การลดระดับการแสดงออกของรีพอร์เทอร์ยีนโดยการสร้างแฮร์พินอาร์เอ็นเอ ในยาสูบ *Nicotiana tabacum* L.

นายวีรากร หอทิมาวรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550

REPORTER GENE SILENCING BY PRODUCTION OF HAIRPIN RNA IN TOBACCO *Nicotiana tabacum* L.

Mr. Veerakorn Hotimavorakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Thesis Title	REPORTER GENE SILENCING BY PRODUCTION OF HAIRPIN RNA IN TOBACCO *Nicotiana tabacum* L.
By	Veerakorn Hotimavorakul
Field of Study	Biochemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Teerapong Buaboocha, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Teerapong Buaboocha, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Manchumas Prousoontorn, Ph.D.)

วีรากร หอทิมาวรกุล : การลดระดับการแสดงออกของรีพอร์เทอร์ยีนโดยการสร้างแฮร์พินอาร์เอ็นเอในยาสูบ *Nicotiana tabacum* L. (REPORTER GENE SILENCING BY PRODUCTION OF HAIRPIN RNA IN TOBACCO *Nicotiana tabacum* L.) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.ธีรพงษ์ บัวบูชา, 119 หน้า.

RNA interference (RNAi) เป็นกระบวนการลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกิดขึ้นหลังจากการถอดรหัสดีเอ็นเอโดยมีอาร์เอ็นเอสายคู่ (dsRNA) เป็นตัวชักนำ อาร์เอ็นเอสายคู่นี้จะมีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบส mRNA เป้าหมายทำให้เกิดการทำลาย mRNA นั้นในเวลาต่อมา การใช้ RNA interference เพื่อลดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมายเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาวิเคราะห์การทำงานของยีน ในการศึกษาครั้งนี้ได้สร้างยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Virginia Coker) แปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของยีนเบต้ากลูคูโลนิเดส (*gus*) ลดลง โดยทำการส่งถ่ายยีนที่ให้แฮร์พินอาร์เอ็นเอของยีน *gus* (hpGUS) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35S CaMV โดยอาศัย *Agrobacterium* เข้าสู่ยาสูบทรานเจนิกส์ที่มียีน *gus* แสดงออก จากนั้นคัดเลือกยาสูบแปลงพันธุ์ที่มีความสามารถต้านทานต่อกานามัยซิน นำยาสูบแปลงพันธุ์ที่ได้มาตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นยีน hpGUS ด้วยวิธี PCR โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอเป็นต้นแบบ พบว่ายาสูบแปลงพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกมีชิ้นยีน hpGUS จากการส่งถ่ายแทรกอยู่ การตรวจสอบการแทรกตัวของชิ้นยีนในจีโนมยาสูบด้วยวิธี Southern blot analysis พบว่าได้ยาสูบแปลงพันธุ์ 3 สายพันธุ์ซึ่งได้รับจากการสอดแทรกด้วยชิ้นยีน จากการทำ northern blot analysis พบว่ายาสูบแปลงพันธุ์มีการแสดงออกของยีน *gus* ในระดับ RNA ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับยาสูบชุดควบคุม เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนด้วยวิธีทาง histochemical และ spectrophotometric พบว่ายาสูบแปลงพันธุ์มีการแสดงออกของ GUS activity ต่ำกว่ายาสูบชุดควบคุมแสดงให้เห็นว่า hpGUS สามารถลดระดับการแสดงออกของยีน *gus* ในระดับโปรตีนได้

ภาควิชา.....ชีวเคมี...
สาขาวิชา.....ชีวเคมี...
ปีการศึกษา.....2550...

ลายมือชื่อนิสิต...[illegible]...
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4772486023 : MAJOR OF BIOCHEMISTRY
KEY WORD: RNAi / Hairpin RNA / β-glucuronidase / *Nicotiana tabacum* L.

VEERAKORN HOTIMAVORAKUL: REPORTER GENE SILENCING BY PRODUCTION OF HAIRPIN RNA IN TOBACCO *Nicotiana tabacum* L.
THESIS ADVISOR: ASSIST. TEERAPONG BUABOOCHA, Ph.D., 119 pp.

RNA interference (RNAi) is a post-transcriptional gene-silencing phenomenon induced by double-stranded RNA (dsRNA) molecules that contain nucleotide sequences complementary to target mRNA sequences causing degradation of the latter. It is an effective approach in inhibiting expression of a target gene for gene function analysis. Here, transgenic tobacco plants in which a *β*-glucuronidase (*gus*) gene was silenced were generated by introducing a *gus* hairpin (hpGUS) sequence into a transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Virginia Coker) harboring a *gus* gene by *Agrobacterium*-mediated transformation. Then, transgenic tobaccos were selected on MS media containing kanamycin. All putative independent lines were confirmed by PCR amplification for the presence of the hpGUS construct using their genomic DNA as template. Three independent lines of the hpGUS-expressing double transfomants were obtained from the regeneration of kanamycin-resistant cells and confirmed by Southern blot analysis. Northern blot analysis showed silencing of the *gus* transcript in all independent lines as compared with the control plants. The reduction of *gus* mRNA level was confirmed by histochemical and spectrophotometric GUS assay. GUS activity of the hpGUS-expressing double transfomants was lower than the control double tansformants indicating that hpGUS can silence expression of the *gus* gene at the protein level.

Department.....Biochemistry... Student's signature. Veerakorn....Hotimavorakul.....
Field of study....Biochemistry... Advisor's signature.....
Academic year...2007.....

ACKNOWLEDGEMENT

The completion of this thesis would not have been possible without the support and assistance of the people around me.

I thank my thesis advisor Assistant Professor Dr. Teerapong Buaboocha, for his support, guidance, and inspirations for excellence in science and great personality.

Sincere thanks and appreciation are due to Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Associate Professor Dr. Siriporn Sitthipraneed, Assistant Professor Dr. Manchumas Prousoontorn who serve as the members of the master thesis committees, for their helpful suggestion and comments.

I am most grateful to all members in Dr. Teerapong's laboratory, Biochemistry department for their assistance and encouragement, especially Srivilai Phean-o-pas, for her patience and guidance in carrying out various experiment. Thanks also to Santhana Nakapong, Bongkoj Boonburapong and Mayura Thongchuang for their constant support and advice.

Last but not least, I would like to extend my appreciation and sincere thanks to all that had helped me in one way or another during the course of the research

CONTENTS

Page

Page

Page

Page

Page

LIST OF TABLES

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

LIST OF ABBREVIATIONS

A	absorbance, 2′-deoxyadenosine (in a DNA sequence)
bp	base pairs
C	2′-deoxycytidine (in a DNA sequence)
^{O}C	degree Celsius
Da	Dalton
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	2′-deoxynucleoside 5′-triphosphate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
G	2′-deoxyguanosine (in a DNA sequence)
g	gram
GUS	β-glucuronidase
hpGUS	hairpin GUS
hr	hour
HCl	hydrochloric acid
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
kb	kilobase pairs in duplex nucleic acid, kilobases in single-standed nucleic acid
KCl	potassium chloride
kDa	kiloDalton
KOH	potassium hydroxide
l	liter
LB	Luria-Bertani
Mg^{2+}	magnesium ion
µg	microgram
µl	microliter
µM	micromolar
M	mole per liter (molar)
mA	milliampere
mg	milligram
min	minute
ml	milliliter

mM	millimolar
MW	molecular weight
N	normal
ng	nanogram
NH_4Cl	ammonium chloride
NH_4OH	ammonium hydroxide
nm	nanometer
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomole
PNPG	*p*-nitrophenyl-β-D-glucuronide
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
Rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
T	2′-deoxythymidine (in a DNA sequence)
Tris	tris (hydroxyl methyl) aminomethane
UV	ultraviolet
V	voltage
v/v	volume by volume
vir	virulence
w/w	weight by weight
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid