elzen PJ, Linthorst HJ (1994) A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. Plant J 5:469-480
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. J Biosci Bioeng 104:34-41
- Nielsen KK, Nielsen JE, Madrid SM, Mikkelsen JD (1997) Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. Plant Physiol 113:83-91
- Padovan L, Scocchi M, Tossi A (2010) Structural aspects of plant antimicrobial peptides. Curr Protein Pept Sci 11:210-219
- Pelegriani PB, Del Sarto RP, Silva ON, Franco OL, Grossi-de-Sa MF (2011) Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. Biochem Res Int 2011:250-349
- Ponz F, Paz-Ares J, Hernandez-Lucas C, Carbonero P, Garcia-Olmedo F (1983) Synthesis and processing of thionin precursors in developing endosperm from barley (*Hordeum vulgare* L.). EMBO J 2:1035-1040
- Powers JP, Hancock RE (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. J Peptides 24:1681-1691
- Prasad BD, Jha S, Chattoo BB (2008) Transgenic indica rice expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial protein (Mj-AMP2) shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Plant Sci 175:364-371
- Rahnamaeian M, Vilcinskas A (2012) Defense gene expression is potentiated in transgenic barley expressing antifungal peptide metchnikowin throughout powdery mildew challenge. J Plant Res 125:115-124

- Rezzonico E, Flury N, Meins FJ, Beffa R (1998) Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related b-1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures. *Plant Physiol* 117:585-592
- Rodriguez-Palenzuela P, Pintor-Toro JA, Carbonero P, Garcia-Olmedo F (1988) Nucleotide sequence and endosperm-specific expression of the structural gene for the toxin α -hordothionin in barley (*Hordeum vulgure* L.). *Gene* 70:271-281
- Samuelsson G, Pettersson B (1970) Separation of viscotoxins from the European mistletoe, *Viscum album* L. (Loranthaceae) by chromatography on sulfoethyl sephadex. *Acta Chem Scand* 24:2751-2756
- Sarkar NK, Kim YK, Grover A (2014) Coexpression network analysis associated with call of rice seedlings for encountering heat stress. *Plant Mol Biol* 84:125-143
- Schimoler-O'Rourke R, Richardson M, Selitrennikoff CP (2001) Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. *Appl Environ Microbiol* 67:2365-2366
- Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA (1995) Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267:1645-1648
- Schrader Fischer G, Apel K (1994) Organ-specific expression of highly divergent thionin variants that are distinct from the seed-specific crambin in the crucifer *Crambe abyssinica*. *Mol Gen Genet* 245:380-389
- Segura A, Madueno F, Molina A, Garcia-Olmedo F (1999) Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* 12:16-23
- Sharma HC, Ortiz R (2000) Transgenics, pest management, and the environment. *Curr Sci* 79:421-437
- Silverstein KAT, Moskal WA, Wu HC, Underwood BA, Graham MA, Town CD, VandenBosch KA (2007) Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J* 51:262-280
- Stec B (2006) Plant thionins - the structural perspective. *Cell Mol Life Sci* 63:1370-1385
- Tavares LS, Rettore JV, Freitas RM, Porto WF, do Nascimento Duque AP, de Lacorte Singulani J, Silva ON, de Lima Detoni M, Vasconcelos EG, Dias SC, de Oliveira Santos M (2012) Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. *Peptides* 37:294-300

- Terras FRG, Goderis IJ, Van Leuven F, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF (1992) In Vitro Antifungal Activity of a Radish (*Raphanus sativus* L.) Seed Protein Homologous to Nonspecific Lipid Transfer Proteins. *Plant Physiol* 100:1055-1058
- Van der Wel H, Loewe K (1972) Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur J Biochem* 31:221-225
- Watanabe T, Kanai R, Kawase T, Tanabe T, Mitsutomi M, Sakuda S, Miyashita K (1999) Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiol Immunol* 145:3353-3363
- Wei W, Chao W, Liu M, L., Xu-ri L, Guo-cheng H, Hua-min S, Zong-xiu S, Wen-zhen L, Ya-ping F (2011) Resistance of antimicrobial peptide gene transgenic rice to bacterial blight. *Rice Sci* 18:10-16
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Saito K (2008) Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene–metabolite correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:2160-2176





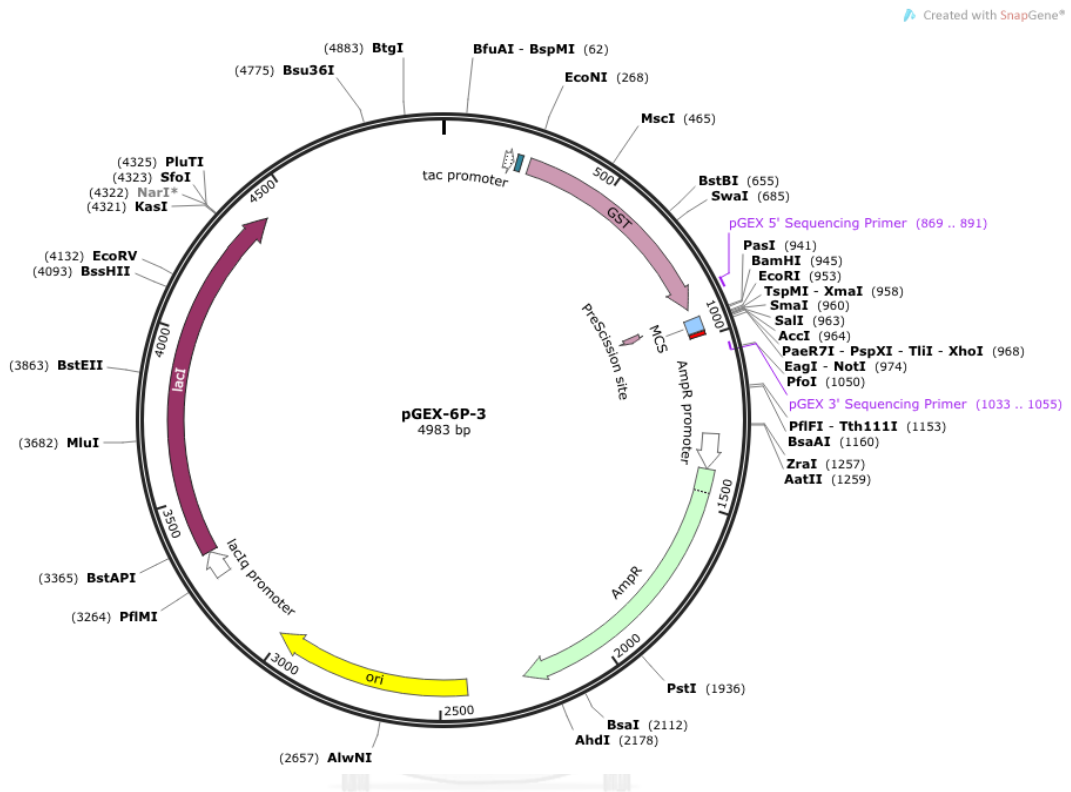
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

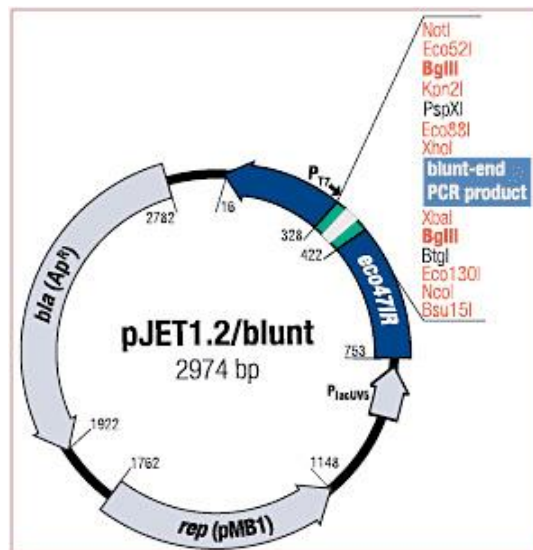
ภาคผนวก ก

Vector map

1. pGEX-6P3 vector (taken from <http://www.gelifesciences.com>)



2. pJET1.2/blunt (taken from www.lifetechnologies.com)



ภาคผนวก ข

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหาร Luria-Bertani Agar (LB)

- | | | |
|-----------------|----|---|
| - Tryptone | 10 | g |
| - Yeast extract | 5 | g |
| - NaCl | 5 | g |
| - ภู๋น | 15 | g |
- เติมน้ำให้ครบปริมาตร 1,000 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0

1.2 อาหาร Luria-Bertani Broth (LB)

- ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ Luria-Bertani Agar แต่ไม่เติมภู๋น

1.3 อาหาร Potato-Dextrose Agar (PDA)

- | | | |
|-------------------|-----|---|
| - มันฝรั่ง | 200 | g |
| - น้ำตาล Dextrose | 20 | g |
| - ภู๋น | 15 | g |

วิธีการเตรียม: นำมันฝรั่งปอกเปลือกกลางให้สะอาด หั่นให้เป็นชิ้นบาง ๆ นำไปต้มในน้ำกลั่นที่เดือดเป็นเวลา 20 นาที กรองเอากากออก เติมน้ำตาล Dextrose จากนั้นเติมน้ำ DI ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ครบปริมาตร 1,000 ml ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.0

2. การเตรียมยาปฏิชีวนะ

2.1 แอมพิซิลิน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่งแอมพิซิลิน 1 กรัม ละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 คลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่งคลอแรมเฟนิคอล 0.34 กรัม ละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.3 กานามัยซิน ความเข้มข้น 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่งกานามัยซิน 0.15 กรัม ละลายในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.4 เตตราไฮคลีน ความเข้มข้น 0.0125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- ชั่งเตตราไฮคลีน 0.125 กรัม ละลายในน้ำ DI ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลาย Yoshida (modified from Yoshida et al. (1976))

สารเคมี	ปริมาณ
NH ₄ NO ₃	9.14 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	4.03 g
K ₂ SO ₄	7.14 g
CaCl ₂	8.86 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	32.4 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	150 mg
(NH ₄) ₆ -Mo7O ₂₄ ·4H ₂ O	7.4 mg
H ₃ BO ₃	93.4 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3.5 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	3.1 mg
Fe FeCl ₃ ·6H ₂ O	770 mg
Citric acid (monohydrate)	1190 mg

วิธีการเตรียม: ชั่งสารเคมีตามตารางข้างต้น ปรับปริมาณสารเคมีแต่ละตัวด้วยน้ำ DI ให้เป็น 100 ml

หมายเหตุ: * ชั่งสารเคมี จากนั้นนำมาผสมกันในสารละลาย H₂SO₄ 5 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้เป็น 100 ml

4. การเตรียม competent cell แบบที่เรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

4.1 สารเคมี

100 mM CaCl₂

วิธีการเตรียม: ชั่งสาร CaCl₂ 6H₂O 295 mg ละลายในน้ำ DI ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร

80% Glycerol

วิธีการเตรียม: ตวง 100% Glycerol ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ DI ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร

4.2 ขั้นตอนการเตรียม competent cell

1. Subculture หรือ เชื้อเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α มาจาก stock ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อวัน LB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ
2. ทำหัวเชื้อเริ่มต้นโดยเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB 3 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาข้ามคืน (15-17 ชั่วโมง)
3. เพาะเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืน โดยดูดมา 0.5 ml ใส่ในอาหารเหลว LB 50 ml เลี้ยงที่ อุณหภูมิเดิม (ข้อ 2) จนเซลล์เจริญถึง log phase (ใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 2-4 ชม.) วัดค่า OD 600 ให้อยู่ในช่วง 0.4-0.6
4. เก็บเซลล์โดยแบ่งใส่หลอดที่แช่เย็นมาก่อน จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วน supernatant ที่ แช่เซลล์ในน้ำแข็ง
5. ละลายตะกอนเซลล์ ด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM CaCl₂ ที่เย็น ปริมาตร 50 ml แล้วตั้งไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นปั่นที่ 3000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วน supernatant ที่
6. เติม 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM CaCl₂ ที่เย็นปริมาตร 5 ml ค่อย ๆ ละลายตะกอนเซลล์ ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที
7. เติม 80% glycerol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
8. แบ่ง competent cell ใส่หลอด microtube ที่แช่เย็นแล้ว หลอดละ 200 ไมโครลิตร

9. แช่ใน -20 องศาเซลเซียส 1 คืน จากนั้นเก็บในตู้ -80 องศาเซลเซียส

5. การทรานสฟอร์มโดยวิธี Heat-shock

1. นำ competent cell (DH5 α) มาแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
2. จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์แล้ว ใส่ลงใน competent cell (DH5 α)
3. ป่มทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาป่ม ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที
4. ป่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
5. เติมหอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 μ l นำไปป่มและเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง
6. นำเชื้อมาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน 100 mg/ml ป่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15–17 ชั่วโมง
7. คัดเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและสกัดพลาสมิด เพื่อส่งหาลำดับเบสิคส์โอไทด์ต่อไป

6. การสกัด total RNA ด้วย Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

1. นำตัวอย่างพืชสดเป็นผงให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำตัวอย่างไปชั่งให้ได้ 100 mg ใส่หลอด microtube
2. เติมหสารละลาย RLC ปริมาตร 450 μ l ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จากนั้นดูดสารผสมที่ได้ใส่หลอด QIAshredder spin column (lilac) ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที
3. เติมหเอทานอล 96-100 % ปริมาตร 0.5 เท่า ผสมให้เข้ากันและถ่ายลงในหลอด Rneasy mini column (pink) ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วินาที ที่ังสารละลายที่ผ่านคอลัมน์
4. ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วินาที ที่ังสารละลายที่ผ่านคอลัมน์

5. นำคอลัมน์ใส่หลอด microtube ใหม่ จากนั้นล้างต่อด้วย RPE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วินาที 2 ครั้ง
6. ทำให้ Rneasy silica-gel membrane แห้งโดยปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที
7. ชะ RNA ซึ่งติดอยู่ที่ Rneasy silica-gel membrane ด้วยน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 30-50 μl ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลาย RNA

7. การสังเคราะห์ cDNA (iScript™ cDNA Synthesis Kit)

การเตรียมปฏิกิริยา

5X iScript reaction mix	4	μl
RNA template (1 μg)	X	μl
iScript reverse transcriptase	1	μl
เติมน้ำปราศจาก Nuclease ให้ได้ปริมาตร	20	μl

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา

บ่มที่อุณหภูมิ	25°C	เป็นเวลา 5 นาที
	42°C	เป็นเวลา 30 นาที
และ	85°C	เป็นเวลา 5 นาที

8. สารเคมีสำหรับ agarose gel electrophoresis

5X Loading buffer

- Bromophenol blue	10	mg
- Sucrose	1	g
- Gel Red	15	μl
- เติมน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร	5	ml

10X TBE buffer

- Tris-base	108	g
-------------	-----	---

- Boric acid 55 g
- 0.5 M EDTA (pH 8.0) 40 ml

9. การทำปฏิกิริยา PCR

การเตรียมปฏิกิริยา

5X Phusion [®] HF buffer	5	μl ความเข้มข้นสุดท้าย	1X
10 mM dNTPs	0.5	μl ความเข้มข้นสุดท้าย	0.2 mM
Template	1	μl	
10 μM forward primer	1	μl ความเข้มข้นสุดท้าย	0.4 μM
10 μM reverse primer	1	μl ความเข้มข้นสุดท้าย	0.4 μM
DNase free water	16.25	μl	
Phusion [®] High-Fidelity	0.25	μl	
DNA Polymerase (2U/μl)			
Total reaction volume	25	μl	

10. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

สารเคมี

A. Stock solution

2M Tris-HCl (pH 8.8)

- ชั่ง Tris-base 24.2 g
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 50 ml
- ปรับ pH ด้วย HCl ให้เป็น 8.8
- เติมน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 100 ml

1M Tris-HCl (pH 6.8)

- ชั่ง Tris-base 12.1 g
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 50 ml
- ปรับ pH ด้วย HCl ให้เป็น 6.8

- เติมน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 100 ml

10% SDS (w/v) 20 ml (store at room temperature)

- ชั่ง SDS 2 g
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 20 ml

50% Glycerol

- Glycerol 50 ml
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 50 ml

1% Bromophenol blue

- ชั่ง Bromophenol blue 100 mg
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 10 ml
- กรองผ่านกระดาษกรอง whatman paper no.1

B. Working solution

Solution A (30% (w/v) acrylamide and 0.8% (w/v) bis-acrylamide)

- ชั่ง Acrylamide 29.2 g
- ชั่ง Bis-acrylamide 0.8 g
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 100 ml

Solution B (4X separating gel buffer)

- 2M Tris – HCl (pH 8.8) 75 ml
- 10% SDS 4 ml
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 21 ml

Solution C (4X Stacking Gel Buffer)

- 1M Tris – HCl (pH 6.8) 50 ml
- 10% SDS 4 ml
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 46 ml

10% Ammonium persulfate

- ชั่ง Ammonium persulfate 0.5 g

- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 5 ml

Electrophoresis Buffer

- Tris 3 g
- Glycine 14.4 g
- SDS 1 g
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 500 ml
- ปรับ pH ให้เป็น 8.3
- เติมน้ำ DI ให้ได้ปริมาตร 1 L

5X Sample buffer

- 1M Tris-HCl 0.6 ml
- 50% Glycerol 5 ml
- 10% SDS 2 ml
- 2-mercaptoethanol 0.5 ml
- 1% Bromophenol blue 1 ml
- ละลายในน้ำ DI ปริมาตร 10 ml
- เก็บที่อุณหภูมิต่ำ -20°C

Staining solution

- Coomassie Brilliant Blue R250 0.5 g
- Methanol 225 ml
- Glacial acetic acid 225 ml
- เติมน้ำ DI ปริมาตร 50 ml

Destaining solution

- Methanol 100 ml
- Glacial acetic acid 100 ml
- เติมน้ำ DI ปริมาตร 800 ml

ภาคผนวก ค

ลำดับนิวคลีโอไทด์

1. ยีน *THION15* (LOC_Os06g32600) จำนวน 408 นิวคลีโอไทด์

>LOC_Os06g32600.1

ATGAAAGGTGTGAAGAGTTTGATCATGTGTGTGCTGGTGCTAGGCTTAGTCC
 TGCAGCAAGAGACGATCAAGGTGGGAGCAAAGAGCTGCTGCCCAACCACCAC
 GGCAAGAAACATCTATAATGCATGCCGTTTTGCGCATGGCACAAGGGAAAGA
 TGTTCTAAACTCTCTGGCTGTAAAATTGTTGATGGGAAATGCAAGCCACCTT
 ACATTCACCACACCCTTCACCCTGAGTCTGAGGAATTGGATGTACTIONTACTT
 CTGTATGCTGGGATGTACTIONTACTTCCCGTGTGCAGCAACATAAACACTTTTGCT
 GGCAACGAAGAAGGGAACGGTGCTGTGGAACGTTGCAACGAAGCATGCTACC
 ACTTCTGCAACAAGGAAGCTGATATTGTCACTATCGTTTCCTAA

2. ยีน *GASR3* (LOC_Os03g55290) จำนวน 283 นิวคลีโอไทด์

>LOC_Os03g55290.1

ATGAAGCTCAACACCACCACCACCCTGGCTCTCCTCCTGCTCCTGCTCCTGG
 CCTCCTCTTCCCTCCAAGTTTCCATGGCTGGGATCAGATTTCTGCGACGGCA
 AGTGCAAGGTGAGGTGCTCGAAGGCGAGCAGGCACGACGACTGCCTCAAGTA
 CTGCGGCGTGTGCTGCGCCTCCTGCAACTGCGTGCCGTCGGGGACGGCCGGC
 AACAAGGACGAGTGCCCTGCTACCGCGACATGACCACCGGCCATGGCGCTC
 GCAAGAGGCCCAAGTGCCCATGA

หมายเหตุ: สีเหลืองคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ signal peptide

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกฤษณา บุญญา เกิดเมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2532 ที่จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ใน หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 นำเสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง ฤทธิ์ทางชีวภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน GASR3 จากข้าว ใน งานประชุมวิชาการ “การศึกษาทางพันธุศาสตร์และจีโนมิกส์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ยุคใหม่ (Next Generation Sequencing for Genetic and Genomic Studies)” ระหว่างวันที่ 29 - 30 กรกฎาคม 2557 ณ โรงแรมวินเซอร์ สวีทส์ สุขุมวิท กรุงเทพฯ และนำเสนอผลงานทางวิชาการ เรื่อง The antimicrobial activity of recombinant rice thionin ในงานประชุมวิชาการ “the Thai Society for Biotechnology (TSB)” ระหว่างวันที่ 26 - 29 พฤศจิกายน 2557 ณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY