Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 15-18 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 15-18 (2553)

การโคลนยีน *1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Synthase* ในกระบวนการสังเคราะห์เอทิลีน ของกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีน และการแสดงออก

Cloning of *1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Synthase* Gene Involved in Ethylene Synthase in *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer Orchid and Its Expression Study

นุกูล อ่อนนิ่ม[1], **ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์**[2] **และ พีระศักดิ์ ฉายประสาท**[1]
Nukul Onnim[1], Piyasak Chaumpluk[2] and Peerasak Chaiprasart[1]

Abstract

1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase is the key enzyme in the ethylene biosynthesis regulating flower senescence. The purpose of this study is to isolate the partial cDNA of *ACC synthase* gene from *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer flower by total mRNA extraction and cDNA synthesis through RT-PCR (Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction) using specific primers designed from a conserved region of *ACC synthase* from other orchid species. The resulting producs obtained from RT-PCR was a fragment of DNA, 247 nucleotide. Cloning and sequencing of the clones indicated the sequence similarity to *ACC synthase*. Further study of gene expression in *Paphiopedilum concolor* flower during 4 blooming stage and in every single part of this flower such as ovaries, dorsal sepal, ventral sepal, staminode, pouch, left petal and right petal revealed that *ACC synthase* gene expressed at all parts. The highest of gene expression could be detected 12 days after blooming. In addition, the gene expression was also found highest at a pouch, left petal and right petal. These results revealed the pattern of gene expression during flower development that could be used as basis for the control of gene expression in this ornamental plant in the near future.

Key word: ACC synthase, ethylene, *Paphiopedilum concolor*

บทคัดย่อ

1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase เป็นเอ็นไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เอทิลีน ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสภาพของดอก ได้โคลนชิ้นส่วนของยีนสร้างเอมไซม์ *ACC synthase* ของกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) โดยการสกัด mRNA และสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี RT-PCR (Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะที่ออกแบบจากส่วนอนุรักษ์ของยีน *ACC synthase* ในกล้วยไม้ชนิดอื่น ผลที่ได้จากการทำ RT-PCR ได้ชิ้นยีนขนาด 247 คู่เบส การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สอดคล้องกับยีน *ACC synthase* การศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในดอกกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีนที่ระยะดอก 4 ระยะในส่วนต่างๆ ของดอกได้แก่ รังไข่ กลีบนอกบน(หลังคา) กลีบนอกล่าง โล่ กระเป๋า กลีบดอกซ้าย และกลีบดอกขวา พบว่า ยีน *ACC synthase* มีการแสดงออกที่บริเวณรังไข่ กลีบนอกบน(หลังคา) กลีบนอกล่างและโล่ สูงสุดที่ระยะ 12 วันหลังดอกบานเต็มที่ และพบการแสดงออกมากที่ กระเป๋า กลีบดอกซ้าย และกลีบดอกขวา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า รูปแบบการแสดงออกของยีนขณะดอกพัฒนาเข้าสู่ระยะเสื่อมสภาพ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา และควบคุมการแสดงออกของยีนต่อไป

คำสำคัญ ACC synthase, เอทิลีน, กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

คำนำ

กล้วยไม้เป็นที่นิยมมากทั้งในประเทศและส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศมาเป็นระยะเวลานาน ในแต่ละปีมีการส่งออกดอกกล้วยไม้และกล้วยไม้กระถางในปริมาณมาก แต่ปัญหาที่พบได้บ่อยในการผลิตกล้วยไม้ส่งออกคือการลดลงของคุณภาพ

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000
[1] Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000
[2] ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
[2] Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

ดอกกล้วยไม้ โดยเฉพาะในแง่ของอายุการใช้งานที่สั้นลง ซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาระบบการผลิตกล้วยไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออก

ในขณะที่กล้วยไม้ส่งออกทั้งกระถางและกล้วยไม้ตัดดอก พบว่ามีฮอร์โมนบางชนิดในพืชยังสามารถทำหน้าที่และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในด้านต่างๆ ทั้งในด้านทางสรีระ ทางกายภาพ และทางชีวเคมี ภายในเนื้อเยื่อพืช การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อคุณภาพ และอายุการใช้งานของดอกกล้วยไม้ทั้งสิ้น (สายชล, 2531) ส่วนหนึ่งยังพบว่า การสร้างก๊าซเอทิลีน เมื่อดอกกล้วยไม้เริ่มบานและแก่ ก๊าซเอทิลีนจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ดอกเสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็วขึ้น (Nadeau et al., 1993) เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดอก และยืดอายุการใช้งาน ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการปรับปรุง อายุการใช้งานในกล้วยไม้ งานวิจัยนี้ ได้เสนอการโคลนยีนและศึกษายีนที่แสดงออกในกระบวนการสังเคราะห์เอทิลีน นั่นคือ ยีน *1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Synthase* ในกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีน ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่น่าจะมีความไวต่อเอทิลีนสูง ทั้งยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาพืชชนิดนี้มาก่อน ซึ่งการศึกษายีนที่เกี่ยวกับการแสดงออกดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการผลิตกล้วยไม้กระถางหรือกล้วยไม้ตัดดอกที่มีคุณภาพสูงด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การโคลนยีน การศึกษาลำดับเบส และการวิเคราะห์ข้อมูล

1.1 การแยกอาร์เอ็นเอ โดยแยกตามส่วนประกอบของดอกกล้วยไม้รองเท้านารี

ดอกกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) ที่พร้อมสกัดอาร์เอ็นเอ โดยนำดอกกล้วยไม้รองเท้านารีที่แบ่งออกเป็น 7 ส่วน ทำการบดตัวอย่างส่วนประกอบดอกประมาณ 100 mg ให้ละเอียดในสารละลาย Extraction buffer 2.5 ml (Krapp et al., 1993) สกัดอาร์เอ็นเอด้วย Phenol 2.5 ml ตามด้วยPhenol/Chloroform isoamylalcohol และ Chloroform isoamylalcohol จากนั้น ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเกลือโซเดียม อะซิเตท และเอทานอล เก็บแช่เย็นที่ - 20°C นาน 60 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 5 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอ และล้างด้วย 70% ethanol แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm 5 นาที ระเหยน้ำให้แห้ง ละลายตะกอนและเก็บตู้แช่ - 20°C

1.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอของดอกกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) ทั้ง 7 ส่วนที่แยกได้มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายแรก (cDNA) โดยใช้ Reverse Transcription Mix (Invitrogen, USA) โดยเติม Nuclease – Free Water 3.1 µl, 5X reaction Buffer 2 µl, DTT 0.2 µl, Rnase in Ribonuclease inhibitor(Promega, USA), 0.2 µl10 mM dNTP 1 µl, Primer R syn 1 µl, RNA Template 2 µl, Reverse Tranbscriptase enzyme 1 µl และเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี RT–PCR ดังได้กล่าวไว้ข้างต้น ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นำมาแยกขนาดด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis 1%

1.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ Master mix (Promega, USA) 5 µl, Nuclease – Free Water 3.5 µl, Primer mix 1 µl, cDNA 1 µl นำสารละลายที่ได้เพิ่มปริมาณยีน *ACC synthase* โดยใช้ไพรเมอร์ Fsyn สอดคล้องกับนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 700-724 และ Rvsyn สอดคล้องกับนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 927-950 ของกล้วยไม้หวายพันธุ์ Bom 17 (FM209430.1) ด้วยเครื่อง Gene Amp PCR system ด้วยเงื่อนไขของปฏิกิริยา denature ที่ 93 °C 40 วินาที annealing 55 °C 1 นาที และ extension 72 °C 1 นาที ทั้งหมด 40 รอบ นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธี Agarose gel electrophoresis 1% เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ ladder marker และบันทึกภาพบนเครื่อง UV transilluminator

1.4 การโคลนยีน

นำชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตจาก RT–PCR มาทำให้บริสุทธิ์ และนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T โดยเทคนิค TA cloning (Promega, USA) จากนั้น นำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ด้วยวิธี Heat shock

1.5 การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม

คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ppm ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ได้ ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis 1% ใช้วิธีนี้เมื่อได้โคโลนีจำนวนมากและนำโคโลนีที่

คาดว่ามีพลาสมิดสายผสมไปเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิดจากเซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Plasmid minipreparation (Sambrook et al., 1989)

2. การศึกษาการแสดงออกของยีน

2.1 การแยกอาร์เอ็นเอ โดยแยกตามส่วนประกอบของดอกกล้วยไม้รองเท้านารี

เตรียมต้นกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) ที่พร้อมให้ดอก ในช่วงอายุดอก 5, 7, 12 และ 15 วัน เพื่อศึกษาการแสดงออกของเอทิลีนแล้วนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ เช่นเดียวกับข้อ 1.1 โดยแยกส่วนของดอกกล้วยไม้รองเท้านารีออกเป็น 7 ส่วน คือ รังไข่ กลีบนอกบน (หลังคา) กลีบนอกล่าง เส้าเกสร กระเป๋า กลีบดอกซ้าย และกลีบดอกขวา

2.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอของดอกกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีน ที่แยกมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายแรกโดยใช้ Reverse Transcription Mix (Invitrogen, USA) เช่นเดียวกันกับ 1.2 โดยเติม Nuclease–Free Water 3.1 µl, 5X reaction Buffer 2 µl, DTT 0.2 µl, Rnase in Ribonuclease inhibitor 0.2 µl, 10 mM dNTP 1 µl, Primer Rvsyn 1 µl, RNA 2 µl, Reverse Tranbscriptase enzyme 1 µl, และเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี RT–PCR ดังได้กล่าวไว้ข้างต้น ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นำมาแยกขนาดด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis 1%

ผลการทดลอง

การศึกษาการโคลนชิ้นส่วนของยีนที่สร้างเอมไซม์ 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC synthase) ในกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์เหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) โดยการสกัด mRNA จากดอกกล้วยไม้รองเท้านารี ได้แบ่งดอกกล้วยไม้ออกเป็น 7 ส่วนด้วยกันคือ คือ รังไข่ กลีบนอกบน(หลังคา) กลีบนอกล่าง เส้าเกสร กระเป๋า กลีบดอกซ้าย และกลีบดอกขวา จากการบานของดอกใน 4 ช่วงอายุที่ 5, 7, 12 และ 15 วัน ตามลำดับ

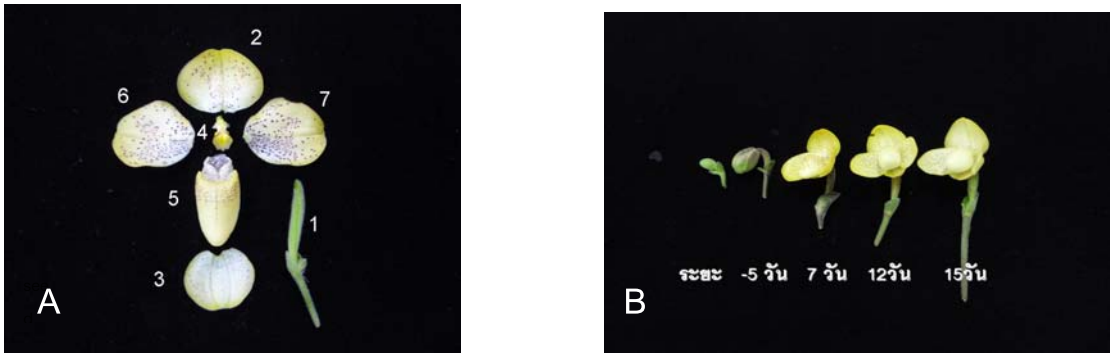

Figure 1 A: Structure of flower *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer

B: Flowering period of orchid *Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer

จากนั้น ทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยวิธี RT-PCR (Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction) ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะที่ออกแบบจากส่วนอนุรักษ์ของยีน *ACC synthase* ในกล้วยไม้ชนิดอื่น ผลที่ได้จากการทำ RT-PCR ได้ชิ้นยีนขนาด 247 คู่เบส การโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สอดคล้องกับยีน *ACC synthase* (ไม่แสดงผล) การศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ เปรียบเทียบกับยีน 18S rRNA ซึ่งเป็น house keeping gene ผลการทดลองพบว่า ในดอกกล้วยไม้รองเท้านารีสายพันธุ์เหลืองปราจีน ที่ระยะการบานของดอก 4 ระยะในส่วนต่างๆ ของดอก ได้แก่ รังไข่ กลีบนอกบน (หลังคา) กลีบนอกล่าง โล่ กระเป๋า กลีบดอกซ้าย และกลีบดอกขวา พบยีน *ACC synthase* มีการแสดงออกที่บริเวณรังไข่ กลีบนอกบน (หลังคา) กลีบนอกล่าง และโล่ สูงสุดที่ระยะ 12 วันหลังดอกบานเต็มที่ และพบการแสดงออกที่ กระเป๋า กลีบดอกซ้าย และกลีบดอกขวา

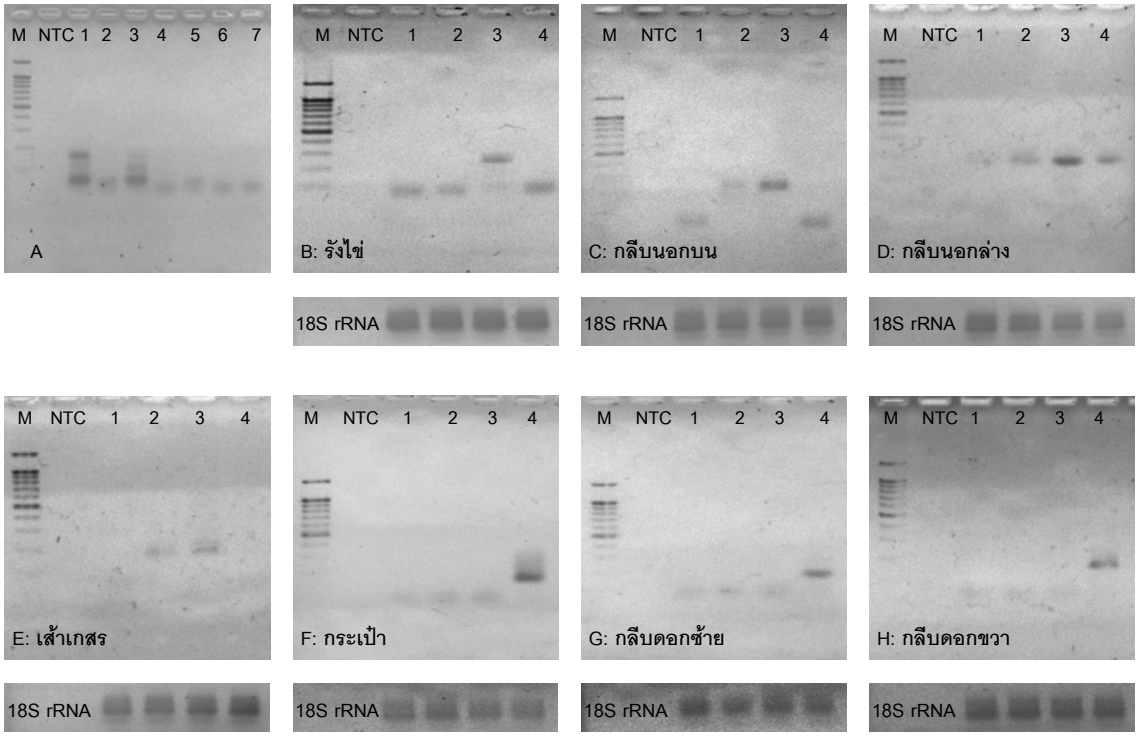

Figure 2 A: DNA amplification of ACC Synthase by RT-PCR techniques
B–H: DNA amplification of ACC Synthase by RT-PCR techniques, divided to 7 parts for during 4 bloomingstage period compare to 18S rRNA

สรุปและวิจารณ์

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ในการโคลนยีน *1-Aminocyclopropane-1-carboxylate* (*ACC synthase*) ของดอกกล้วยไม้รองนารีพันธุ์เหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) ด้วยวิธี RT-PCR ทำให้ได้ชิ้นส่วนของยีนและสายลำดับนิวคลีโอไทด์ การศึกษาการแสดงออก พบว่า ยีนดังกล่าวแสดงออกสูงสุดที่รังไข่ และกลีบดอกล่างที่ 12 วันหลังดอกบานเต็มที่ การแสดงออกของยีนในช่วง 7 วันแรกยังมีไม่มากนัก และการควบคุมการแสดงออกของยีน ACC *Synthase* ในช่วง 7 วันแรก ให้อยู่ในวงจำกัดอาจทำให้ช่วงระยะเวลาการเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้รองเท้านารีในสายพันธุ์นี้ลดลงได้ ดังนั้น รูปแบบการแสดงออกของยีน *ACC synthase* ขณะที่ดอกพัฒนาเข้าสู่ระยะเสื่อมสภาพสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา การควบคุมการแสดงออกของยีน และเพื่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สายชล เกตุษา. 2531. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวของดอกไม้. สารมวลชน, กรุงเทพฯ. 299 น.

Krapp, A., B. Hofmann, C. Schäfer and M Stitt. 1993 Regulation of the expression of rbcS and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink' regulation of photosynthesis? The Plant Journal 3, 817–828.

Nadeau, J.A, X.S. Zhang, H. Nair and S.D. O' Neill. 1993. Temporal and spatial regulation of 1- aminocyclopropane carboxylate oxidase in the pollination induced senescence of orchid flowers. Plant Physiol. 103 : 31-39.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring