

การโคลนและวิเคราะห์ยีน *OsSKIPa* ของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105  
Cloning and Characterization of *OsSKIPa* gene from rice  
(*Oryza sativa* Linn. Var. KDML 105)

สุภาวดี ง้อเหรียญ<sup>1/</sup> พงศกร สรรค์วิทยากุล<sup>1/</sup> ภรณ์ สว่างศรี<sup>1/</sup>  
รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล<sup>1/</sup> ภูมรินทร์ วณิชชานานันท์<sup>1/</sup> ท้ายรัตน์ อุไรรงค์<sup>1/</sup>  
Suphawadee Ngorian<sup>1/</sup> Pongsacorn Sanvittayakul<sup>1/</sup> Paranee Sawangsri<sup>1/</sup>  
Rungnapha Pitaktansakul<sup>1/</sup> Phummarin Wanichananan<sup>1/</sup> Hathairat Urairong<sup>1/</sup>

---

**ABSTRACT**

*SKIPa* gene plays role as critical and necessary gene affecting cell viability and enhances cell's ability to survive from abiotic stress such as drought and salinity. This research study aimed to clone *OsSKIPa* gene from KDML 105 rice and to invent expression cassette for applying to plant variety improvement particularly against abiotic stress by gene transformation technique. The research was done at the Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Pathumthani Province during May – September 2011. In this study, full-length genomic DNA sequences of rice (*Oryza Sativa* Linn.) encoded to *OsSKIPa* was isolated from rice via PCR – based method. The gene sequence contains a fragment of 2,353 bp, including a 1,824 bp complete ORF, the 5'UTR of 130 bp, 3'UTR of 399 bp and a polyadenylation signal ATAAA motif. *OsSKIPa* gene can be encoded to 607 amino acids polypeptide with molecular weight of 81.2 kDa and has putative function as SKIP / SNW domain containing protein. The highly conserved region of the gene is SNW/SKI-interacting protein-like, SNW/SKI-interacting protein, transcript variant X1, transcript variant X2 and transcript variant X3 which are found in *Oryza sativa* L. (NM001054719.1), *Oryza brachyantha* (XM006649000.1) and *Brachypodium distachyon* L. (XM010237787.2, XM010237788.2, XM010237789.2) with 99, 94

---

<sup>1/</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

<sup>1/</sup> Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Thanyaburi district, Pathumthani province 12110

and 86% of homology, respectively. A 1,824 bp fragment of *OsSKIPa* gene was inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator. *NPTII* was used as a selectable marker in this selection. It was found that the total size of derived over-expression cassette (pCAMBIA2300 – *OsSKIPa*) was 11.5 kb.

**Key words :** *OsSKIPa* Gene, abiotic stress, cloning, characterization, plant expression vector, gene cassette

#### บทคัดย่อ

ยีน *SKIPa* มีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell viability) ทำให้เซลล์สามารถปรับตัวต่อสภาวะเครียดได้ดี ช่วยให้พืชดำรงชีวิตอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะแห้งแล้งและดินเค็ม เป็นต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีน *OsSKIPa* จากข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่มีลักษณะทนแล้งได้ดี และสร้างชุด cassette ยีน สำหรับนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ดำเนินการวิจัยที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพกรมวิชาการเกษตร จ. ปทุมธานี ระหว่างเดือนพฤษภาคม - เดือนกันยายน ปี พ.ศ. 2554 ทำการโคลนยีน *OsSKIPa* จากข้าว โดยออก

แบบไพรเมอร์ บริเวณที่มีความจำเพาะกับยีน *OsSKIPa* นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิก ดีเอ็นเอของข้าว ได้ยีนขนาด 2,353 คู่เบส มีส่วนของ Open Reading Frame (ORF) ความยาวเท่ากับ 1,824 คู่เบส, 5'UTR มีขนาด 130 คู่เบส, 3'UTR มีขนาด 399 คู่เบส และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งของ polyadenylation signal (ATAAA motif) สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 607 amino acid อยู่ในตำแหน่งโดเมนของ Putative Function: SKIP/SNW domain containing protein และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 81.2 กิโลดาลตัน นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน พบว่า ยีน *OsSKIPa* ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวมีส่วนประกอบครบทั้งยีนเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูง (% Max Identities) กับข้าว (*Oryza sativa* L.) ในกลุ่ม Japonica Group (NM001054719.1) ส่วนของ SNW/SKI-interacting protein-like ที่พบในข้าวป่า (*Oryza brachyantha*) (XM006649000.1) และส่วนของ SNW/SKI-interacting protein, transcript variantX1, transcript variantX2 และ transcript variantX3 ที่พบในพืชวงศ์หญ้า *Brachypodium distachyon* L. (XM010237787.2, XM010237788.2, XM010237789.2) มีค่าเท่ากับ 99% 94% และ 86% ตามลำดับทำการสร้างชุด cassette ยีน *OsSKIPa* โดยการเชื่อมต่อยีน *OsSKIPa* เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วย

โปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน nptII เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกได้พลาสมิดสายผสม (pCAMBIA2300 – OsSKIPa) ขนาด 11.5 กิโลเบส

**คำหลัก:** ยีน OsSKIPa, สภาวะเครียด, การโคลนยีน, การวิเคราะห์ยีน, เวกเตอร์, ชุด cassette ยีน

### คำนำ

พืชที่มีความทนทานมากเป็นพิเศษต่อลักษณะสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมย่อมสามารถเจริญเติบโตได้ดี และให้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้นคงที่ โดยปกติพืชทั่วไปสามารถพัฒนาลักษณะทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีของตัวเอง เพื่อให้มีชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้อต่อการเจริญเติบโตเหล่านี้ ซึ่งระดับความสามารถในการมีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตได้ของเซลล์ (Cell viability) เป็นสิ่งสำคัญสำหรับการอยู่รอดของพืช อย่างไรก็ตาม ยีนและระบบที่คอยควบคุมการเจริญเติบโตได้ของเซลล์ในพืชยังไม่เป็นที่รู้จัก คณะผู้วิจัยจึงได้ริเริ่มทำการศึกษาคอลนยีน OsSKIPa และสังเคราะห์โปรตีนที่ชื่อว่า SKIP เพราะมีรายงานว่า โปรตีน SKIP มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตได้ของเซลล์ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด โดยโปรตีน SKIP และโฮโมลอกส์ Bx42 ได้ถูกค้นพบใน *Drosophila* (Saumweber *et al.*, 1990) และระบุเอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค Two-hybrid screening (Dahl *et al.*, 1998)

โปรตีน SKIP ได้รับการระบุว่าเป็น Transcriptional coregulator และ Spliceosome component ในมนุษย์ (Figuroa and Hayman, 2004; Leong *et al.*, 2004) โฮโมลอกส์ทั้งหมดของ SKIP ที่ได้รับการวิจัย ประกอบด้วยโดเมน SKIP/SNW มี Signature เป็นรหัสเปปไทด์ S-N-W-K-N ซึ่งมีความสำคัญต่อหน้าที่พื้นฐานของโปรตีน เช่น เป็น Cofactor ใน Transcription และ Splicing (Folk *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามหน้าที่อื่นๆ ของโฮโมลอกส์ SKIP แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เช่น โฮโมลอกส์ Bx42 ใน *Drosophila melanogaster* มีหน้าที่ร่วมในส่วนของ ecdysone-stimulated transcription (Wieland *et al.*, 1992) และการถ่ายทอด Notch signal (Negeri *et al.*, 2002) นอกจากนี้โปรตีน SKIP ยังจำเป็นต่อการพัฒนาระบบประสาท (Ivanov *et al.*, 2004) และเนื้อเยื่ออื่นๆ อีกด้วย (Negeri *et al.*, 2002) ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โปรตีน PRP45 เป็นโปรตีนซึ่งประกอบด้วยโดเมน SNW/SKIP มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตได้ของเซลล์ (Albers *et al.*, 2003) โฮโมลอกส์ของ SKIP CeSKIP (Skp-1) ใน *Caenorhabditis elegans* ได้ถูกระบุว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญใน Transcription complexe ของ RNA Polymerase II และ *C. elegans* ไม่สามารถขาดโปรตีนตัวนี้ได้ในการดำรงชีวิตอยู่ (Kostrouchova *et al.*, 2002)

การสร้างพืชทนทานต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมในภาวะโลกร้อน โดยการโคลนยีน และกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนที่อยู่ในกลุ่ม

Osmolyte biosynthesis genes ของ Glycine Betaine, Proline, Polyamine, Mannitol และ Trehalose (Cherian *et al.*, 2006) เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมให้กับสภาวะการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศโลกในอนาคต สำหรับในพืชนั้น โสโมลลอสของ Ski-interacting protein (SKIP) ในข้าว (*Oryza sativa* L.) มีความเกี่ยวข้องกับ การเจริญเติบโตได้ของเซลล์ และการปรับตัวต่อ สภาวะเครียดในข้าว Xin *et al.*, (2009) นัก วิทยาศาสตร์ของจีนพบว่าการโคลนยีน *OsSKIPa* ที่ได้ผ่านการคัดแยกด้วยเทคนิคยีนชิป (Gene chip technology) ร่วมกับเทคนิคการถ่ายโอน ยีนจำนวนหลาย ๆ ครั้ง ในข้าวและทดสอบใน สภาวะที่แห้งแล้ง ต้นกล้าข้าวมีอัตราการรอด ชีวิตสูงเพิ่มขึ้นกว่า 80 % และมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 20 % ซึ่งสรุปได้ว่ายีน *OsSKIPa* สามารถ ควบคุมการแสดงออกของลักษณะทนทาน ต่อความแห้งแล้งของต้นข้าวได้เป็นอย่างดี ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการโคลนยีน *OsSKIPa* ของข้าวพันธุ์หอมมะลิ KDML 105 ที่ทนต่อ ความแห้งแล้ง เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการ พัฒนาพันธุ์ข้าวให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ เหมาะสมต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การโคลนยีน *OsSKIPa* จากข้าว

1.1 ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีน *OsSKIPa* ที่มีการแสดงออก

ทำการศึกษา และค้นหายีน *OsSKIPa* ที่มีรายงานในพืชชนิดต่าง ๆ จากฐานข้อมูล

GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) นำมา วิเคราะห์ ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่าง สูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบ ไพรเมอร์ สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *OsSKIPa* ได้ดังนี้คือ SKIP (forward) และ SKIP (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการ แสดงออกคือ SKIPXbal (forward) และ SKIPKpnl (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน *OsSKIPa* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) (Table 1)

1.2 การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัด ดีเอ็นเอ

คัดเลือกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีลักษณะทนแล้ง ได้แก่ พันธุ์หอมมะลิ KDML 105 (ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี) เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าว ในกระถาง นำไปอ่อนอายุประมาณ 15 วัน มาส กัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ จนได้ ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ นำไปวัดค่าความเข้มข้น ของดีเอ็นเอ (Optical Density : O.D.) โดยใช้ เครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 – 280 นาโนเมตร และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม เพื่อนำไปทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) ต่อไป

**Table 1** Primer name, Base sequence, Size of *OsSKIPa* gene, Melting temperature (Tm) and GC content of designing specific primers from Genbank on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Primer name	Base sequence ( 5' → 3' )	Size (bp)	Tm (°C)	GC content (%)
SKIP (forward)	ATC GCG TTG CCC AAA TAA TTA CAC GAA TCG AAC C	34	68.3 (55)	44.1
SKIP (reverse)	AGA ACT TGT GAA AAA ACA GAA CAC GGA ATT TAT ATG	36	63.5 (55)	30.6
SKIPXbal (forward)	CAC TCT AGA ATG GCG TCC CTC AAG GAG CTC CTC CCG ACG	39	77.3 (55)	61.5
SKIPKpnl (reverse)	CAC GGT ACC TCA ACG ACC TCT TTC AAA GTT AAT GCG GGA CC	41	73.7 (55)	51.2
NOS (forward)	GTT TGA ACG ATC GGG GAA ATT CGA GCT C	28	67.5 (55)	50.0
35SCaMV (reverse)	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30	70.1 (55)	53.3

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR amplification

นำดีเอ็นเอข้าวที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นยีนที่ต้องการด้วย โพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *OsSKIPa* คือ SKIP (forward) และ SKIP (reverse) โดยใช้ HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 M gene specific primer (forward), 0.4 M gene specific primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 94°ซ 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้

Denature 94°ซ 30 วินาที, Annealing 55°ซ 30 วินาที, Extension 70°ซ 2 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°ซ 10 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 1.5% เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) พร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)

1.4 การโคลนยีน *OsSKIPa* เข้าสู่เวกเตอร์และการตรวจสอบยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) ตามวิธีการ

ของบริษัทผู้ผลิตแนะนำ นำชิ้นดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  นำเชื้อไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) – ampicilin/X-gal/IPTG [(LB : เติรียม 1 ล. : 10 ก. NaCl, 10 ก. tryptone, 5 ก. yeast extract, 15 ก. bacto-agar, ddH<sub>2</sub>O), 50 ไมโครกรัม/มล. ampicilin, 100 ไมโครกรัม/มล. IPTG, 100 ไมโครกรัม/มล. X-gal] บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ นานข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายแทรกอยู่ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicilin (50 ไมโครกรัม/มล.) ที่อุณหภูมิ 37°ซ เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12 - 16 ชม. นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) ตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิตแนะนำ แล้วตรวจสอบคุณภาพของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 1.5% การตรวจสอบการปรากฏของยีน *OsSKIPa* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 - 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest buffer, 0.5U Fast Digest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°ซ

นาน 5 นาที แล้วตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 1.5%

1.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *OsSKIPa* มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5 – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3 และ M13 (reverse) 5 – GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3 ทำปฏิกิริยา cycle sequencing ด้วยเครื่อง Thermal Cycler 9700 นำผลผลิตที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ตากตะกอนให้แห้งในที่มืด แล้วละลายตะกอนด้วย HiDi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ใส่ตัวอย่างลงในหลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°ซ นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% Max Identity) และความต่างกับชนิดยีนเดียวกันของพืชที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank และการวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ClustalW Multiple Alignment จากเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> และโปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/>

## 2. การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ plant expression vector และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

### 2.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ plant expression vector

นำพลาสมิด pCAMBIA2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) ขนาด 9,648 คู่เบส มาใช้เป็น plant expression vector มียีน NPTII (kanamycin) เป็นยีนคัดเลือก และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *OsSKIPa* ที่ได้เพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออก โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *OsSKIPa* คือ SKIPXbaI (forward) และ SKIPKpnI (reverse) ที่เติมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI โดยใช้ HotStart Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 1.3) ได้ชิ้นยีนขนาด 1,841 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI ในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของยีน *OsSKIPa*/พลาสมิดดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ความเข้มข้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม, 1X FastDigest buffer, 1U FastDigest enzyme ปรับปริมาณให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (ข้อ 1.4) จะได้ชิ้นพลาสมิด pCAMBIA2300 และชิ้นยีน *OsSKIPa* โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็น

ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ KpnI นำชิ้นยีน *OsSKIPa* เชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) เพื่อสร้างพลาสมิดสายผสมที่สมบูรณ์ pCAMBIA2300-*OsSKIPa* มีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยวิธี heat shock (Sambrook *et al.*, 1989)

### 2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิค PCR

ตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 1.5% เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบการปรากฏของยีน ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMv (reverse) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค electrophoresis ใช้ agarose gel เข้มข้น 1.5% เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมทั้งภาพ

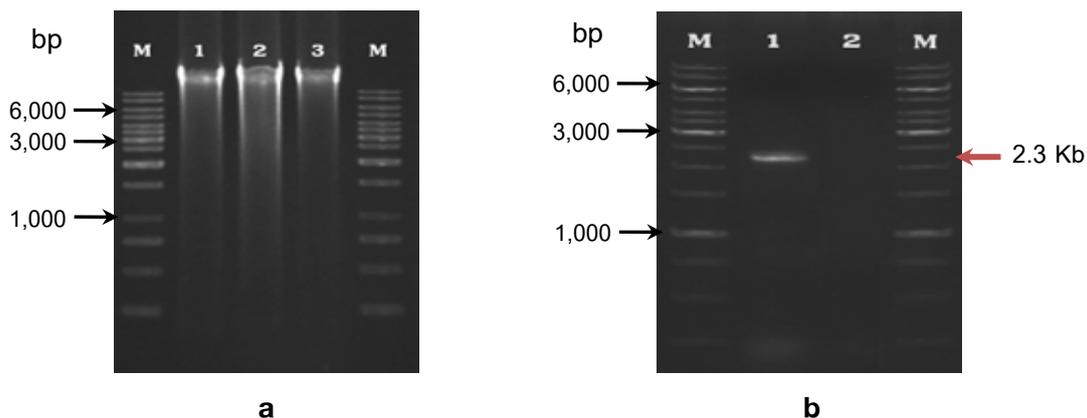
## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การโคลนยีน *OsSKIPa* จากข้าว

การเพิ่มปริมาณยีน *OsSKIPa* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากข้าว โดยการทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ KDML 105 (Figure 1a.) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาด 2.3 กิโลเบส (Figure 1b.) คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีนที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 2,353 คู่เบส ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (Open Reading Frame : ORF) จำนวน 1,824 คู่เบส อยู่ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 131 – 1954 สามารถแปลรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ของยีน *OsSKIPa* ได้จำนวนกรดอะมิโน 607 amino acid พบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (5' Untranslated region หรือ 5'UTR) มีขนาดเท่ากับ 130 คู่เบส และทางด้านปลาย 3' ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (3' Untranslated region หรือ 3'UTR) มีขนาดเท่ากับ 399 คู่เบส และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ polyadenylation signal ATAAA motif อยู่ในส่วนของ 3'UTR จำนวน 1 ตำแหน่ง อยู่หลังลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงการสิ้นสุดการถอดรหัส (Termination codon, TGA) ประมาณ 366 คู่เบส (Figure 2.) เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนบนฐานข้อมูล EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/)

[www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/)) พบว่า ยีน *OsSKIPa* ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าว มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ที่อยู่ในตำแหน่งโดเมนของ Putative Function : SKIP/SNW domain containing protein (Figure 3a. และ 3b.) และพบว่ายีน *OsSKIPa* ที่ได้มีลำดับเบสอยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 34,212 – 36,564 คู่เบส ซึ่งอยู่ในโครโมโซมแท่งที่ 2 ของข้าว (*Oryza sativa* Japonica group) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับข้าว (*Oryza sativa* L.) ในกลุ่ม Japonica Group (NM001054719.1) ส่วนของ SNW/SKI-interacting protein-like ที่พบในข้าว (*Oryza brachyantha*) (XM006649000.1) และส่วนของ SNW/SKI-interacting protein, transcript variantX1, transcript variantX2 และ transcript variantX3 ที่พบในพืชวงศ์หญ้า *Brachypodium distachyon* L. (XM010237787.2, XM010237788.2, XM010237789.2) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identity) เท่ากับ 99% 94% และ 86% ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลยีน *OsSKIPa* จากข้าวในส่วนที่มีการแสดงออกมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน *OsSKIPa* ในพืชชนิดต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treewiew/treeView.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treewiew/treeView.cgi)) พบว่า ยีน *OsSKIPa* ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มไบเลียงเดี่ยว (Monocots) คือ ข้าว (*Oryza sativa* L.) ในกลุ่ม Japonica Group



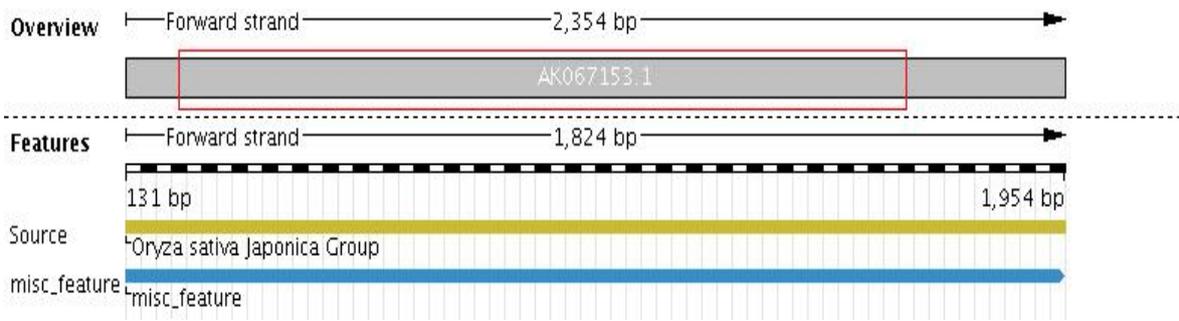
**Figure 1** a. Agarose gel electrophoresis result of genomic DNA from *Oryza sativa* “KDML 105”. Lane M = 1 kb DNA ladder, lane 1-3 = genomic DNA from *Oryza sativa* “KDML 105”  
 b. Agarose gel electrophoresis result of PCR product of *OsSKIPa* gene from *Oryza sativa* “KDML 105”. Lane M = 1 kb DNA ladder, lane 1 = PCR product, lane 2 = negative control.

```

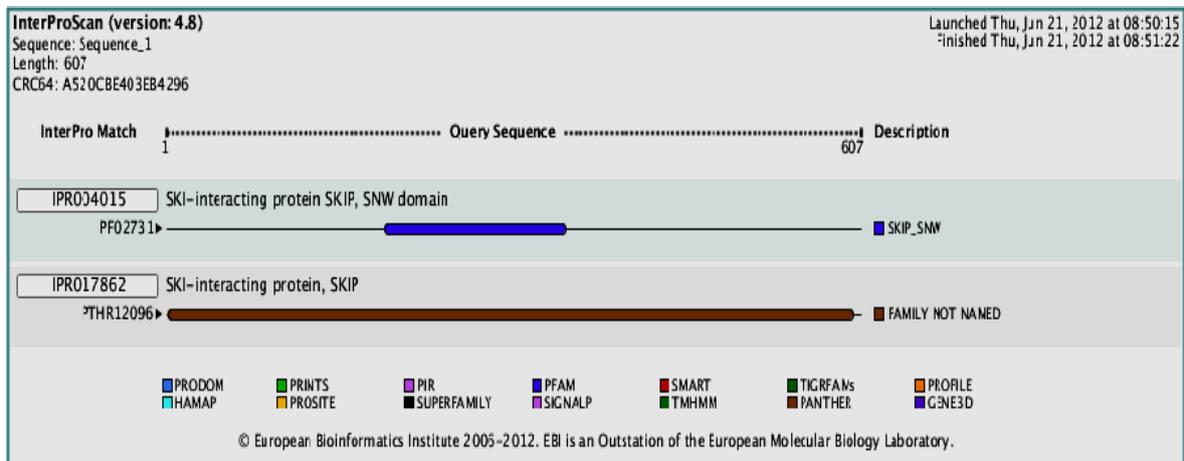
1   atcgggttgcccaataattcacgcaatcgcaaccccaaccatagctttccctctcgtatc
41  cagatccccaccgggagctcgcgggaacccatagccctagatccggcggcgttgccgc
121  cgtgtagaccctcgcctcccaaggagctccctccgacgccccagggcggcgttcgac
181  gttctagaccacagcgggacccctggttcaaggagcggatgaggcggagtcgggcga
241  ftydnhsgdppwfkeryyggesea
301  atccccgggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggggg
361  cgggaagcgtggcgggttcgcccggcggcgggaggaotcggggacggcggggccctt
361  gkrqfvrhrfedefgdguf
361  ccggagatccagctcggcagtaaccggctcgggatgggggggggggggggggggggg
421  pkihvaqyflumgrhndeekgg
421  ctcgagatccctcggctcaccgtcgacggcaaggcagcgtccctccagcccgctcgt
481  gaagcagatgagacgcctctaagatcgtttactcaagccacagcgcctcgtgccccaa
481  kqsrenaskiivyskrhsdlvfpk
541  gattccccgggtgattccggaggaacggggagggagggagggagggagggagggaggg
541  iatadseseatadddeeyqrqie
601  agaaccactgaagcaactaagctccttggaagaggttgtcaatgttcggctcctccg
661  etteatkaalekvnvrlsa
661  cgcacggcccaagatgtgccaagcctgatccagagtaaaagttaacagataagcc
661  aqprknvpthdsesekfikykp
721  atcgcaatcggcagcctcaattcagttcccaaggagggattatagggtgcaga
721  sqjannsdskewiimse
781  gatggctcaggtcctcttgagcccccgaattcaagcaaaagaggtgccccggcctc
781  maqdpllefpkfkhrvpraa
841  tggatccccgggtgattccggaggaacgggggggggggggggggggggggggggggg
841  gspfvfvymhspfpvtykdq
901  gcaagattggagattccaccatgcattcaaatggaaaatccaaagggttaccaccat
901  qdwrifpcisnmkvwkysyti
961  aacctcgcaagaggttggcagctgatggaaagggggctgcaggaggttcaaattaatg
961  fldkrlalaadgrglqevqind
1021  taacttggaaagctcttgaagcctgtatgtggggagagagggcagggagggaggt
1021  nfaaklsalvylvkaav
1081  acagatggatccaaggtgcagagggcgtgcagctgaaaggagagggagggagggagc
1081  qmrskvqrrelqlrkkelrkeq
1141  agagtaagggcacttgcacggagggcggcctggagagagatggtgccccactgcaac
1141  elrallaqkakhmerktgappap
1201  tacaggggttccctcgtggtggtgtagaggtgtgtgtagacagggaggaagatagga
1201  tgvplagsgkavdokrerdm
1261  ttggagcagcctcgtgagcaagggagggaggtagagagagagagagagagagagagat
1261  leqprerqhrhesreerearie
1321  gortgcaagattctgagggagggagcctgagggggagagagagagagagagagagagag
1321  kdririererkererkererleea
1381  cagggatgcccgaatgggcaagaagagtaagctcactagagacagggatcgtgatgtag
1381  rdaamgkkskltlrdrdrdvs
1441  tggagagatggcacttggcaaggaagcctgggggtgtaagaggtggggagagcctgta
1441  ekiallgmasttggaekggevmy
1501  tgaacagaggttgcacaacaggataaaggaatggagctcgggttgcctacagatgatca
1501  dqrlfnqdkgmdgfaatddq
1561  gtataacatctactccaagggctctctccagcggcagccaaagctatccacactttacag
1561  yniysrkglftaqptlslstlyr
1621  gortgaaggggggggtgattctgattggtatggagatgagatgaacactggagagaggt
1621  pkkkdgdssdvygdaddeqlkky
1681  tatgaagacagataggttcaaacagcaaaaggttttctggtgcttcagagaggtctgg
1681  mktdrfkfpdkgfrgasaerks
1741  aagagagagcagccttgggggttgaataaagggagggagagatgctccctcgttctgga
1741  krdrfpveefdkqeendpfgld
1801  tcagttctgactgaggtggaaggggagagagaggtctgagagagattggaagggaggg
1801  qpltevekkkkaavekigsgg
1861  agccatgagggcaggtggctcctcaatgagagatgattacaggggtggagagatctgg
1861  amrasggssmrddeyeggsg
1921  gaggctccagatctactttgagagaggtcgttgggggtatagatagatgctgttttggcca
1921  nsrinferngrhgggtatagatgctgttttggcca
1991  gaagttctccatgcattccaaatgttatctgggggggtattctgttgagcaatataaact
2041  ctctgtagagagacttgagctcggagctgctcaatgcaagctcaactccaaagggagat
2101  ctaagagagctgtaactgcttagactcctgtagatagctgctgctgcttactctctgtag
2161  ggatctgtagcttaactcaactcaactcaactcaactcaactcaactcaactcaactcaact
2221  agtctcgtgctcctcggctaccttaactttctggtactctgtaacaaagctcttaagatg
2281  actcggctaccggctggaactcctgagacccgggatacattgaaactccggctcctgctt
2341  ttcccaagttct

```

**Figure 2** Nucleotide and deduced amino acid sequence of *OsSKIPa* gene. The start (ATG) and stop (TAG) codons are highlighted. The red underline shows the polyadenylation signal ATAAA, the blue bold shows the SKIP/SNW protein domain with an S-N-W-K-N peptide signature



a



b

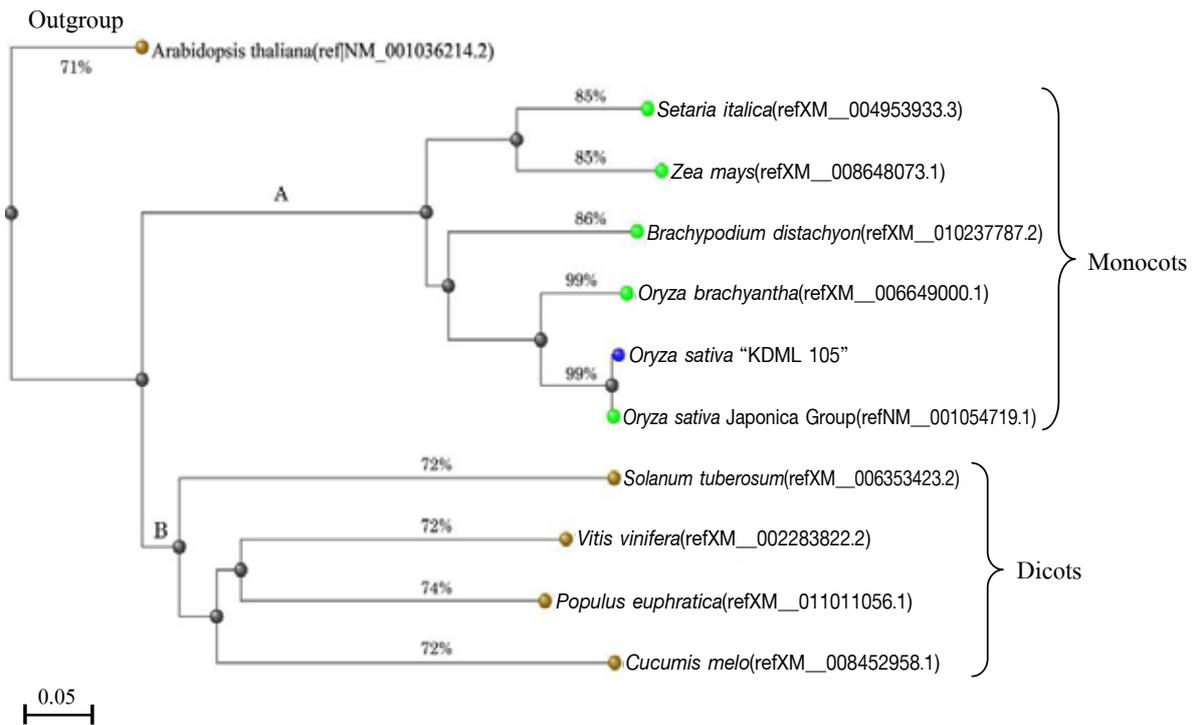
**Figure 3** a. Structure of *OsSKIPa* gene analyzed by EMBL-EBI database. The 2,353 bp fragment of *OsSKIPa* gene compared with rice *Oryza sativa* Japonica Group (AK067153.1) its shown above (red square). Coding sequence (CDS) is 1,824 bp (black and white stripes) and positioned of nucleotide between 131-1954

b. Structure of *OsSKIPa* gene analyzed by EMBL-EBI database InterProScan (version 4.8) SKI-interacting protein, SKIP encoding the 607 amino acid polypeptide (brown bar) and its components SKI-interacting protein SKIP, SNW domiain (blue bar)

ข้าวป่า (*Oryza brachyantha*) พืชวงศ์หญ้า (*Brachypodium distachyon* L.) ข้าวโพด (*Zea may* L.) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) มากกว่าพืชในกลุ่มไบเลียงคู่ (Dicots) (Figure 4)

## 2. การเชื่อมต่อน้ยีนเข้ากับ plant expression vector และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

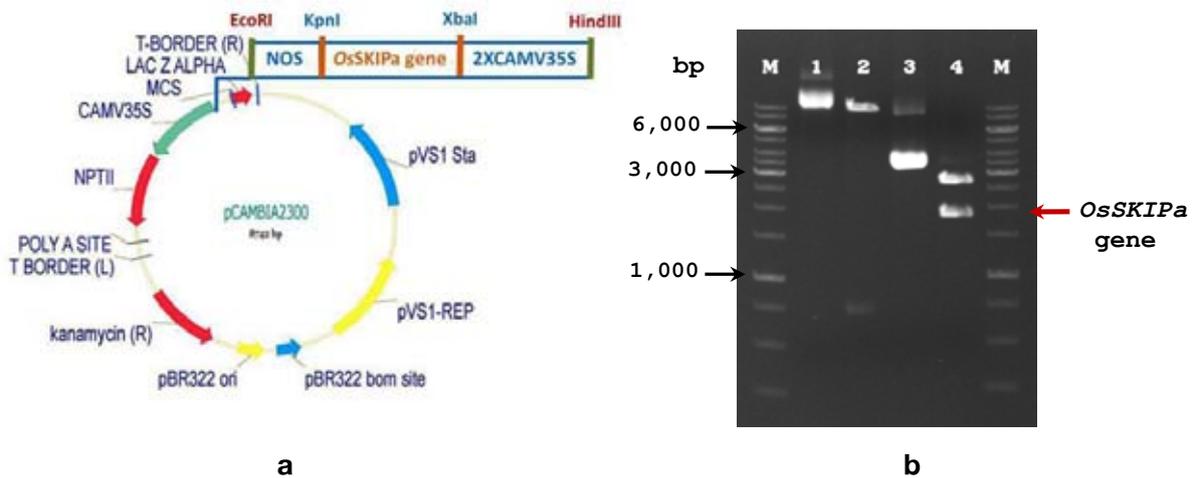
การเชื่อมต่อน้ยีน *OsSKIPa* ขนาด 1,824 คู่เบส เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ขนาด 9,648 คู่เบส (Figure 5a.) ที่ผ่านการทำ double digestion ด้วย



**Figure 4** Phylogenetic tree of *OsSKIPa* gene showing the relationship between the *Oryza Sativa* (L.) "KDML 105" and different plant species. The clades indicate monophyletic groups of monocots (A) and dicots (B).

เอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI (Figure 5b.) โดยที่ pCAMBIA2300 ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน neomycin phosphotransferase (nptII) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน *OsSKIPa* ซึ่งมี 2 วิธี วิธีแรกคือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ

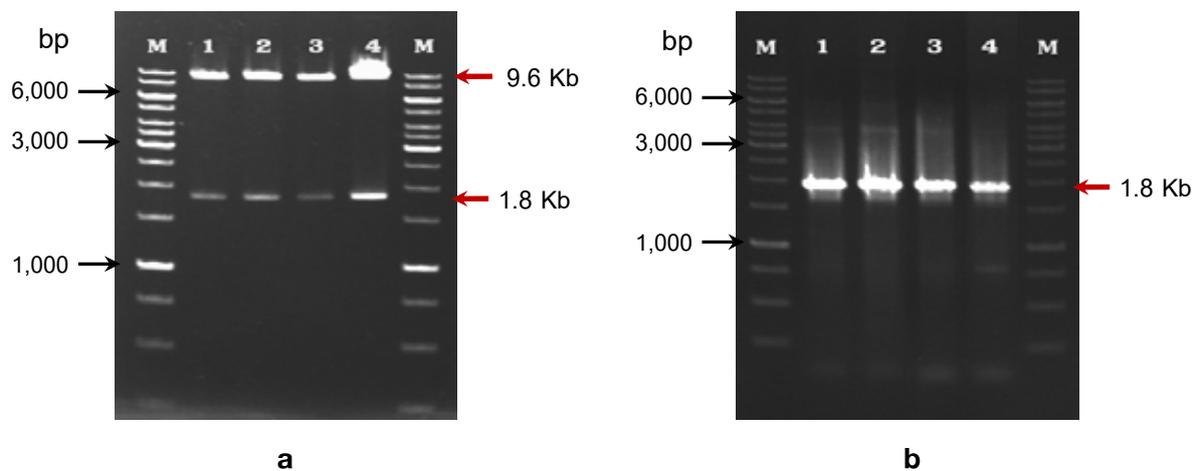
ได้แก่ ขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส (*OsSKIPa* gene) และขนาดประมาณ 9.6 กิโลเบส (pCAMBIA2300) (Figure 6a.) และวิธีที่สองคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน *OsSKIPa* ขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส (Figure 6b.) โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ (pCAMBIA2300 – *OsSKIPa*) จะมีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส (Figure 7)



**Figure 5** a. Map of plant expression vector (pCAMBIA2300) and position of the *OsSKIPa* gene in plant expression vector

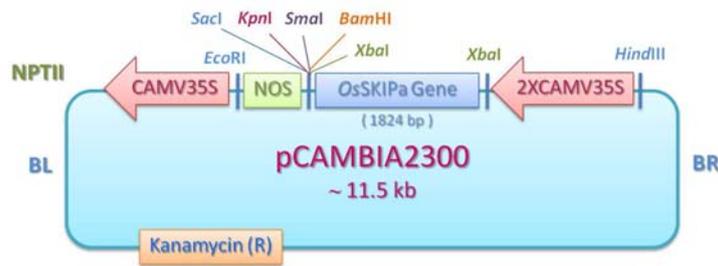
Modified from: <http://www.markergene.com/files/index/download/id/1420659084/>

b. DNA of a plant expression vector (pCAMBIA2300) and a *OsSKIPa* gene digested with specific enzyme XbaI and KpnI. Lane M = 1 kb ladder, lane 1 = Plasmid DNA of pCAMBIA2300, lane 2 = Plasmid DNA of pCAMBIA2300 digested with specific enzyme XbaI and KpnI, Lane 3 = Plasmid DNA of *OsSKIPa* gene, lane 4 = Plasmid DNA of *OsSKIPa* gene digested with specific enzyme XbaI and KpnI.



**Figure 6** a. Pattern of DNA derived from recombinant plasmid DNA (pCAMBIA2300 – *OsSKIPa*) digested with specific enzyme XbaI and KpnI. Lane M = 1 kb ladder, Lane 1-4 = pCAMBIA2300 – *OsSKIPa* clone 1-4

b. PCR analysis of plasmid DNA (pCAMBIA2300 – *OsSKIPa*) using specific primer NOS (forward) and 35SCaMV (reverse). Lane M = 1 kb ladder, lane 1-4 = pCAMBIA2300 – *OsSKIPa* clone 1-4



**Figure 7.** Structure of plasmid construct pCAMBIA2300 – OsSKIPa.

### สรุปผลการทดลอง

การโคลนยีน *OsSKIPa* จากจีโนมิก ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ KDML 105 พบว่า ยีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 2,353 คู่เบส โครงสร้างของยีน มีส่วนประกอบครบทั้งยีน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) จำนวน 1,824 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นลำดับเปปไทด์ของยีน *OsSKIPa* จำนวน 607 amino acid และยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *OsSKIPa* ที่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวคือ ข้าว (*Oryza sativa* L.) ในกลุ่ม Japonica Group ส่วนของ SNW/SKI-interacting protein-like ที่พบในข้าวป่า (*Oryza brachyantha*) และส่วนของ SNW/SKI-interacting protein, transcript variant X1, transcript variant X2 และ transcript variant X3 ในพืชวงศ์หญ้า (*Brachypodium distachyon* L.) โดยมีค่า % Max Identity เท่ากับ 99% 94% และ 86% ตามลำดับ

การสร้างพลาสมิดสายผสม โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน *OsSKIPa* ขนาด 1,824 คู่เบส เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300)

ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS พบว่า ได้พลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ pCAMBIA2300–*OsSKIPa* มีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส จำนวน 4 โคลน

ผลของงานวิจัยที่ได้ครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อโดยการนำยีน *OsSKIPa* ที่พัฒนาได้ ในรูปของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์ไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ เพื่อช่วยในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศในภาวะโลกร้อนต่อไปในอนาคต

### คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าว ดร.ศรีเมฆชาวโพงพาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา และอนุเคราะห์ plant expression vector (pCAMBIA2300) สำหรับใช้ในการทดลองวิจัย ขอขอบคุณ คุณศรีจิตรา กลั่นทกานนท์ และคุณสุทวัฒน์ สินธีร์โรจน์ ผู้ช่วยนักวิจัย สำหรับความช่วยเหลืองานวิจัยด้านต่างๆ

## เอกสารอ้างอิง

- Albers, M., A. Diment., M. Muraru., C.S. Russell and J.D. Beggs. 2003. Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA* 9: 138 – 150.
- Cherian, S., M.P. Reddy and R.B. Ferreira. 2006. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance : Progress and future prospects. *Biologia Plantarum*. 50(4): 481 – 495.
- Dahl, R., B. Wani and M.J. Hayman. 1998. The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of Drosophila Bx42. *Oncogene* 16: 1579 – 1586.
- Figuroa, J.D. and M.J. Hayman. 2004. Differential effects of the Ski-interacting protein (SKIP) on differentiation induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-2 in C2C12 cell. *Exp Cell Res* 296: 163 – 172.
- Folk, P., F. Puta and M. Skruzny. 2004. Transcriptional coregulator SNW/ SKIP: The concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci* 61: 629 – 640.
- Ivanov, A.I., A.C. Rovescalli., P. Pozzi., Y. Siuk., B. Mozer., H.P. Li., S.H. Yu., H. Higashida., V. Guo., M. Spencer and M. Nirenberg. 2004. Genes required for Drosophila nervous system development identified by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16216 – 16221.
- Kostrouchova, M., D. Housa., Z. Kostrouch., V. Saudek and J.E. Rall. 2002. SKIP is an indispensable factor for Caenorhabditis elegans development. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9254 – 9259.
- Leong, G.M., N. Subramaniam., L.L. Issa., J.B. Barry., T. Kino., P.H. Driggers., M.J. Hayman, J.A. Eisman and E.M. Gardiner. 2004. Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 1070 – 1076.
- Negeri, D., H. Eggert., R. Gienapp and H. Saumweber. 2002. Inducible RNA interference uncovers the Drosophila protein Bx4 as an essential nuclear cofactor involved in Notch signal transduction. *Mech Dev* 117: 151 – 162.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 545 p.
- Saumweber, H., M. Frasch and G. Korge. 1990. Two puff-specific proteins bind within the 2.5 kb upstream region of the *Drosophila melanogaster* Sgs-4 gene. *Chromosoma* 99: 52–60.
- Wieland, C., S. Mann., H. Von Besser and H. Saumweber. 1992. The *Drosophila* nuclear protein Bx42, which is found in many puffs on polytene chromosomes, is highly charged. *Chromosoma* 101: 517 – 525.
- Xin, H., K. Xie., J. Yao., Z. Qi and L. Xiong1. 2009. A homolog of human ski-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance. *PNAS*: 6410 – 6415.