Ubon Rajathanee University

รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง

การตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *Chlamydomonas reinhardtii* โดยวิธี RAPD analysis

Identification of an DNA marker closely linked to the NAC1 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* by RAPD analysis

โดย

นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนันการวิจัยประจำปี 2542 จากสภาวิจัยแห่งชาติ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

คำนำ

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานผลงานวิจัยเรื่อง "การตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *Chlamydomonas reinhardtii* โดยวิธี RAPD analysis (Identification of an DNA marker closely linked to the NAC1 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* by RAPD analysis)" ซึ่งได้รับเงินทุนสนับสนันการวิจัยประจำปี 2542 จากสภาวิจัยแห่งชาติ งานวิจัยดังกล่าวนี้ได้ดำเนินการโดยมี นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ เป็นหัวหน้าโครงการ และมี นางปาริชาติ พุ่มขจร เป็นผู้ร่วมโครงการ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติ และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่สนับสนุนให้งานวิจัยดังกล่าวดำเนินไปด้วยดีตลอดโครงการ

(นายพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ)

หัวหน้าโครงการ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
การตรวจเอกสาร	5
วัสดุและวิธีการทดลอง	14
ผลการทดลอง	18
วิจารณ์ผลการทดลอง	25
สรุปผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	32

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของคลอโรพลาสต์	5
2	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของ photosystem II	7
3	*Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18	10
4	ผลผลิต PCR (PCR products) เมื่อใช้ OPC7 และ OPB3 เป็น primer	22
5	ผลผลิต PCR (PCR products) เมื่อใช้ OPC18 เป็น primer	23
6	ผลผลิต PCR (PCR products) เมื่อใช้ OPB1 เป็น primer	24
7	ผลผลิต PCR เมื่อใช้ random primer ที่สามารถจับกับยีนที่สนใจ ซึ่งเป็นยีนปกติได้ แต่ไม่สามารถจับกับยีนที่สนใจ ซึ่งเป็นยีนที่มีมิวเทชั่นได้	28

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทคัดย่อ

ยีน NAC1 ของ *Chlamydomonas reinhardtii* เป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียส แต่ถูกพบว่ามีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน *psbD* ของ *Chlamydomonas reinhardtii* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ และเป็นยีนสำหรับโปรตีน D2 ของ photosystem II ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* โดยวิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis ซึ่งโปรแกรม PCR (polymerase chain reaction) ที่ใช้ในการทำ RAPD analysis คือ 94°C เป็นเวลา 1 นาที (denaturing step) ตามด้วย 35°C เป็นเวลา 1 นาที (annealing step) และ 72°C เป็นเวลา 2 นาที (extension step) ตามลำดับ โดยทำซ้ำทุกขั้นตอน 45 รอบ และใช้ random primers จำนวน 40 ตัว คือ OPB1-OPB20 และ OPC1-OPC20 ในการศึกษานี้พบ DNA markers 2 ตัวที่อยู่ห่างจากยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* น้อยกว่า 1 map unit ซึ่ง DNA markers ทั้งสองตัวนี้สามารถถูกนำไปใช้ในการตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ต่อไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

บทนำ

photosystem II (PSII) เป็นกลุ่มโปรตีนหนึ่งในลูกโซ่ถ่ายทอดอิเลคตรอน (electron transport chain) ที่พบที่เยื่อไธลาคอยด์ (thylakoid membrane) ของคลอโรพลาสต์ (choroplast) PSII ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดทั้งที่ถูกสร้างมาจากยีนในนิวเคลียส (nuclear gene) และยีนในคลอโรพลาสต์ (chloroplast gene) ตัวอย่างของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ PSII และถูกสร้างมาจากยีนในนิวเคลียส ได้แก่ โปรตีน light harvesting complex (LHC) โปรตีน oxygen evolving enhancer 1 (OEE1) โปรตีน oxygen evolving enhancer 2 (OEE2) และ โปรตีน oxygen evolving enhancer 3 (OEE3) ส่วนตัวอย่างของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ PSII และถูกสร้างมาจากยีนในคลอโรพลาสต์ ได้แก่ โปรตีน D1 โปรตีน D2 โปรตีน cytochrome b559 โปรตีน P5 โปรตีน P6 และโปรตีนขนาดเล็ก ๆ จำนวนมาก (Rochaix 1992)

ถึงแม้ว่าโปรตีน D2 ของ PSII จะถูกสร้างมาจากยีน *psbD* ซึ่งเป็นยีนในคลอโรพลาสต์ แต่การสร้างโปรตีนดังกล่าวก็ต้องอาศัยยีนในนิวเคลียส มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านรายงานว่าการสร้างโปรตีน D2 ของ PSII จะผิดปกติไป ถ้ามีมิวเทชั่น (mutation) เกิดขึ้นที่ยีนบางยีนในนิวเคลียส (Kuchka และคณะ 1989, Kuchka และคณะ 1988) ตัวอย่างเช่น ในมิวแตนท์ (mutant) ของสาหร่าย *Chlamydomonas reinhardtii* ที่มีชื่อว่า nac1-18 จะมีมิวเทชั่นเกิดขึ้นที่ยีน NAC1 ซึ่งเป็นยีนในนิวเคลียส มิวเทชั่นดังกล่าวจะทำให้ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ไม่สามารถสร้างโปรตีน D2 ของ PSII ได้ (Wu และ Kuchka 1995) การขาดโปรตีน D2 ของ PSII ใน *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ทำให้ PS II ไม่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างเป็นปกติ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และต้องการอะซิเตท (acetate) เพื่อใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนของเซลล์ ดังนั้นฟีโนไทป์ (phenotype) ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์นี้จึงเป็น acetate-requiring phenotype จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีผู้ใดค้นพบยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ดังนั้นจึงยังไม่มีผู้ใดทราบอย่างแน่ชัดว่ายีนดังกล่าวไปเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน D2 ของ PSII ได้อย่างไร

เนื่องจากการตรวจหายีนโดยวิธีการตรวจหายีนทั่วไป (conventional cloning method) มักจะใช้ DNA หรือ RNA ที่มีเบสคู่สม (complementary) กับยีนที่สนใจ หรือใช้ antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีนที่สนใจเป็นตัวตรวจหา (probe) แต่เนื่องจากยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* เป็นยีนที่ยังไม่ทราบลำดับเบส และ ยังไม่ทราบว่าเป็นยีนสำหรับโปรตีนใด ดังนั้นการตรวจหายีนดังกล่าวจึงไม่สามารถใช้วิธีการตรวจหายีนทั่วไปได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับการตรวจหายีนที่มีลักษณะคล้าย ๆ กับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* (คือเป็นยีนที่ยังไม่ทราบลำดับเบส และ ยังไม่ทราบว่าเป็นยีนสำหรับโปรตีนใด) โดยยีนเหล่านี้สามารถถูกตรวจหาได้โดยวิธีที่เรียกว่า positional cloning (Leung และคณะ 1994, Mayer และคณะ 1994, Mindrinos และคณะ 1994, Martin และคณะ 1993, Arondel และคณะ 1992, Giraudat และคณะ 1992) ซึ่งหลักการของการหายีนโดยวิธีนี้ คือ จะต้องหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิด (closely linked) กับยีนที่สนใจก่อน จากนั้นจึงใช้วิธี chromosome walking เพื่อตรวจหายีนที่สนใจโดยตั้งต้นจาก DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนนั้น จากรายงานดังกล่าวทำให้มีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะสามารถตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* โดยวิธี positional cloning ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* โดยวิธี RAPD analysis ซึ่งวิธีนี้ได้เคยถูกนำไปใช้อย่างได้ผลในการตรวจหา DNA

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนต่าง ๆ ของพืช สัตว์ และ มนุษย์ (Mahenthiralingam และคณะ 1997, Demeke และคณะ 1996, kutcher และคณะ 1996, Nagaraja และ Nagaraja 1996, Hunt และ Page 1994, Barua และคณะ 1993, Churchill และคณะ 1993, Remmers และคณะ 1993, Yu และ Paul 1993, Martins และคณะ 1991, Paran และคณะ 1991, William และคณะ 1990) DNA marker ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถที่จะนำไปใช้ในการตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ต่อไป

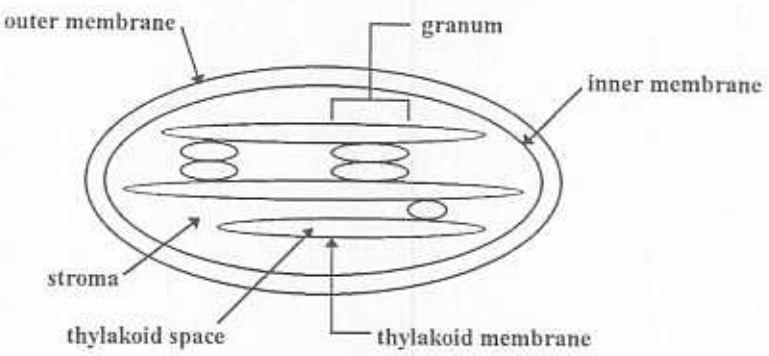
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การตรวจเอกสาร

การสังเคราะห์แสง

การสังเคราะห์แสง (photosynthesis) ของพืชชั้นสูง และ สาหร่ายที่เป็นยูคาริโอต (eukaryotic algae) จะเกิดขึ้นที่คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งเป็น organelle ที่ประกอบด้วยเยื่อ (membrane) 3 ชั้น คือ เยื่อชั้นนอก (outer membrane) เยื่อชั้นใน (inner membrane) และ เยื่อไธลาคอยด์ (thylakoid membrane) (รูปที่ 1) ช่องว่างระหว่างเยื่อชั้นนอกกับเยื่อชั้นในจะเรียกว่า intermembrane space ส่วนบริเวณของคลอโรพลาสต์ที่ถูกล้อมรอบโดยเยื่อชั้นในจะเรียกว่า stroma ภายใน stroma จะมีเยื่อไธลาคอยด์อยู่ ซึ่งเยื่อดังกล่าวจะล้อมรอบช่องว่างที่เรียกว่า thylakoid space บางบริเวณของเยื่อไธลาคอยด์จะมีการเรียงซ้อนกันของเยื่อชนิดนี้เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า granum (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของคลอโรพลาสต์

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การสังเคราะห์แสงของพืชเป็นกระบวนการในการใช้พลังงานแสงเพื่อสร้างสารพวกคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ซึ่งพืชสามารถใช้เป็นอาหารได้ กระบวนการนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ใช้แสง (ขั้นตอน light reaction) และขั้นตอนที่ไม่ใช้แสง (ขั้นตอน dark reaction) ขั้นตอนที่ใช้แสงจะเกิดขึ้นที่เยื่อไธลาคอยด์ โดยอิเลคตรอน (electron) จะถูกทำให้หลุดออกจากน้ำ และอิเลคตรอนดังกล่าวจะถูกส่งต่อไปตามลูกโซ่ถ่ายทอดอิเลคตรอน (electron transport chain) ซึ่งจะทำให้เกิดการสร้าง ATP และ NADPH เนื่องจากขั้นตอนนี้มีการส่งต่อของอิเลคตรอนไปตามลูกโซ่ถ่ายทอดอิเลคตรอน ดังนั้นจึงมักเรียกขั้นตอนนี้ว่า photosynthetic electron-transfer reaction ผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนที่ใช้แสง ซึ่งได้แก่ ATP และ NADPH จะถูกนำไปใช้ในขั้นตอนที่ไม่ใช้แสง ซึ่งเกิดขึ้นที่ stroma ขั้นตอนนี้จะใช้ ATP และ NADPH ที่ได้จากขั้นตอนที่ใช้แสงร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่ถูกตรึงมาจากอากาศมาสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากในขั้นตอนนี้มีการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากอากาศมาใช้ ดังนั้นจึงมักเรียกขั้นตอนนี้ว่า carbon-fixation reaction

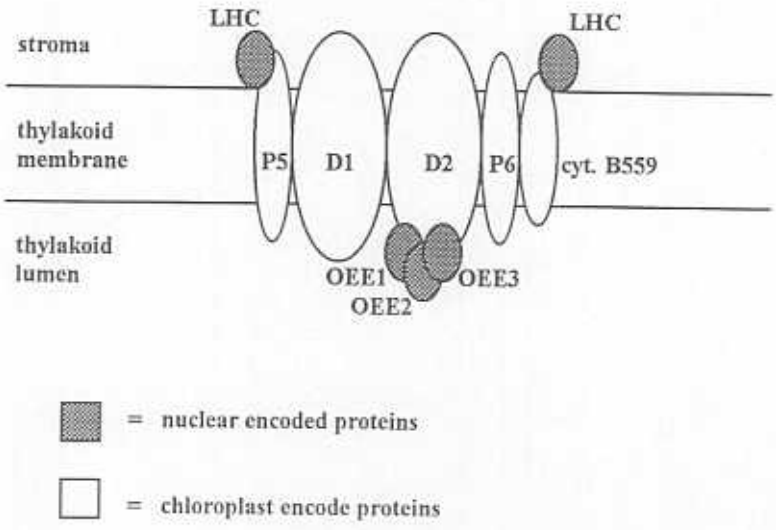
ลูกโซ่ถ่ายทอดอิเลคตรอนที่พบบนเยื่อไธลาคอยด์ของคลอโรพลาสต์ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ซึ่งได้แก่ antenna complex photosystem II (PSII) plastiquinone cytochrome b_6-f complex plastocyanin photosystem I (PSI) ferridoxin และ NADP reductase

PSII ประกอบด้วยโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากทั้งยีนในนิวเคลียส (nuclear gene) และยีนในคลอโรพลาสต์ (chloroplast gene) (รูปที่ 2) ตัวอย่างของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ PSII และถูกสร้างมาจากยีนในนิวเคลียส ได้แก่ โปรตีน light harvesting complex (LHC) โปรตีน oxygen evolving enhancer 1 (OEE1) โปรตีน oxygen evolving enhancer 2 (OEE2)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

และ โปรตีน oxygen evolving enhancer 3 (OEE3) ส่วนตัวอย่างของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ PSII และถูกสร้างมาจากยีนในคลอโรพลาสต์ ได้แก่ โปรตีน D1 โปรตีน D2 โปรตีน cytochrome b559 โปรตีน P5 โปรตีน P6 และ โปรตีนขนาดเล็ก ๆ จำนวนมาก (Rochaix, 1992)



รูปที่ 2 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของ photosystem II

<u>ความสำคัญของโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีนในนิวเคลียสต่อการแสดงออกของยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์</u>

โปรตีนบางตัวที่ถูกสร้างมาจากยีนในนิวเคลียส (nuclear gene) สามารถควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast gene) ได้ ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วโปรตีนเหล่านี้มักจะควบคุมการแสดงออกของยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ที่ขั้นตอนหลังจากที่มีกระบวนการ transcription เกิดขึ้นแล้ว (posttranscriptional control) เช่น ที่ขั้น

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ตอนการตกแต่ง RNA (RNA processing) (Barken และคณะ 1994, Goldschmidt-Clermont และคณะ 1990, Choquet และคณะ 1988) และที่ขั้นตอน translation (Drapier และคณะ 1992, Girard-bascou และคณะ 1992, Gumble และ Mullet, 1989, Rochaix และคณะ 1989, Kuchka และคณะ 1988) เป็นต้น

ตัวอย่างของการควบคุมการแสดงออกของยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ของ *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ขั้นตอน translation โดยอาศัยโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีนในนิวเคลียส ได้แก่ การควบคุมการแสดงออกของยีน *psbD* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ และเป็นยีนสำหรับโปรตีน D2 ของ PSII โดยโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีน NAC1 ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียส จากการศึกษา *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 พบว่ามีมิวเทชั่น (mutation) เกิดขึ้นที่ยีน NAC1 และมิวเทชั่นดังกล่าวส่งผลให้ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ไม่สามารถสร้างโปรตีน D2 ของ PSII จากยีน *psbD* ได้ เมื่อทำการตรวจสอบระดับของ mRNA ที่ถูกสร้างมาจากยีน *psbD* (*psbD* mRNA) พบว่าระดับของ *psbD* mRNA ใน *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 อยู่ในระดับที่เป็นปกติ (รูปที่ 3) แสดงว่าโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีน NAC1 น่าที่จะมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน *psbD* ที่ขั้นตอน translation ใน *C. reinhardtii* (Wu และ Kuchka 1995, Kuchka และคณะ 1988)

<u>*Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18</u>

Chlamydomonas reinhardtii สายพันธุ์ nac1-18 ถูกสร้างขึ้นโดย Kuchka และคณะ ในปีค.ศ. 1988 โดย Kuchka และคณะใช้วิธี UV mutagenesis ทำให้เกิดมิวเทชั่นขึ้นที่ยีน NAC1 ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียสของ *C. reinhardtii* ซึ่งมิวเทชั่นดังกล่าวส่งผลให้

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

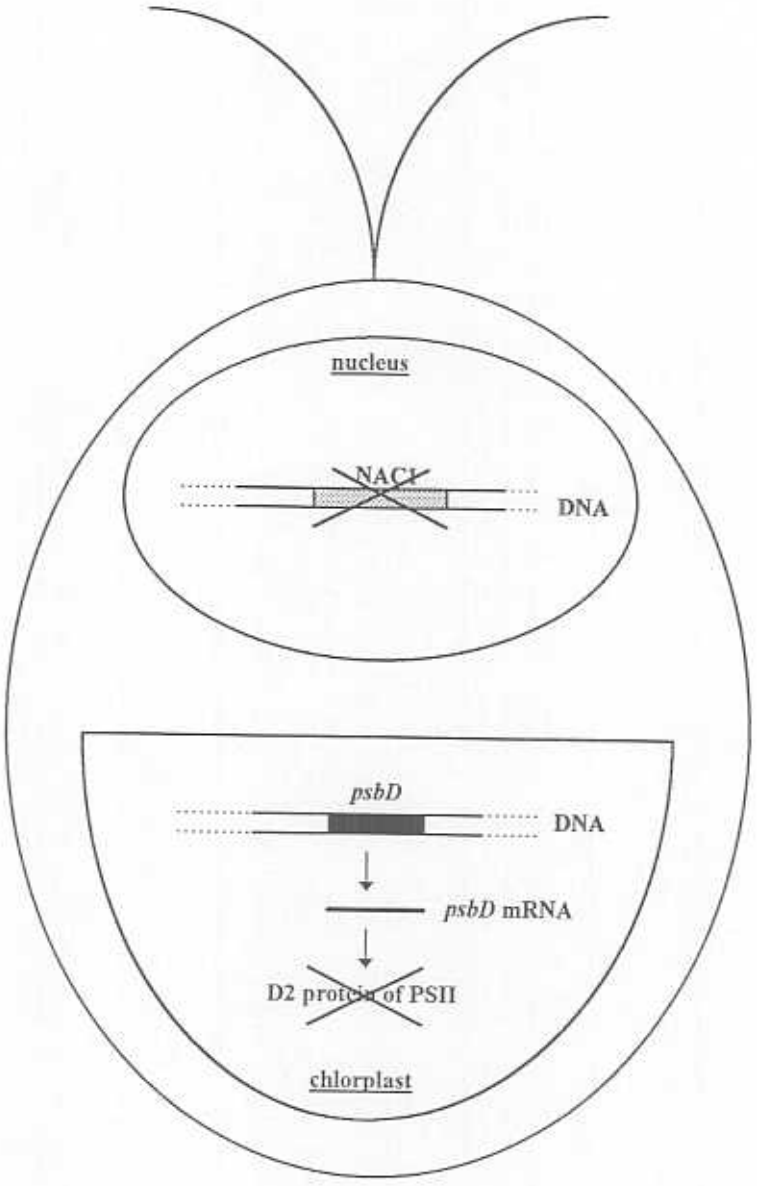
C. reinhardtii สายพันธุ์ nac1-18 ไม่สามารถสร้างโปรตีน D2 ของ PSII ได้ การที่ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ไม่สามารถสร้างโปรตีน D2 ของ PSII ได้ ทำให้ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ดังกล่าวไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และต้องอาศัยอะซิเตท (acetate) เป็นแหล่งคาร์บอนของเซลล์ ดังนั้น *C. reinhardtii* สายพันธุ์นี้จึงมีฟีโนไทป์ (phenotype) เป็น acetate-requiring phenotype (รูปที่ 3)

จากที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่าโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีน NAC1 น่าที่จะมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน *psbD* ที่ขั้นตอน translation ใน *Chlamydomonas reinhardtii* แต่จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีผู้ใดทราบอย่างแน่ชัดว่าโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีน NAC1 มีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน *psbD* ที่ขั้นตอน translation ใน *C. reinhardtii* อย่างไร อย่างไรก็ตามถ้าทราบว่ายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* มีลำดับเบสเป็นอย่างไร และเป็นยีนสำหรับโปรตีนใด อาจช่วยทำให้สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างยีน NAC1 กับกระบวนการแสดงออกของยีน *psbD* ใน *C. reinhardtii* ได้ ดังนั้นในปัจจุบันนี้จึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพยายามที่จะตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* Wu (1994) ได้ทำการตรวจหาตำแหน่งของของยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* และพบว่ายีนดังกล่าวอยู่ใกล้ชิดกับยีน smr-1 (herbicidal sulfometuron methyl resistance gene) และ sr-1 (streptomycin resistance gene) โดยยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* อยู่ห่างจากยีน smr-1 ประมาณ 5.5 map units (ไปทาง centromere) และห่างจากยีน sr-1 ประมาณ 12.2 map units (ไปทาง telomere) แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีผู้ใดทราบว่ายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* มีลำดับเบสเป็นอย่างไร และเป็นยีนสำหรับโปรตีนใด

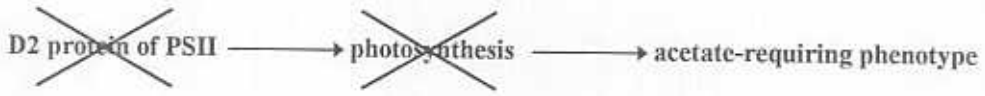
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

a.



b.



รูปที่ 3 *Chlamydomonas reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18

a. ลักษณะที่สำคัญของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18

b. phenotype ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การตรวจหายีนของ *Chlamydomonas reinhardtii*

การตรวจหายีนของ *Chlamydomonas reinhardtii* มีหลายวิธี สำหรับการตรวจหายีนที่ทราบว่าเป็นยีนสำหรับโปรตีนใด สามารถทำได้โดยการใช้แอนติบอดี้ (antibody) ที่จำเพาะต่อโปรตีนนั้นเป็นตัวตรวจหา (probe) เพื่อคัดเลือกยีนสำหรับโปรตีนดังกล่าวจาก expression library ตัวอย่างของยีนของ *C. reinhardtii* ที่ถูกตรวจหาโดยวิธีนี้ เช่น ยีนสำหรับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ flagella (flagellar proteins) และยีนสำหรับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของคลอโรพลาสต์ (Mitchell 1989, Mayfield และคณะ 1987, Williams และคณะ 1986) นอกจากนี้แล้วการตรวจหายีนของ *C. reinhardtii* ยังสามารถทำได้โดยการใช้ oligonucleotide (ซึ่งอาจเป็น DNA หรือ RNA ก็ได้) เป็นตัวตรวจหา ตัวอย่างเช่น การตรวจหายีน ARG7 ของ *C. reinhardtii* ซึ่งเป็นยีนสำหรับโปรตีน argininosuccinate lyase การตรวจหายีนดังกล่าวถูกทำโดยการใช้ยีน ARG7 ของยีสต์เป็นตัวตรวจหายีน ARG7 ของ *C. reinhardtii* ใน lambda EMBL3 genomic library (Debuchy และคณะ 1989)

ยีนบางยีนของ *C. reinhardtii* ไม่สามารถถูกตรวจหาโดยวิธีที่กล่าวมาข้างต้นได้ เนื่องจากไม่มีตัวตรวจหาที่เหมาะสม การตรวจหายีนเหล่านี้สามารถทำได้โดยวิธีที่เรียกว่า positional cloning (Leung และคณะ 1994, Mayer และคณะ 1994, Mindrinos และคณะ 1994, Martin และคณะ 1993, Arondel และคณะ 1992, Giraudat และคณะ 1992) ซึ่งหลักการของวิธีนี้คือต้องหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิด (closely linked) กับยีนที่ต้องการตรวจหาก่อน จากนั้นจึงทำการตรวจหายีนดังกล่าวโดยใช้วิธี chromosome walking โดยเริ่มจาก DNA marker ที่ตรวจหามาได้

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

การตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนที่สนใจมีหลายวิธี เช่น วิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Zaitlin และคณะ 1993, Wallace และคณะ 1990, Rommens และคณะ 1989) ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ได้ ซึ่งได้แก่ Gulliver M (เป็น transposon ที่พบใน *C. reinhardtii*) (Wu 1994) และเมื่อทำการทดลองเพื่อหาระยะห่างระหว่าง Gulliver M กับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* พบว่า Gulliver M อยู่ห่างจากยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ประมาณ 9.1 map units ซึ่งระยะห่างขนาดนี้ถือว่าเป็นระยะห่างที่มากเกินไปที่จะใช้วิธี chromosome walking ในการตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* โดยเริ่มต้นจาก Gulliver M (Wu 1994)

เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการพัฒนาวิธีที่เรียกว่า random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis ขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนที่สนใจ และวิธีการนี้ได้ถูกนำไปใช้ในการตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนที่สนใจในพืช สัตว์ และมนุษย์อย่างมีประสิทธิภาพ (Mahenthiralingam และคณะ 1997, Demeke และคณะ 1996, kutcher และคณะ 1996, Nagaraja และ Nagaraja 1996, Hunt และ Page 1994, Barua และคณะ 1993, Churchill และคณะ 1993, Remmers และคณะ 1993, Yu และ Paul 1993, Martins และคณะ 1991, Paran และคณะ 1991, William และคณะ 1990) วิธีนี้อาศัยการเพิ่มจำนวน (amplification) ของส่วนของ DNA ด้วย PCR โดยใช้ random primers ซึ่ง random primer แต่ละตัวจะประกอบด้วยเบสจำนวน 10 ตัว (Bowditch และคณะ 1991) โปรแกรม PCR ที่ใช้ในการทำ RAPD analysis คือ 94^{0}C เป็นเวลา 1 นาที (denaturing step) ตามด้วย 35^{0}C เป็นเวลา

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

1 นาที (annealing step) และ 72°C เป็นเวลา 2 นาที (extension step) ตามลำดับ โดยทำซ้ำทุกขั้นตอน 45 รอบ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

วัสดุและวิธีการทดลอง

สายพันธุ์ของ *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์ของ *Chlamydomonas reinhardtii* ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ สายพันธุ์ nac1-18 และ สายพันธุ์ S1D2 *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 เป็นมิวแตนท์ (mutant) ที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยอะซิเตทในการเจริญ (acetate requiring) ดังนั้น *C. reinhardtii* สายพันธุ์นี้จึงสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tris acetate phosphate (TAP) medium ได้ แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium (TAP medium ที่ไม่มีอะซิเตท) ได้ ส่วน *C. reinhardtii* สายพันธุ์ S1D2 เป็นสายพันธุ์ปกติ (polymorphic wild type) ดังนั้น *C. reinhardtii* สายพันธุ์นี้จึงสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TAP medium และ อาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium ได้

สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง *C. reinhardtii* ทั้งสองสายพันธุ์ คือ ที่อุณหภูมิ 25°C ในที่ที่มีแสงสว่างตลอดเวลา

การสกัด DNA จากเซลล์ของ *Chlamydomonas reinhardtii*

DNA ของ *Chlamydomonas reinhardtii* ถูกสกัดตามวิธีของ Rochaix และคณะ (1988) ซึ่งสามารถทำได้โดยเลี้ยงเซลล์ของ *C. reinhardtii* ใน TAP medium จนกระทั่งเซลล์เหล่านั้นอยู่ในระยะ log phase (2×10^6 cells/ml) จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์เหล่านั้นในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml โดยการปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนของเซลล์ที่อยู่ในหลอด microcentrifuge tube มาเติมด้วย buffer (ซึ่งประกอบ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ด้วย 20mM Tris, pH 8 50mM EDTA และ 0.1 M NaCl) ปริมาตร 0.35 ml proteinase K (ความเข้มข้น 2 mg/ml) ปริมาตร 50 µl และ 20% SDS ปริมาตร 25 µl จากนั้นนำหลอด microcentrifuge tube ดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้เติม DEPC (diethylpyrocarbonate) ปริมาตร 2 µl ลงไปในหลอด microcentrifuge tube ดังกล่าว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วตามด้วยการเติม 5M potassium acetate ปริมาตร 50 µl และนำไปบ่มในถังน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอด microcentrifuge tube ดังกล่าวไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใส (supernatant) เอาไว้ เติม phenol ลงไปในส่วนใสที่เก็บไว้ โดยใช้ปริมาตรของ phenol เท่ากับปริมาตรของส่วนใสที่เก็บไว้ จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งจะทำให้ของเหลวแยกออกเป็นสองชั้น โดยชั้นล่างจะเป็นชั้นของ phenol ในขณะที่ชั้นบนจะเป็นชั้นของของเหลวที่มี DNA ละลายอยู่ ให้เก็บของเหลวชั้นบนออกมาใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ และเติม 95% ethanol จนเต็มหลอด microcentrifuge tube จากนั้นนำหลอด microcentrifuge tube ดังกล่าวไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจะทำให้ DNA ตกตะกอน ให้ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol จากนั้นนำตะกอน DNA ไปตากให้แห้ง และละลายตะกอน DNA ที่ได้ด้วย TE buffer ปริมาตร 50 µl

<u>การตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 โดยวิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis</u>

ทำการผสม (cross) *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 กับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ SID2 จากนั้นทำการแบ่งเซลล์ลูกจำนวน 50 tetrads ที่ได้จากการผสม *C. reinhardtii* ทั้งสอง

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สายพันธุ์ดังกล่าวออกเป็น 2 กลุ่ม ตามฟีโนไทป์ (phenotype) คือ กลุ่มเซลล์ปกติ (non-acetate requiring or wild type group) และ กลุ่มมิวแตนท์ (acetate requiring or mutant group)

DNA ที่สกัดได้จากสมาชิกทุกตัวในแต่ละกลุ่มถูกนำมาผสมรวมกัน ซึ่งจะทำให้ได้ DNA 2 กลุ่ม คือ wild type DNA pool และ mutant DNA pool ซึ่ง DNA pool แต่ละกลุ่มจะถูกใช้เป็นแม่แบบ (template) สำหรับ PCR โดยใช้ random primers จำนวน 40 ตัว คือ OPB1-OPB20 และ OPC1-OPC20 (Operon Technologies) ซึ่ง random primer แต่ละตัวจะประกอบด้วยเบสจำนวน 10 ตัว โปรแกรม PCR ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 94^{o}C เป็นเวลา 1 นาที (denaturing step) ตามด้วย 35^{o}C เป็นเวลา 1 นาที (annealing step) และ 72^{o}C เป็นเวลา 2 นาที (extension step) ตามลำดับ โดยทำซ้ำทุกขั้นตอน 45 รอบ ผลที่ได้จากการทำ PCR จะถูกนำไปศึกษาโดยวิธี gel electrophoresis บน 1.4% agarose gel หลังจากนั้นย้อมแผ่น agarose gel ด้วย ethidium bromide ที่มีความเข้มข้น 0.5 µl/ml และศึกษาแถบของ DNA บนแผ่น agarose gel ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet light)

<u>การสกัด RAPD marker ออกจาก agarose gel</u>

ตัดชิ้นของ agarose gel ที่มี RAPD marker อยู่ออกจากแผ่น agarose gel จากนั้นนำเอาชิ้น agarose gel ที่มี RAPD marker อยู่ไปใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml ที่ตัดเอาปลายออก และตรงปลายของหลอดดังกล่าวจะถูกอุดด้วย glass wool จากนั้นนำเอาหลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml ดังกล่าวใส่ลงไปในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml และนำไปปั่นที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งจะทำให้มีสารละลาย DNA ตกลงมาอยู่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml นำสารละลาย DNA ที่ได้ไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เติมด้วย 95% ethanol ปริมาตร 1 ml และนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000rpm เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งจะทำให้ DNA ตกตะกอน นำตะกอน DNA ที่ได้ไปล้างด้วย 70% ethanol และตากให้แห้ง จากนั้นจึงละลายตะกอน DNA ดังกล่าวด้วย TE buffer ปริมาณ 20 µl

การนำ DNA เข้าสู่เซลล์ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18

ทำการเลี้ยงเซลล์ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ใน TAP medium จนกระทั่งเซลล์เหล่านั้นอยู่ในระยะ log phase (2×10^6 cells/ml) จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์เหล่านั้นโดยการปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำเซลล์เหล่านั้นไปเลี้ยงใน minimal medium ที่ความเข้มข้น 2×10^8 cells/ml เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C ก่อนที่จะนำเซลล์เหล่านั้นไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

สำหรับวิธีการในการนำ DNA เข้าสู่เซลล์ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ได้ใช้วิธีการของ Kindle (1990) โดยการใส่ DNA (RAPD marker) ปริมาณ 1-2 µg และ glass beads ปริมาณ 0.3 g ลงไปในหลอด conical centrifuge tube ขนาด 15 ml ที่มีเซลล์ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ปริมาตร 0.3 ml อยู่ (ความเข้มข้นของเซลล์ nac1-18 เท่ากับ 2×10^8 cells/ml) จากนั้นนำหลอด conical centrifuge tube ดังกล่าวไป vortex ที่ความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 15 วินาที หลังจากนั้นเติม minimal medium ปริมาตร 10 ml ลงไปในหลอด conical centrifuge tube ดังกล่าว และนำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2-3 อาทิตย์ก่อนที่จะนำมาสังเกตผล

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ผลการทดลอง

การตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* โดยวิธี RAPD analysis เริ่มจากการผสม (cross) *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 กับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ SID2 ก่อน ซึ่งเซลล์ลูกที่ได้จากการผสม *C. reinhardtii* ทั้งสองสายพันธุ์จำนวน 50 tetrads จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเซลล์ปกติ (non-acetate requiring or wild type group) และ กลุ่มมิวแตนท์ (acetate requiring or mutant group) จากนั้นทำการสกัด DNA จาก *C. reinhardtii* ทั้งสองกลุ่ม โดย DNA ทั้งหมดที่สกัดจากกลุ่มเซลล์ปกติจะเรียกว่า wild type DNA pool ในขณะที่ DNA ทั้งหมดที่สกัดจากกลุ่มมิวแตนท์จะเรียกว่า mutant DNA pool

เมื่อใช้ DNA ที่สกัดจากกลุ่มเซลล์ปกติ (wild type DNA pool) และ DNA ที่สกัดจากกลุ่มมิวแตนท์ (mutant DNA pool) เป็นแม่แบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR ซึ่งโปรแกรม PCR ที่ใช้ในการทำ RAPD analysis คือ 94^{o}C เป็นเวลา 1 นาที (denaturing step) ตามด้วย 35^{o}C เป็นเวลา 1 นาที (annealing step) และ 72^{o}C เป็นเวลา 2 นาที (extension step) ตามลำดับ โดยทำซ้ำทุกขั้นตอน 45 รอบ และใช้ random primers จำนวน 40 ตัว (OPB1-OPB20 และ OPC1-OPC20) ผลปรากฏว่ามี random primers 2 ตัวที่สามารถทำให้ผลผลิต PCR (PCR products) เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR แตกต่างจากผลผลิต PCR เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR random primers ดังกล่าวทั้งสอง คือ OPC7 และ OPC18 ในการทดลองนี้ได้ใช้ DNA ที่สกัดจาก *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 และ สายพันธุ์ S1D2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ (parent strains) เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ด้วย เพื่อให้แน่ใจว่าผลผลิต PCR ที่ได้ เมื่อใช้ wild type DNA pool และ mutant

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ไม่ใช่เป็น artefact แต่สามารถพบได้ในผลผลิต PCR เมื่อใช้ parent strain ตัวใดตัวหนึ่งหรือทั้งสองตัวเป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR

ผลผลิต PCR เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบ และใช้ OPC7 เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR จะมีแถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 1.6 kb ในขณะที่ผลผลิต PCR เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบ และใช้ OPC7 เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR จะไม่มีแถบ DNA ดังกล่าว (รูปที่ 4) ซึ่งในที่นี้จะเรียก DNA ที่อยู่ในแถบ DNA ดังกล่าวว่า OPC7 RAPD marker

ผลผลิต PCR เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบ และใช้ OPC18 เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR จะมีแถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 0.9 kb ในขณะที่ผลผลิต PCR เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบ และใช้ OPC18 เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR จะไม่มีแถบ DNA ดังกล่าว (รูปที่ 5) ซึ่งในที่นี้จะเรียก DNA ที่อยู่ในแถบ DNA ดังกล่าวว่า OPC18 RAPD marker

รูปที่ 4 ได้เปรียบเทียบผลผลิต PCR เมื่อใช้ OPC7 เป็น primer กับผลผลิต PCR เมื่อใช้ OPB3 เป็น primer เมื่อใช้ OPC7 เป็น primer ผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR จะแตกต่างจากผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ซึ่งสังเกตได้จาก lane ที่ 4 ของรูปที่ 4 มีแถบ DNA ขนาดประมาณ 1.6 kb แต่ lane ที่ 5 ของรูปที่ 4 ไม่มีแถบ DNA ดังกล่าว แต่เมื่อใช้ OPB3 เป็น primer ผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR จะไม่แตกต่างจากผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ซึ่งสังเกตได้จาก lane ที่ 8 และ lane ที่ 9 ของรูปที่ 4 ที่มีแถบ DNA ที่เหมือนกันทุกประการ

นอกเหนือจาก random primer OPB3 แล้ว random primer ตัวอื่นที่ใช้ในการศึกษานี้ (ยกเว้น OPC7 และ OPC18) ก็สามารถทำให้ผลผลิต PCR ที่ได้ เมื่อใช้ wild type DNA pool

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ไม่แตกต่างจากผลผลิต PCR ที่ได้ เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ตัวอย่างเช่น random primer OPB1 ซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 6 เป็นต้น

เนื่องจากทั้ง OPC7 RAPD marker และ OPC18 RAPD marker สามารถพบได้ใน DNA ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ S1D2 และ DNA ที่สกัดจากกลุ่มเซลล์ปกติ (wild type DNA pool) แต่ไม่สามารถพบได้ใน DNA ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 และ DNA ที่สกัดจากกลุ่มมิวแตนท์ (mutant DNA pool) ดังนั้นจึงคาดว่า OPC7 RAPD marker และ OPC18 RAPD marker อาจจะมียีน NAC1 ปกติของ *C. reinhardtii* และ/หรือ DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว เพื่อตรวจสอบว่า OPC7 RAPD marker และ OPC18 RAPD marker ที่ได้มียีน NAC1 ปกติของ *C. reinhardtii* และ/หรือ DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว จึงได้มีการทำการทดลองโดยนำเอา RAPD marker ดังกล่าวแต่ละตัวใส่เข้าไปในเซลล์ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ถ้า RAPD marker ใดมียีน NAC1 ปกติของ *C. reinhardtii* RAPD marker นั้นจะสามารถทำให้ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 เปลี่ยนไปเป็น wild type ได้ (คือสามารถเจริญบน minimal medium ได้) แต่ถ้า RAPD marker ใดไม่มียีน NAC1 ปกติของ *C. reinhardtii* แต่มี DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว RAPD marker นั้นจะไม่สามารถทำให้ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 เปลี่ยนไปเป็น wild type ได้ ในการทดลองนี้ได้นำเอา OPC7 RAPD marker และ OPC18 RAPD marker เข้าสู่เซลล์ของ *Chlamydomonas reinhardtii* ตามวิธีของ Kindle (1990) ซึ่งเป็นวิธีในการนำเอา DNA เข้าสู่เซลล์ของ *Chlamydomonas reinhardtii* ที่สะดวกและมีประสิทธิภาพ จากการทดลองพบว่า หลังจากที่นำเอา OPC7 RAPD marker หรือ OPC18 RAPD marker เข้าสู่เซลล์ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 แล้ว ไม่มีเซลล์ใดของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 เปลี่ยนแปลงไปเป็น wild type ซึ่งสังเกตได้จากการที่ไม่มี

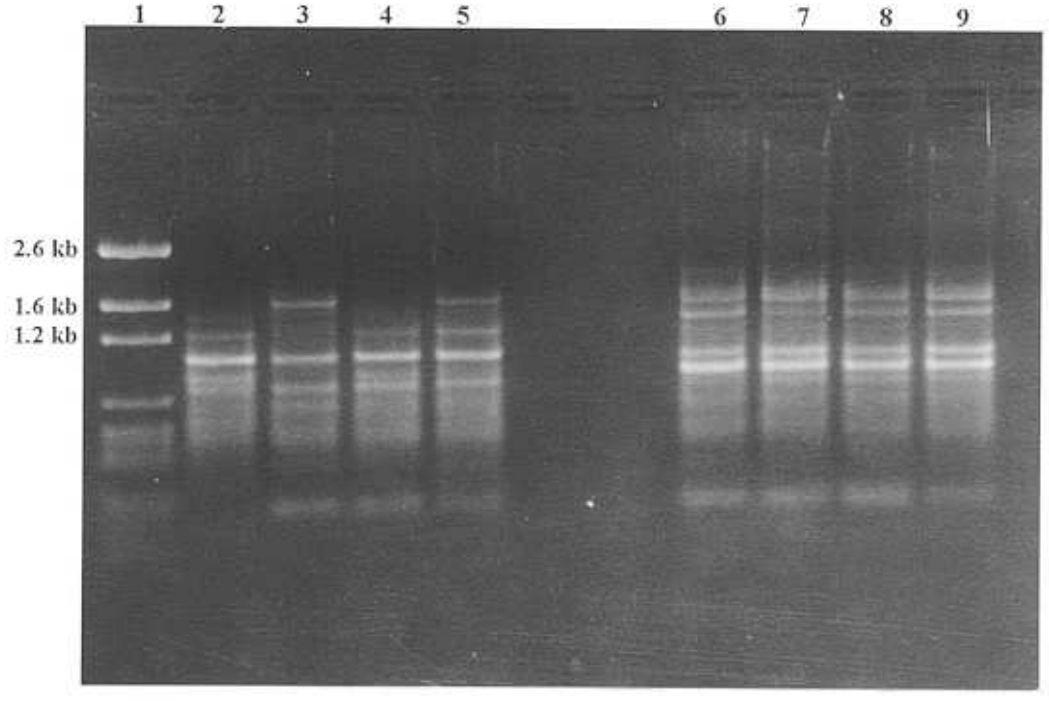
Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เซลล์ไดของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 ที่สามารถเจริญบน minimal medium ได้ ดังนั้นทั้ง OPC7 RAPD marker และ OPC18 RAPD marker จึงไม่น่าที่จะมียีน NAC1 ปกติ ของ *C. reinhardtii* แต่น่าที่จะมี DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 4 ผลผลิต PCR (PCR products) เมื่อใช้ OPC7 และ OPB3 เป็น primer

Lane 1 = pGEM DNA marker

Lane 2 = PCR products เมื่อใช้ DNA ของ nac1-18 เป็น template และใช้ OPC7 เป็น primer

Lane 3 = PCR products เมื่อใช้ DNA ของ S1D2 เป็น template และใช้ OPC7 เป็น primer

Lane 4 = PCR products เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็น template และใช้ OPC7 เป็น primer

Lane 5 = PCR products เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็น template และใช้ OPC7 เป็น primer

Lane 6 = PCR products เมื่อใช้ DNA ของ nac1-18 เป็น template และใช้ OPB3 เป็น primer

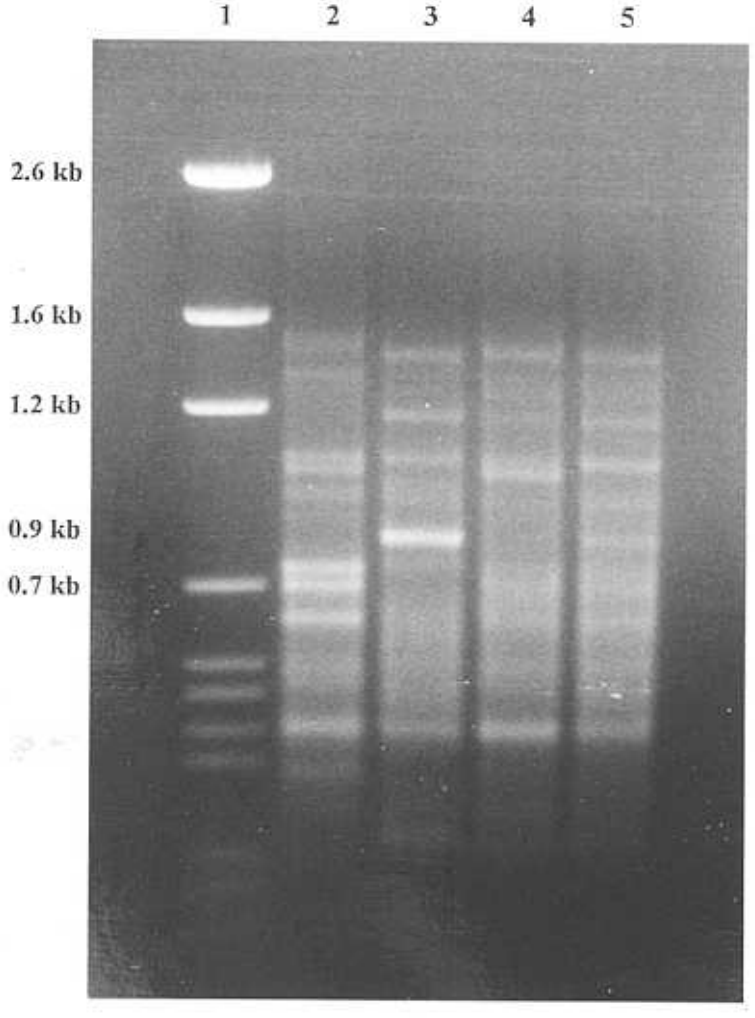
Lane 7 = PCR products เมื่อใช้ DNA ของ S1D2 เป็น template และใช้ OPB3 เป็น primer

Lane 8 = PCR products เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็น template และใช้ OPB3 เป็น primer

Lane 9 = PCR products เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็น template และใช้ OPB3 เป็น primer

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 5 ผลผลิต PCR (PCR products) เมื่อใช้ OPC18 เป็น primer

Lane 1 = pGEM DNA marker

Lane 2 = PCR products เมื่อใช้ DNA ของ nac1-18 เป็น template และใช้ OPC18 เป็น primer

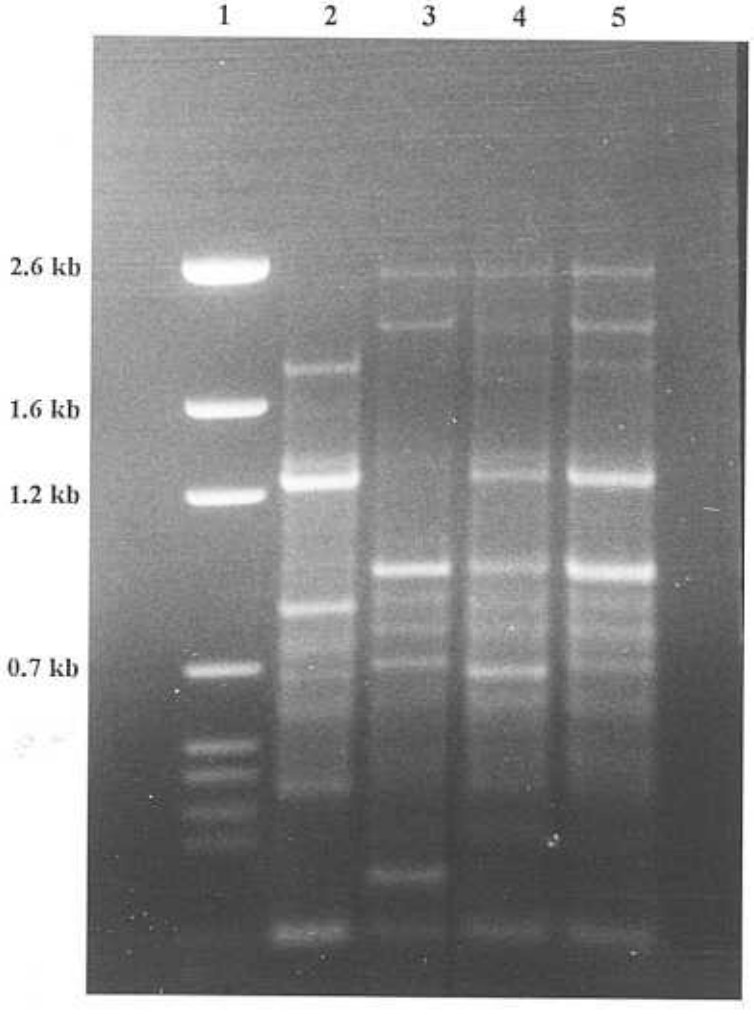
Lane 3 = PCR products เมื่อใช้ DNA ของ S1D2 เป็น template และใช้ OPC18 เป็น primer

Lane 4 = PCR products เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็น template และใช้ OPC18 เป็น primer

Lane 5 = PCR products เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็น template และใช้ OPC18 เป็น primer

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University



รูปที่ 6 ผลผลิต PCR (PCR products) เมื่อใช้ OPB1 เป็น primer

Lane 1 = pGEM DNA marker

Lane 2 = PCR products เมื่อใช้ DNA ของ nac1-18 เป็น template และใช้ OPB1 เป็น primer

Lane 3 = PCR products เมื่อใช้ DNA ของ S1D2 เป็น template และใช้ OPB1 เป็น primer

Lane 4 = PCR products เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็น template และใช้ OPB1 เป็น primer

Lane 5 = PCR products เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็น template และใช้ OPB1 เป็น primer

