

# ปฏิบัติการบทที่ 5

## การส่งถ่ายยีนสู่พืช

### บทนำ

### Transformation

คือการใส่ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยตรง โดยเวกเตอร์นั้นต้องเป็นพลาสมิด และทำเซลล์ผู้รับให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอภายนอกก่อน อาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับเซลล์ที่เป็นผู้รับ ถ้าเป็นแบคทีเรีย เช่น *E. coli* ต้องทำให้เซลล์อยู่ในสภาพ competent cell โดยใช้สารบางชนิด เช่น  $\text{CaCl}_2$  หรือไอออนบวกอื่น ๆ แล้วนำไปผ่านกรรมวิธี heat shock ในกรณีที่เซลล์ผู้รับเป็นเซลล์พืชเทคนิคการถ่ายฝากยีนมีหลายวิธี เช่น การถ่ายฝากยีนโดยตรง การถ่ายฝากยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีด การถ่ายฝากยีนโดยใช้เครื่องยิง และการถ่ายฝากโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium*

### การส่งถ่ายยีนสู่พืช

คือ กระบวนการส่งถ่ายยีนที่เราสนใจเข้าสู่พืช ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นยีนจากพืชเสมอไป อาจเป็นยีนจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ก็ได้ เช่นอาจเป็นยีนจากแบคทีเรีย หรือเชื้อรา เป็นต้น ผลลัพธ์ที่ได้ทำให้มีการสอดแทรกของยีนเข้าไปในจีโนมของพืช ซึ่งการสอดแทรกนี้ต้องมีความเสถียร โดยสามารถผ่านขั้นตอนของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสและไมโอซิส ซึ่งพืชที่ได้รับยีนเข้าไปเรียกพืชแปลงพันธุกรรม

พาหะที่ใช้นำยีนเข้าสู่พืช

### พลาสมิด ( plasmid )

พลาสมิดเป็น DNA ที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด โครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มักมียีนซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ หรือสารที่มีประโยชน์กับ

แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น ทำให้มีความต้านทานต่อ antibiotic พลาสมิดที่ใช้เป็นพาหะอาจเป็น Ti plasmid ซึ่งพบใน *Agrobacterium tumefaciens* หรือ Ri plasmid ซึ่งพบใน *A. rhizogene*

ในการส่งถ่ายจีโนมที่สนใจเข้าสู่พืชนั้น ส่วนของจีโนมที่ส่งถ่ายไปต้องมีส่วนที่เรียกว่า โปรโมเตอร์ ( promotor ) อยู่ในส่วนของจีโนมนั้น ๆ ด้วย นอกจากนี้ยังต้องมีจีโนมเครื่องหมาย ( selectable marker ) และจีโนมรายงานผล ( reporter gene หรือ screenable marker ) อยู่ด้วย เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจสอบผลสำเร็จของการส่งถ่ายจีโนม

### **จีโนมรายงานผล หรือ reporter gene หรือ screenable marker**

จีโนมรายงานผลเป็นจีโนมที่กำหนดลักษณะบางอย่างที่ทำให้ทราบว่าส่วนของโปรโมเตอร์ที่ต่ออยู่กับจีโนมนั้น มีการแสดงออกหรือไม่และแสดงออกได้มากน้อยเพียงใดในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อส่วนใด ตัวอย่างเช่น gus ( beta-glucuronidase )

### **beta-glucuronidase ( gus ) gene**

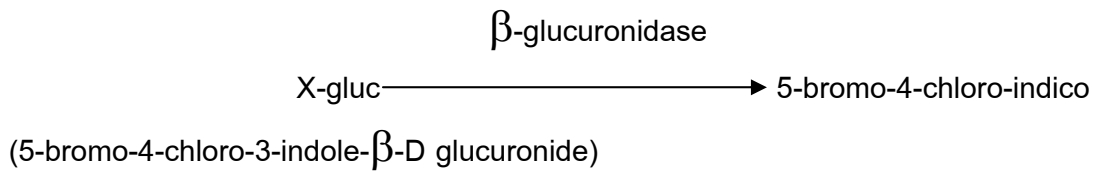
เป็นจีโนมจากแบคทีเรีย *E. coli* นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการศึกษาด้านชีวโมเลกุล เอนไซม์ beta-glucuronidase ทำหน้าที่อะซิลาซิโกลูโคไซด์ของ glucuronidase เนื่องจากมีการสันนิษฐานว่าไม่พบกิจกรรมของ intrinsic gus ในพืชชั้นสูง อันเป็นเหตุผลที่สำคัญที่ทำให้มีการใช้จีโนม gus เป็น reporter gene

การตรวจสอบผลการแสดงออกของจีโนม

หลังจากที่มีการส่งถ่ายจีโนมเข้าไปในพืชแล้วต้องมีการตรวจสอบพืชว่ามีการแสดงออกของจีโนมหรือไม่ อาจตรวจสอบได้โดย

### **gus assay**

การใช้จีโนม gus เป็นจีโนมรายงานผลนั้น gus gene จะเป็นตัวกำหนดการสร้าง เอนไซม์  $\beta$ -glucuronidase จะเปลี่ยน substrate ( X-gluc ) ที่เติมลงไป หรือสาร 5-bromo-4-chloro-3-indole- $\beta$ -D glucuronide ให้เป็นสารอินโดลิล ( indolyl derivatives ) ที่มีสีฟ้าของ 5-bromo-4-chloro-indico ดังสมการ



ดังนั้นถ้าเนื้อเยื่อพืชได้รับ DNA สายผสมไป ก็จะทำให้เนื้อเยื่อของพืชส่วนที่ได้รับ gus gene มีสีฟ้า

การส่งถ่ายจีนโดยใช้ *Agrobacterium*

***Agrobacterium*** เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิด aerobic bacteria ที่อาศัยอยู่ในดิน เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่ทำให้เกิดการส่งถ่ายจีนตามธรรมชาติหรือก่อให้เกิดพันธุวิศวกรรมตามธรรมชาติ จัดอยู่ใน Family Rhizobiaceae

*Agrobacterium* มี 4 ชนิด คือ

1. *Agrobacterium tumefaciens*
2. *A. rubi*
3. *A. rhizogenes*
4. *A. radiobacter* ซึ่งเป็น avirulent sp.

ชนิดที่สำคัญ คือ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งก่อให้เกิดโรค crown gall และ *A. rhizogenes* ซึ่งก่อให้เกิดโรค hairy root

ภายในเซลล์ *Agrobacterium* มี extrachromosomal plasmid ขนาดใหญ่ มีขนาดประมาณ 200 kb โดยพบว่ามี Ti ( tumor inducing ) plasmid ใน *Agrobacterium tumefaciens* และ Ri ( root inducing ) plasmid ใน *A. rhizogenes*

Ti plasmid ใน *Agrobacterium tumefaciens* เป็น DNA รูปวงแหวนอยู่นอกโครโมโซม Ti plasmid ที่พบมาก 2 ชนิด คือ ชนิดออกโทปีน ( octopine ) และโนปาลีน ( nopaline )

สารพวกออกโทปีน และโนपालีนเป็นสารโอปีนที่เซลล์พืชบริเวณที่ถูกบุกรุกด้วย *Agrobacterium* สร้างขึ้นได้ตามชนิดของพลาสมิด Ti พืชที่เป็นโรค crown-gall tumour จะผลิตสารโอปีนชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

### โอปีน ( Opine )

โอปีน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ *Agrobacterium* จะนำไปใช้ โอปีน แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. ออกโทปีน ( octopine) เป็น carboxyethyl derivative ของ อาร์จีนิน (arginine)
2. โนपालีน (nopaline) เป็น dicarboxypropyl derivative ของ อาร์จีนิน (arginine)
3. อะโกรปีน (agropine) เป็น bicyclic sugar derivative ของกรดกลูตามิก (glutamic acid)
4. อะโกรซินโอปีน (agrocino-pin) เป็นสารพวก phosphorylated sugar

### Ti plasmid

Ti plasmid ที่พบใน *Agrobacterium tumefaciens* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค crown-gall diseases

Ti plasmid จะมี 2 บริเวณที่มีความสำคัญต่อการส่งถ่ายจีนสู่พืช คือ

1. T-DNA ( transfer DNA )
2. Vir region ( virulence region )

### T – DNA

T-DNA ประกอบด้วย DNA ประมาณ 23 kb ขอบเขตของ DNA กำหนดโดย ลำดับเบสซ้ำ ( terminal repeat ) ประมาณ 25 bp อยู่สองข้างของ T-DNA ซึ่งเรียกว่า left border ( LB ) และ right border ( RB ) ดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าบน T-DNA มี รหัสสำหรับการสร้างเอนไซม์ ที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารโอปีน ฮอริโมนออกซิน และไซโทไคนิน

## Vir region

ส่วนสำคัญอีกส่วนหนึ่งที่ทำให้มีการส่ง T-DNA จาก *Agrobacterium* ไปยังพืช คือ ส่วนของ Vir region ซึ่งมีขนาดประมาณ 35-40 Kbp กลุ่มจีนนี้ประกอบด้วย จีน 6 ตำแหน่งคือ Vir A, Vir B, Vir C, Vir D, Vir G และ Vir E

## การส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืช

การส่งถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชเกิดขึ้นจากการทำงานของ virulence gene และ chv gene คือจีนที่อยู่บนโครโมโซมของ *Agrobacterium* โดยสามารถกระตุ้นการทำงานของ Vir region บน Ti plasmid ได้ด้วย specific wound substance ซึ่งเป็นสารพวก phenolic compounds เช่น acetosyringone และ alpha-hydroxy ดังแสดงในภาพที่ 6 ซึ่งปลดปล่อยออกจากบาดแผลของพืช

## กลไกการส่ง T-DNA สู่เซลล์พืช

กลไกการส่ง T-DNA เข้าไปในเซลล์พืชควบคุมโดยกลุ่มจีน Vir region ที่อยู่ใน Ti plasmid

ขั้นตอนแรกสุดที่ *Agrobacterium* จะบุกรุกเซลล์พืชได้ คือ *Agrobacterium* จะเข้าเกาะที่ตำแหน่งจำเพาะบนเซลล์พืช สารที่เป็นตัวรับรู้ ( receptor ) ของเซลล์พืชอยู่ที่ผนังเซลล์ซึ่งคาดกันว่าอาจจะเป็นคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน จากการศึกษาพบว่า บนโครโมโซมของ *Agrobacterium* มีจีนที่ควบคุมการเข้าเกาะกับเซลล์พืช คือ จีน chv เมื่อพืชมีบาดแผลจะหลั่งสารฟีนอลิก เช่น acetosyringone ( 4-acetyl 2, 6 dimethoxy phenol ) ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ vir gene มีการแสดงออก คือ มีการลอกรหัสและแปลรหัสออกมา โดยมีโปรตีนของ Vir A ทำหน้าที่เป็น chemoreceptor รับรู้สารประกอบของพืช Vir A มี hydrophobic region 2 ตำแหน่งอยู่ทางด้านปลายกรดอะมิโนซึ่งจะเกาะอยู่กับเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ ส่วนปลายคาร์บอกซิลอยู่ในไซโทพลาซึม และมีความสามารถเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าสู่โมเลกุลเองได้ ( autophosphorylating activity ) ดังแสดงในภาพ ที่ 6a จากนั้นโปรตีนที่สังเคราะห์ จาก Vir A จะกระตุ้น Vir G ซึ่งทำหน้าที่เป็น regulator component สันนิษฐานว่าทำหน้าที่กระตุ้นกระบวนการลอกรหัสใน

บริเวณ Vir region อื่น ๆ Vir D เกี่ยวข้องกับขั้นตอนแรก ในกระบวนการขนส่ง T-DNA Vir D1 มีคุณสมบัติ topoisomerase activity Vir D2 มีคุณสมบัติของ endonuclease activity ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ที่บริเวณ right border ( RB) และ left border ( LB) ของ T-DNA Vir C มีส่วนช่วย Vir D1 และ Vir D2 ซึ่งเท่ากับเป็นการส่งเสริมประสิทธิภาพในการส่ง T-strand ดังแสดงในภาพที่ 6b Vir D2 และ Vir E จะเข้าเกาะทางด้านปลาย 5' ของ T-strand ที่ถูกตัดแล้ว เพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์ในกลุ่ม exonuclease และ endonuclease มาย่อยสลาย T-strand ในระหว่างที่มีการขนส่งผ่านจาก *Agrobacterium* ไปยังเซลล์พืช และทำให้ T-strand อยู่ในรูปเส้นตรง มีข้อสันนิษฐานว่า Vir B กำหนดการสร้างโปรตีนที่ทำให้ผนังเซลล์ของ *Agrobacterium* มีลักษณะคล้ายกับกระบวนการ conjugation ของแบคทีเรีย แต่การขนส่ง T-strand ผ่านเซลล์พืชและเยื่อหุ้มนิวเคลียสของพืชรวมไปถึงการเข้าแทรกของ T-strand ในโครโมโซมพืช จะเหมือนกับการบุกรุกของไวรัส

## วิธีการศึกษา

ตัวอย่างพืชที่จะนำมาทำการส่งถ่ายจีนนี้เป็น callus ของต้นถั่วส่วนต่าง ๆ คือ shoot, cotyledon, epicotyl, hypocotyl และ leaf และจากต้นอ่อนของต้นถั่วส่วนต่าง ๆ คือ cotyledon, epicotyl, hypocotyl และ leaf โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ตัด callus จากส่วนต่าง ๆ ประมาณ 4-5 ชิ้น และตัดส่วนต่าง ๆ ของต้นอ่อนให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 4-5 ชิ้น และตัดส่วนต่าง ๆ ให้เกิดบาดแผล
2. เตรียม *Agrobacterium* โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มี antibiotic แล้วใส่ในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. นำ *Agrobacterium* 1 ml ไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,800 g เป็นเวลา 1 นาที ตูดเอาส่วนของเหลวทิ้ง ละลายนตะกอนแบคทีเรียด้วยอาหารเหลวสูตร MS 1 ml
4. ผสมสารละลาย *Agrobacterium* กับอาหารเหลวที่จะใช้เลี้ยงต้นถั่วให้ได้ความเข้มข้นประมาณ  $2 \times 10^7 - 3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร



