

รหัสโครงการ: MRG4980042

ชื่อโครงการ: การวิเคราะห์หน้าที่ของยีนข้าวที่เกี่ยวข้องกับความเครียดเกลือโดยเทคนิค RNAi-Based Silencing

ชื่อนักวิจัย: ผศ.ดร. นูเดือน เมืองแสน

E-mail address: nooduan@sut.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2548 - 30 มิถุนายน 2550

เทคโนโลยี RNAi เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้รับคานิยมในการศึกษาหน้าที่ของยีนในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแปลงพลาสมิดให้บรรจุลำดับเบสซ้ำแบบย้อนกลับ (Inverted repeat sequences) ที่สามารถกระตุ้นกระบวนการ RNAi โดยไปยับยั้งการแสดงออกของยีนเพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดเกลือในข้าว ซีดีเอ็นเอโคลนจำนวน 4 จากทั้งหมด 11 โคลนที่ตอบสนองต่อความเครียดเกลือที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้แก่ โคลน 89, 162, 380.3 และ 380.5 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับซีดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล NCBI จากนั้นนำข้อมูลลำดับซีดีเอ็นเอรหัส CI081889.1, NM\_001065599.1, AP008207.1 และ NM\_001051327 เป็นตัวแทนของลำดับซีดีเอ็นเอโคลน 89, 162, 380.3 และ 380.5 ตามลำดับ ทำการออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะโดยกำหนดผลผลิตขนาดประมาณ 300 คู่เบส

ทำการคัดแปลงเวกเตอร์ให้อยู่ในรูปแบบ RNAi โดยเริ่มจากการโคลนชิ้นส่วนซีดีเอ็นเอของแต่ละโคลนที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา RT-PCR เข้าสู่พลาสมิด pENTR-TOPO/D พบว่า สามารถโคลนได้เฉพาะชิ้นส่วนซีดีเอ็นเอของโคลน 380.3 โดยมีขนาดถูกต้องและมีลำดับเบสครบสมบูรณ์ จากนั้นจึงทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนซีดีเอ็นเอของโคลน 380.3 ในพลาสมิด pENTR-TOPO/D เข้าสู่พลาสมิด pANDA เพื่อสร้างลำดับเบสซ้ำแบบย้อนกลับ ก่อนที่จะส่งถ่ายเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 โดยวิธี Electroporation ยืนยันผลการส่งถ่ายโดยใช้อาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและตรวจสอบขนาดและทิศทางการแทรกตัวของชิ้นดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำการส่งถ่ายยีนรูปแบบ RNAi เข้าสู่แคลลัสข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธี Agrobacterium-mediated transformation คัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการส่งถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร N6 คัดแปลงที่มีการเติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบแคลลัสที่สามารถเจริญได้บนอาหารคัดเลือกจำนวน 54 แคลลัส (19.01%) ยืนยันว่ามีแคลลัสที่รับเอา T-DNA จากพลาสมิด pANDA คัดแปลงซึ่งมียีน *hpt* เข้าสู่แคลลัสดังกล่าว และมีแคลลัสบางชิ้นที่สามารถชักนำให้เกิดต้นอ่อนได้ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังต้องทำการตรวจสอบว่ามีการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยกลไก RNAi ในข้าวแปลงพันธุ์จริงและการทดสอบความสามารถในการทนเค็มระหว่างข้าวปกติและข้าวแปลงพันธุ์ RNAi เพื่อศึกษาว่าโคลน 380.3 มีผลต่อกลไกการทนเค็มในข้าวอย่างไร

Project Code: MRG4980042

Project Title: RNAi-based silencing of salt stress-related genes in rice

Investigator: Asst. Prof. Dr. Nooduan Muangsan

E-mail Address: nooduan@sut.ac.th

Project Period: 1 July 2548 – 30 June 2550

RNAi technology is one of the most popular techniques to study gene function in plants and animals. This study focused on using RNAi technology for functional analysis of salt-stress responsive genes to understand the mechanism of salt-stress tolerance in rice. Four out of 11 salt-stress responsive cDNA clones from a previous report were selected and compared their sequences with the GenBank Database. Rice sequences accession no. CI081889.1, NM\_001065599.1, AP008207.1 and NM\_001051327 were selected as representatives for clone 89, 162, 380.3 and 380.5, respectively. Then primers specific to these clones were designed by Primer 3 program to obtain the PCR products, approximately 300 bp in size.

To determine the function of salt-stress responsive genes using RNAi technique, RNAi vector containing an Inverted Repeat (IR) sequence needed to be constructed. First, a cDNA fragment of each clones obtained by RT-PCR was cloned into pENTR-TOPO/D entry plasmid for amplification. The result showed that only a cDNA fragment of clone no. 380.3 has been inserted in pENTR-TOPO/D with the right size and in the correct sequence. The LR recombination reaction was then performed for subcloning sequences of cDNA clone no. 380.3 into pANDA destination vector to obtain an IR sequence before electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404.

*Agrobacterium*-mediated transformation was carried out using 3 weeks-old rice calli incubated with *A. tumefaciens* strain LBA4404 harboring a modified pANDA plasmid. Transformed calli were selected on modify N6 medium supplemented with 30 mg/l hygromycin. Fifty-four calli were able to grow on selective medium, 19.01%, indicating that these calli have accepted T-DNA region of the modify pANDA plasmid containing the *hpt* gene. In addition, a few calli were able to be induced into shoot. However, the examination of gene silencing to confirm the occurrence of RNAi phenomenon in the transgenic plants and salt stress test between non-transgenic and RNAi plants needs to be investigated in the future.