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

วิธีการที่เหมาะสมวิธีการหนึ่งในการตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* คือ วิธี positional cloning ซึ่งหลักการในการตรวจหายีนโดยวิธีนี้ คือจะต้องตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ก่อน จากนั้นจึงใช้วิธี chromosome walking เพื่อตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* โดยตั้งต้นจาก DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว เนื่องจากการตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* โดยวิธี positional cloning มีขอบเขตงานที่กว้างมาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงศึกษาเฉพาะการตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ซึ่ง DNA marker ดังกล่าวสามารถถูกนำไปใช้ในการตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ต่อไป

ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้วิธี RAPD analysis ในการตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* เนื่องจากวิธีนี้ได้เคยถูกนำไปใช้อย่างได้ผลในการตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนต่าง ๆ ของพืช สัตว์ และ มนุษย์ (Mahenthiralingam และคณะ 1997, Demeke และคณะ 1996, Kutcher และคณะ 1996, Nagaraja และ Nagaraja 1996, Hunt และ Page 1994, Barua และคณะ 1993, Churchill และคณะ 1993, Remmers และคณะ 1993, Yu และ Paul 1993, Martins และคณะ 1991, Paran และคณะ 1991, William และคณะ 1990) วิธีนี้อาศัยการเพิ่มจำนวน (amplification) ของส่วนของ DNA ด้วย PCR โดยใช้ random primers ซึ่ง random primer แต่ละตัวจะประกอบด้วยเบสจำนวน 10 ตัว (Bowditch และคณะ 1991) ขั้นตอนของวิธีนี้เริ่มจากพันธุ์พ่อแม่ (parent strains) ซึ่งเป็น polymorphic จะถูกผสมกัน โดยที่พันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ พันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งจะต้องเป็นพันธุ์ปกติ (wild type strain) ซึ่งมียีนที่สนใจเป็นยีนปกติ และอีกพันธุ์หนึ่งจะต้องเป็นมิวแตนท์ (mutant strain) ซึ่งมีมิวเตชั่นในยีนที่สนใจ เนื่องจากกระบวนการในการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์พ่อและ

Ubon Rajathanee University

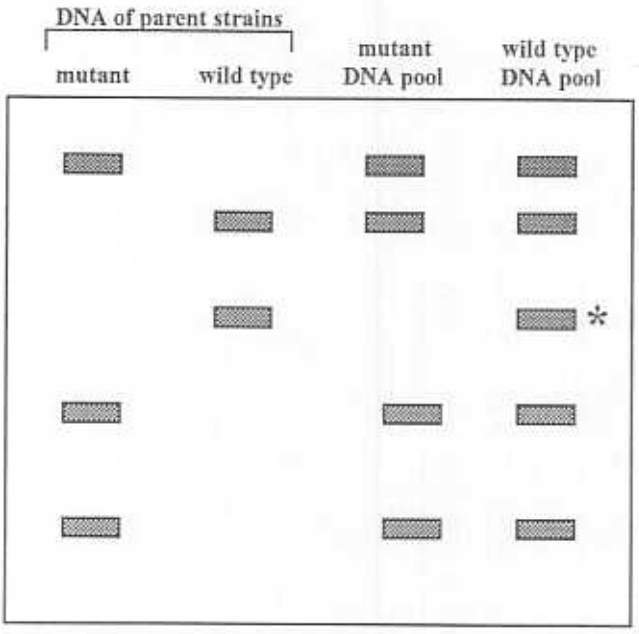
Ubon Rajathanee University

พันธุ์แม่จะมี recombination เกิดขึ้น ดังนั้นเซลล์ลูกที่ได้ออกมาจึงมี DNA บางส่วนมาจากพันธุ์พ่อ และ DNA บางส่วนมาจากพันธุ์แม่ หลังจากการผสมระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่แล้ว เซลล์ลูกทั้งหมดที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเซลล์ปกติ (wild type group) และกลุ่มมิวแตนท์ (mutant group) ตามหลักการของ RAPD analysis สิ่งที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มเซลล์สองกลุ่มนี้ คือ ยีนที่สนใจและ DNA ที่อยู่ใกล้ชิด (closely linked) กับยีนที่สนใจ เพราะกลุ่มเซลล์ปกติจะมียีนที่สนใจเป็นยีนปกติ ส่วนกลุ่มมิวแตนท์จะมียีนที่สนใจเป็นยีนที่มีมิวเทชั่น และ DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนที่สนใจมีโอกาสน้อยมากที่จะเกิด recombination แล้วแยกจากยีนที่สนใจไปอยู่คนละโครโมโซม หลังจากที่มีกลุ่มเซลล์ปกติ และกลุ่มมิวแตนท์แล้ว ให้ทำการสกัดเอา DNA ออกจากเซลล์ลูกทุกเซลล์ที่อยู่ในแต่ละกลุ่มออกมา และผสมรวมกัน ซึ่งจะทำให้ได้ DNA 2 กลุ่ม คือ wild type DNA pool ซึ่งสกัดมาจากกลุ่มเซลล์ปกติ และ mutant DNA pool ซึ่งสกัดมาจากกลุ่มมิวแตนท์ เมื่อนำ DNA pool แต่ละกลุ่มไปใช้เป็นแม่แบบ (template) ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ random primers ถ้า random primer ตัวใดตัวหนึ่งสามารถไปจับกับ DNA ตรงบริเวณยีนที่สนใจของ wild type DNA pool ได้ random primer ตัวนี้ก็จะไม่สามารถไปจับกับ DNA ในบริเวณเดียวกันนี้ของ mutant DNA pool ได้ ซึ่งผลก็คือเราจะสามารถเพิ่มจำนวนของ DNA ตรงบริเวณยีนที่สนใจของ wild type DNA pool ได้ แต่จะไม่สามารถเพิ่มจำนวนของ DNA ตรงบริเวณเดียวกันนี้ของ mutant DNA pool ได้ ดังนั้นเมื่อนำเอาผลผลิต PCR เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR กับผลผลิต PCR เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR ไปศึกษาโดยวิธี agarose gel electrophoresis ก็จะพบว่ามีแถบ DNA 1 แถบที่แตกต่างกัน โดยจะพบแถบ DNA ที่แตกต่างกันนี้เฉพาะในผลผลิต PCR เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR แต่จะ

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ไม่พบแถบ DNA ดังกล่าวในผลผลิต PCR เมื่อใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR (รูปที่ 7) ซึ่งแถบ DNA ที่แตกต่างกันนี้อาจจะมียีนที่สนใจและ/หรือ DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนที่สนใจ



รูปที่ 7 ผลผลิต PCR เมื่อใช้ random primer ที่สามารถจับกับยีนที่สนใจ ซึ่งเป็นยีนปกติได้ แต่ไม่สามารถจับกับยีนที่สนใจ ซึ่งเป็นยีนที่มีมิวเทชั่นได้

(* แสดงตำแหน่งของแถบ DNA ที่พบเฉพาะในผลผลิต PCR เมื่อใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR)

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

ในการศึกษานี้พบว่าเมื่อใช้ random primer OPC7 และ random primer OPC18 ผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ wild type DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR จะมีแถบ DNA 1 แถบที่ไม่พบในผลผลิต PCR ที่ได้จากการใช้ mutant DNA pool เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR แถบ DNA ดังกล่าว คือ แถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 1.6 kb ในกรณีที่ใช้ random primer OPC7 และ แถบ DNA ที่มีขนาดประมาณ 0.9 kb ในกรณีที่ใช้ random primer OPC18 แสดงว่า random primer OPC7 และ random primer OPC18 สามารถไปจับกับยีน NAC1 ปกติของ *C. reinhardtii* และ/หรือ DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว แต่ไม่สามารถไปจับกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ที่มีมิวเทชั่น และ/หรือ DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว ดังนั้น DNA ที่อยู่ในแถบ DNA ดังกล่าว (OPC7 RAPD marker และ OPC18 RAPD marker) จึงอาจเป็น DNA ที่มียีน NAC1 ปกติของ *C. reinhardtii* และ/หรือ DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว ซึ่งจากการทดสอบด้วยการนำ DNA marker ดังกล่าวแต่ละตัวใส่เข้าไปในเซลล์ของ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18 พบว่า DNA marker ดังกล่าวไม่มียีน NAC1 ปกติของ *C. reinhardtii* แต่มีเฉพาะ DNA ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว

เนื่องจาก DNA marker ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหายีนที่สนใจของ *C. reinhardtii* ต่อไป โดยวิธี chromosome walking ควรจะเป็น DNA marker ที่อยู่ห่างจากยีนที่สนใจไม่เกิน 1 map unit ซึ่งการที่จะตรวจหา DNA marker ที่อยู่ห่างจากยีนที่สนใจของ *C. reinhardtii* ไม่เกิน 1 map unit สามารถทำได้โดยการใช้เซลล์ลูกจำนวน 50 tetrads ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง *C. reinhardtii* พันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ โดยพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่พันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งจะต้องเป็นพันธุ์ปกติ และอีกพันธุ์หนึ่งจะต้องเป็นมิวแตนท์ (Rattanachaikunsopon 1997) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้เซลล์ลูกที่ได้จากการผสม *C. reinhardtii* สายพันธุ์ nac1-18

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

กับ *C. reinhardtii* สายพันธุ์ S1D2 จำนวน 50 tetrads เพื่อให้ได้ DNA marker ที่ห่างจากยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ไม่เกิน 1 map unit ซึ่ง DNA marker ดังกล่าวนี้จะสามารถถูกนำไปใช้ในการตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ต่อไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

สรุปผลการทดลอง

ในการตรวจหา DNA marker ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *Chlamydomonas reinhardtii* โดยวิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis และใช้ random primers จำนวน 40 ตัว (OPB1-OPB20 และ OPC1-OPC20) พบว่ามี DNA markers 2 ตัวที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ซึ่งได้แก่ OPC7 RAPD marker และ OPC18 RAPD marker เนื่องจาก DNA markers ทั้งสองตัวนี้อยู่ห่างจากยีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ไม่เกิน 1 map unit ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะนำเอา DNA markers ทั้งสองตัวนี้ไปใช้ในการตรวจหายีน NAC1 ของ *C. reinhardtii* ต่อไป

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

เอกสารอ้างอิง

Arondel V., Lemieux B., Hwang I., Goodman H.M., and Somerville C.R. (1992). Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis. Science 258: 1353-1355.

Barken A., Walker M., Nolasco M., and Johnson D. (1994). A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. EMBO J. 13: 3170-3181.

Barua U.M., Chlmers K.L., Hackett C.A., Thomas W.T., Powell W., and Waugh R. (1993). Identification of RAPD markers linked to a Rhynchosporium secalis resistance locus in barley using near isogenic lines and bulked segregant analysis. Heredity 71: 177-184.

Bowditch B.M., Albright D.G., Williams L.G., and Rraun M.J. (1991). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. Methods in Enzymology 224: 295-309.

Choquet Y., Goldschmidt-Clermont M., Girard-Bascou J., Kuck U., Bennoun P., and Rochaix J.D. (1988). Mutant phenotypes support a tran-splicing mechanism for the expression of the tripartite *psaA* gene in the *C. reinhardtii* chloroplast. Cell 52: 903-912.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Churchill G.A., Giovannoni J.J., and Tanskey S.D. (1993). Pooled-sampling makes high resolution mapping practical with DNA markers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 16-20.

Debuchy R., Purton S., and Rochaix J.D. (1989). The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*:an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. EMBO J. 8: 2803-2809.

Demeke T., Larocha A., and Gaudet D.A. (1996). A DNA marker for the Bt-10 common bunt resistance gene in wheat. Genome 39: 51-55.

Drapier D., Girard-Bascou J., and Wollman F.A. (1992). Evidence for nuclear control of the expression of the *atpA* and *atpB* chloroplast genes in *Chlamydomonas*. Plant Cell 4: 283-295.

Girard-Bascou J., Pierre Y., and Drapier D. (1992). A nuclear mutation affects the synthesis of the chloroplast *psbA* gene production in *chlamydomonas reinhardtii*. Curr. Genet. 22: 47-52.

Giraudat J., Hauge B.M., Valon C., Smalle J., Parcy F., and Goodman H.M. (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. Plant Cell 4: 1251-1261.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Goldschmidt-Clermont M., Girard-Bascou J., Choquet Y., and Rochaix J.D. (1990). Trans-splicing mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol. Gen. Genet. 223: 417-425.

Hunt G.J., and Page R.E. Jr. (1994). Linkage analysis of sex determination in the honey bee (Apis mellifera). Mol. Gen. Genet. 244: 512-518.

Kindle K.L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1228-1232.

Kuchka M.R., Goldschmidt-Clermont M., van Dillewijn J., and Rochaix J.D. (1989). Mutation at the *Chlamydomonas* nuclear NAC2 locus specifically affects stability of the chloroplast *psbD* transcript encoding polypeptide D2 of PSII. Cell 58: 869-876.

Kuchka M.R., Mayfield S.P., and Rochaix J.D. (1988). Nuclear mutations specifically affect the synthesis and/or degradation of the chloroplast-encoded D2 polypeptide of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. EMBO J. 7: 319-324.

Kutcher H.R., Bailey K.L., Rossnagel B.G., and Legge W.G. (1996). Identification of RAPD markers for common root rot and spot blotch (Cochliobolus sativus) resistance in barley. Genome 39: 206-215.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Leung J., Bouvier-Durand M., Morris P.C., Guerrier D., Chefdor F., and Giraudat J. (1994). Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium modulated protein phosphatase. Science 264: 1448-1452.

Mahenthiralingam E., Simpson D.A., and Speert D.P. (1997). Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic Burkholderia cepacia strains recovered from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 35: 808-816.

Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganal M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D., and Tanksley S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. Science 262: 1432-1436.

Martins G.B., Williams J.G., and Tanksley S.D. (1991). Rapid identification of markers linked to a Pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2336-2340.

Mayer K., Leube M.P., and Grill E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. Science 264: 1452-1455.

Mayfield S.P., Rahire M., Frank G., Zuber H., and Rochaix J.D. (1987). Expression of the nuclear gene encoding oxygen-evolving enhancer protein 2 is required for high levels of photosynthetic oxygen evolution in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8: 749-753.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Mindrinos M., Katagiri F., Yu G.L., and Ausubel F.M. (1994). The A. Thaliana disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine rich repeats. Cell 78: 1089-1099.

Mitchell D.R. (1989). Molecular analysis of the alpha and beta dyneiñ genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. Cell Motility and the cytoskeleton 14: 435-445.

Nagaraja G.M., and Nagaraja J. (1995). Genome fingerprint of the silkworm, Bombyx mori, using random arbitrary primers. Electrophoresis 16: 1633-1638.

Paran I., Kesseli R., and Michelmore R. (1991). Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce, using near isogenic lines. Genome 34: 1021-1027.

Rattanachaikunsopon P. (1997). Cloning and characterization of the AC115 gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. Ph.D. Thesis, Lehigh University.

Remmers E.F., Goldmuntz E.A., Zha H., Crofford L.J., Cash J.M., Mathern P., Du Y., and Wilder R.L. (1993). Linkage map of seven polymorphic markers on rat chromosome 18. Mamm. Genome 4: 265-270.

Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L.C., and Collins F.S. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 245: 1059-1065.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Rochaix J.D. (1992). Post-translational steps in the expression of chloroplast genes. Annu. Rev. Cell Biol. 8: 1-28.

Rochaix J.D., Kuchka M.R., Mayfield S.P., Schirmer-Rahire M., Girard-Bascou J., and Bennoun P. (1989). Nuclear and chloroplast mutations affect the synthesis or stability of thechloroplast *psbC* gene product in *Chlamydomonas reinhardtii*. EMBO J. 8: 1013-1021.

Wallace M.R., Marchuk D.A., Anderson L.B., Letcher R., Odeh H.M., Saulino A.M., Fountain J.M., Brereton A., Nicholson J., Mitchell A.L., Brownstein B.H., and Collins F.S. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene : identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. Science 249: 181-186.

Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.L., Rafalski J.A., and Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usual as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

Williams B.D., Mitchell D.R., and Rosenbaum J.L. (1986). Molecular cloning and expression of flagellar radial spoke and dynein genes of *Chlamydomonas*. J. Cell Biol. 103: 1-11.

Wu H.Y. (1994). Characterization of nuclear mutants affected in chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. Ph.D. Thesis, Lehigh University.

Ubon Rajathanee University

Ubon Rajathanee University

Wu H.Y., and Kuchka M.R. (1995). A nuclear suppressor overcomes defects in the synthesis of the chloroplast *psbD* gene product caused by mutations in two distinct nuclear genes of *Chlamydomonas*. Curr. Genet. 27: 263-269.

Yu K., and Pauls K.P. (1993). Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa. Plant. Mol. Biol. 22: 269-277.

Zaitlin D., Demars S., and Ma Y. (1993). Linkage of rhm, a recessive gene for resistance to southern corn leaf blight, to RFLP marker loci in maize (Zea mays) seedlings. Genome 36: 555-564.

Ubon Rajathanee University