Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 19-22 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 19-22 (2553)

การโคลนและการวิเคราะห์ลำดับเบสของบริเวณรหัสของยีน Polyphenol Oxidase ในผลสับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง

Cloning and Sequence Analysis of Polyphenol Oxidase-encoding Gene in Pineapple (*Ananas comosus* cv. Queen)

สุภาวดี ชนะพาล[1], **มนฑิณี กมลธรรม**[1] **และ อนวัช สุวรรณกุล**[1]
Supavadee Chanapan[1], Montinee Kamoltham[1] and Anawat Suwanagul[1]

Abstract

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and 5'-3' Rapid Amplification of cDNA End (5'-3' RACE) were employed to clone gene encoding polyphenol oxidase (PPO) in pineapple (*Ananas comosus* cv. Queen). After sequence analysis, the full-length *PPO* cDNA was 1,815 base pairs, translated for 604 amino acids polypeptide with a calculated molecular weight of 67,422.91 daltons. This PPO amino acid sequence showed the highest identity with 99%, 60%, and 56% to *A. comosus* cv. Smooth Cayenne (accession number AAO16863), *Camellia nitidissima* (accession number ACM43505), and *Juglans regia* (accession number ACN86310), respectively.

Key word: gene cloning, pineapple, polyphenol oxidase (PPO)

บทคัดย่อ

ทำการโคลนและหาลำดับเบสของบริเวณรหัสสำหรับโปรตีนที่สมบูรณ์ของยีนสำหรับเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO) ในผลสับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง โดยใช้เทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และ 5'-3' Rapid Amplification of cDNA End (5'-3' RACE) เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีนพบว่า ลำดับเบสที่สมบูรณ์ของยีน *PPO* มีความยาว 1,815 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 604 หน่วย (residue) และสามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 67,422.91 ดัลตัน ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ PPO มีความเหมือนกับ PPO ในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (accession number AAO16863) มากที่สุดที่ระดับ 99% รองลงมาคือ คาเมลเลีย (accession number ACM43505) และวอลนัท (accession number ACN86310) ที่ระดับ 60% และ 56% ตามลำดับ

คำสำคัญ polyphenol oxidase (PPO), ยีนโคลนนิ่ง, สับปะรด

คำนำ

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย มีมูลค่าการส่งออกปีละหลายพันล้านบาท สัดส่วนการส่งออกสับประรดของประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการแปรรูป สำหรับการส่งออกในรูปผลสดนั้นยังมีอยู่น้อยมาก ซึ่งข้อจำกัดในการส่งออกในรูปผลสดนั้น เนื่องจากปัญหาการเก็บรักษาระหว่างการขนส่งทางเรือที่ใช้ระยะเวลานาน และมีการเก็บรักษาสับปะรดที่อุณหภูมิต่ำ (10 -13°C) ก่อนการวางจำหน่าย จึงเกิดอาการไส้สีน้ำตาล (black heart หรือ internal browning (IB)) ซึ่งเป็นความผิดปกติทางสรีรวิทยาเกิดกับสับปะรดหลังการเก็บเกี่ยว สันนิษฐานว่าเกิดจากกระบวนการ polymerization ของ phenolic compounds จากเอนไซม์ Poly phenol oxidase (PPO) เป็นการสูญเสียคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยว และไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (ศิริพานิช และนุกูลประกิต, 2548; Stewart et al., 2001) การแก้ปัญหาอาการไส้สีน้ำตาลในสับปะรดสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งส่วนใหญ่ใช้ได้ผลกับสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Smooth Cayenne แต่ใช้ไม่ได้ผลในสับปะรดพันธุ์ภูเก็ตซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Queen ดังนั้นการส่งออกสับปะรดสดส่วนใหญ่จึงเป็นกลุ่ม Smooth Cayenne ขณะที่กลุ่ม Queen ก็เป็นที่นิยมของผู้บริโภคผลสดเช่นกัน มีการศึกษาสารประกอบต่างๆ ในสับปะรดเพื่อหาสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดความเสียหายที่แตกต่างกันในสับปะรดทั้งสองพันธุ์ แต่ก็ยังไม่สามารถระบุได้ จึงควรมีการศึกษาการใช้วิธีการใหม่ๆ เพื่อยับยั้งการเกิดอาการดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพ เทคโนโลยีชีวภาพเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะที่ต้องการ รวมทั้งการลดการเกิดอาการสีน้ำตาลในผลิตผลทางการเกษตร โดยการใช้วิธีการทางพันธุวิศวกรรม

[1] ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 35 หมู่ 3 เทคโนธานี ถ.เลียบคลองห้า ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120
[1] Department of Agricultural Technology, Thailand Institute of Scientific and Technological Research 35 Moo 3 Technopolis, Tambon Khlong 5, Amphoe Khlong Luang, Pathum Thani. 12120

โดยตรง หรือการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมาย ข้อมูลพื้นฐานในเรื่องของยีนและคุณลักษณะของยีนสำหรับเอนไซม์ PPO ในพืชชนิดต่างๆ ได้มีการศึกษาในประเทศที่พัฒนาแล้วมาเป็นเวลาหลายปี (Chevalier et al., 1999; Liao et al., 2006) สำหรับประเทศไทยข้อมูลทางด้านนี้มีอยู่อย่างจำกัดโดยเฉพาะในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศรวมทั้งในสับปะรด และจากทั้งสภาพภูมิประเทศและสายพันธุ์ที่ใช้ปลูกแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาในสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษายีนสำหรับเอนไซม์ PPO ในสับปะรดทั้งกลุ่ม Smooth Cayenne (ศรีราชา) และ Queen (ตราดสีทอง) ในการเสนอผลงานวิจัยครั้งนี้ นำเสนอที่ได้จากพันธุ์ตราดสีทอง โดยได้ทำการโคลนยีนดังกล่าวทั้งบริเวณกลางยีน ด้านปลาย 5' และ 3' และบริเวณรหัสของยีนที่สมบูรณ์ และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

นำตัวอย่างสับปะรดพันธุ์ตราดสีทองมาชักนำให้เกิดอาการไส้สีน้ำตาลโดยเก็บที่อุณหภูมิ 14°C 10 วัน แล้วนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C อีก 7 วัน จากนั้นนำผลสับปะรดมาผ่าตามยาว เพื่อสังเกตอาการไส้สีน้ำตาล (ภาพที่1A และ 1B) แล้วเก็บตัวอย่างเนื้อสับปะรดที่แสดงอาการดังกล่าวโดย ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกไว้ ห่อด้วย Aluminium foil แช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บที่ -80°C จนกว่าจะใช้สกัด RNA

สกัด RNA โดยการดัดแปลงจากวิธีของ Yu and Goh (2000) จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA บริเวณกลางยีนด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ template RNA 2 ไมโครกรัม ไพรเมอร์ที่ใช้ได้แก่ PPO:F: 5'-GCAGGCCAACGTCCACtgyrcntaytg-3' และ PPO:R: 5'-CGTGCACGAAGGAGccngcraaytc-3' ทำการสังเคราะห์ first strand โดยเติม template RNA ลงใน Ready-To-Go RT-PCR beads (Amersham Biosciences) ที่มี poly d(T)12-18 0.5 ไมโครกรัม นำสารละลายดังกล่าวบ่มที่ 42°C 30 นาที และที่ 94°C องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเติมไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีน จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวเข้าเครื่อง PCR (Ampliton II thermocycler, Thermolyn, USA) เพื่อทำการสังเคราะห์ยีน โดยใช้โปรแกรมสำหรับการสังเคราะห์ดังนี้ 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94°C องศาเซลเซียส 5 นาที, 35 รอบ ที่ 94°C 30 วินาที, 60°C 30 วินาที และ72°C 2:15 นาที และ 1 รอบ ที่ 72°C 10 นาที นำผลที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 1.2% agarose gel ทำการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ออกจาก agarose gel เพื่อสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Germany) เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T easy (Promega) จากนั้นทำการส่งถ่าย ดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock ทำการตรวจสอบโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จากนั้นคัดเลือกโคลนเพื่อหาลำดับเบส

ทำการสังเคราะห์ยีนด้านปลาย 5' และ 3' ด้วย SMART RACE cDNA Amplification kit (Clonetec) โดยไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ด้านปลาย 5' ได้แก่ 5'PPO1: 5'-AGGATGAAGGGTCCGTGTAGATAGA-3' และ 3'PPO1: 5'-GAAGATA AAGAGCAAGGTATCGACG-3' ทำการสังเคราะห์ยีนตามวิธีการในคู่มือ ตรวจสอบผลที่ได้ด้วย gel electrophoresis ใน 1.2% agarose gel ทำการโคลนยีนตามวิธีข้างต้น ตรวจสอบการมีดีเอ็นเอสายผสม และคัดเลือกโคลนเพื่อหาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้จากทั้งสามบริเวณมารวมกันเพื่อหาลำดับเบสที่สมบูรณ์ของยีน วิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ gorf/gorf.html) เมื่อผลยืนยันว่าเป็นของยีน PPO ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์บริเวณรหัสของยีนที่สมบูรณ์ ได้แก่ PPO1full(F): 5'-GCAGTGCCTGGTTTAGGTGTATTC-3' และPPO1full(R): 5'-TCTTCACAATATGCTCATCACTTGG-3' ตรวจสอบผลที่ได้ โคลนยีน และตรวจสอบลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

ผลและวิจารณ์

เมื่อทำการสังเคราะห์ cDNA ยีน *PPO* ในสับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง (*Ananas comosus* cv. Queen). บริเวณกลางยีน ด้านปลาย 5' และ 3' ด้วยเทคนิค RT-PCR, 5' RACE 3' RACE บริเวณรหัสของยีนที่สมบูรณ์ และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส 900 คู่เบส และ 800 คู่เบส ตามลำดับ หลังการโคลนยีน หาลำดับเบส นำลำดับเบสจากทั้งสามบริเวณรวมกัน และวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีนพบว่า ลำดับเบสมีความยาวทั้งหมด 2,119 คู่เบส เมื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับบริเวณรหัสของยีนที่สมบูรณ์ และสังเคราะห์ยีนดังกล่าว พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส (Fig.2) หลังการโคลนยีน หาลำดับเบส พบว่า ลำดับเบสของยีน PPO มีความยาวทั้งหมด 1,859 คู่เบส (Fig.3) บริเวณ ATG-start codon ถึง TGA-stop codon มีความยาว 1,815 คู่เบส และมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำตั้งแต่หกตำแหน่งขึ้นไปจำนวน 281 ชนิด เมื่อนำเบสของยีน PPO แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 604 หน่วย (residue) และ

สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 67,422.91 ดัลตัน เมื่อเปรียบเทียบลำดับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ PPO จากสับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง กับลำดับกรดอะมิโนในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST/Blast.cgi) พบว่ามีความเหมือนกับ ppo ในในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (accession number AAO16863) มากที่สุดที่ระดับ 99% รองลงมาคือ คาเมลเลีย (accession number ACM43505) และ วอลนัท (accession number ACN86310) ที่ระดับ 60% และ 56% ตามลำดับ ลำดับเบสของยีนที่ได้อยู่ในกระบวนการลงทะเบียน.ในฐานข้อมูล NCBI (bankit1251229 GQ458254)

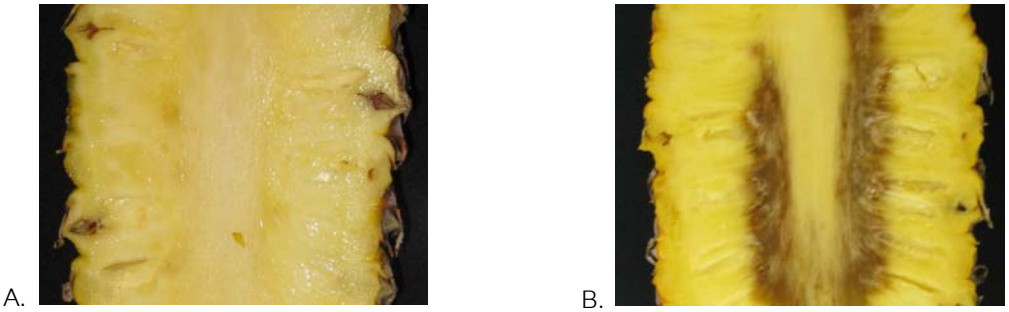

Figure1 Pineapple *Ananas comosus* cv. Queen. (A = control pineapple stored at 25°C 17 days, B = IB induced pineapple stored at 14°C 10 days and 25°C 7 days)

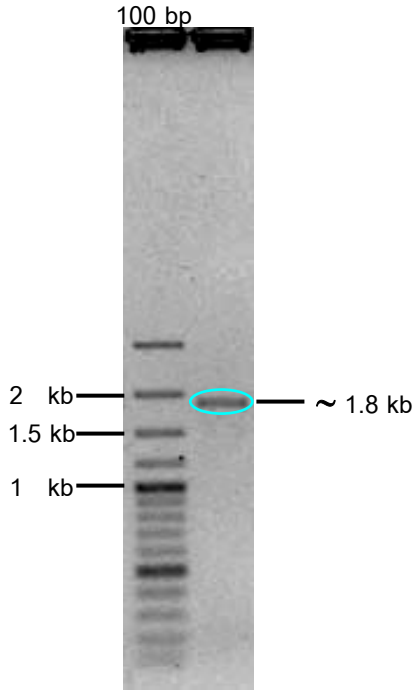

Figure 2 1.2% Agarose gel electrophoresis of amplification of PPO cDNA from *Ananas comosus* cv. Queen.

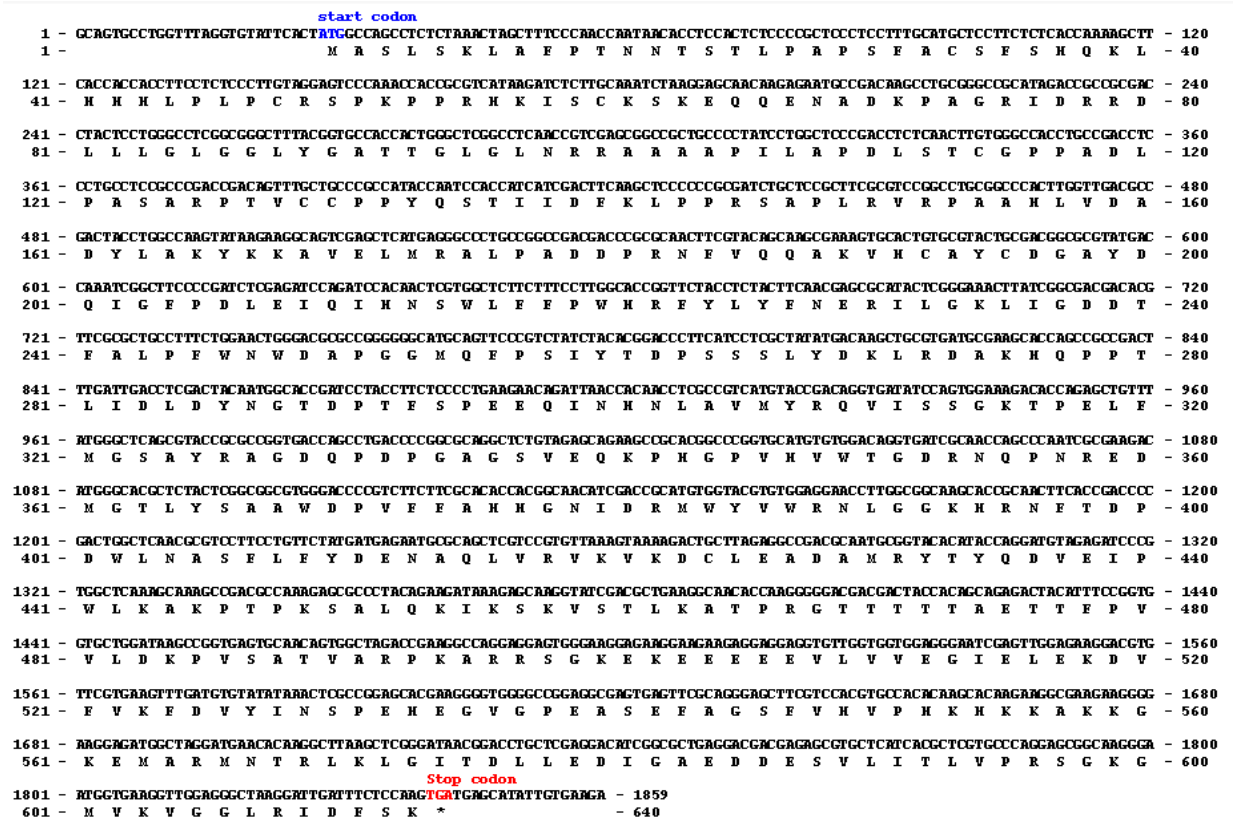

Figure 3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PPO* gene from *Ananas comosus* cv. Queen indicating ATG-start codon and TGA-stop codon.

สรุป

จากการศึกษาลำดับเบสของบริเวณรหัสของยีนสำหรับเอนไซม์ Polyphenol Oxidase ในสับปะรดพันธุ์ตราดสีทอง *Ananas comosus* cv. Queen พบว่าลำดับเบสของบริเวณรหัสของยีนที่ได้มีความยาว 1,815 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 604 หน่วย การศึกษาในลำดับต่อไป คือ การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการแก้ปัญหาอาการไส้สีน้ำตาลของสับปะรด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จริงแท้ ศิริพานิช และ อ้อมอรุณ นุกูลประกิต. 2548. อนุมูลเสรีและตัวต้านออกซิเดชันกับอาการไส้สีน้ำตาลในสับปะรด. Postharvest Newsletter. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก http://www.phtnet.org/newsletter/Issue12/research_of_the_ issue.asp.

Chevalier, T., D. de Rigal, D. Mbéguié-A-Mbéguié, F. Gauillard, F. Richard-Forget, and B. R. Fils-Lycaon. 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. Plant Physiology. 119:1261-1269.

Liao, Z., R. Chen, Y. Yang, Y. Fu, Q. Zhang and X. Lan. 2006. Molecular cloning and characterization of polyphenol oxidase gene from sweetpotato. Molecular biology. 40:1006-1012.

Stewart, RJ., BB. Sawyer, CS. Bucheli and SP. Robinson. 2001. Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. Australian journal of plant physiology. 28:181-191.

Yu, H. and C.J. Goh. 2000. Identification and Charaterization of three orchid MADS-Box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. Plant Physiology. 123:1325-1336.