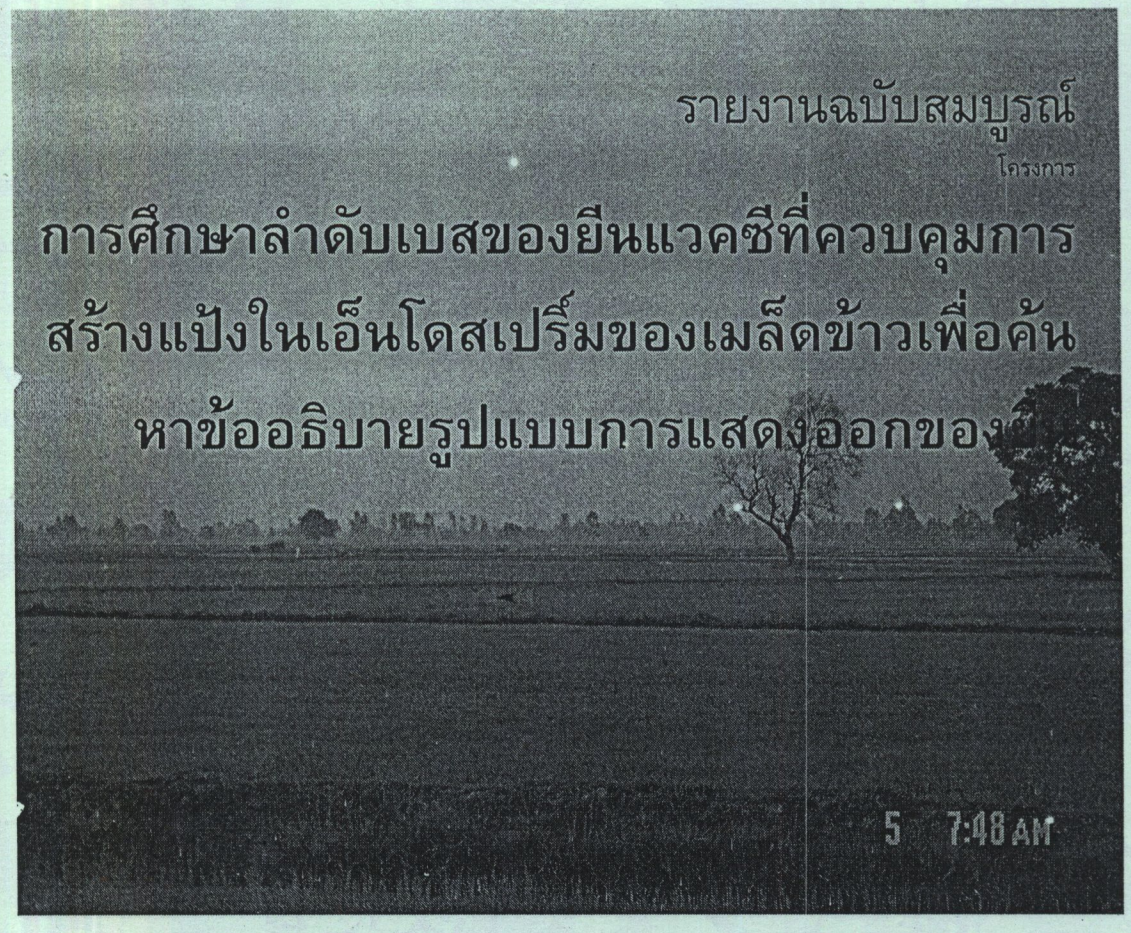
R-247003



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาลำดับเบสของยีนแวคซีที่ควบคุมการสร้างแป้งในเอ็นโดสเปริ์มของเมล็ดข้าวเพื่อค้นหาข้ออธิบายรูปแบบการแสดงออกของ

โดย

รศ. ดร. ปรีชา ประเทพา และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

30 มิถุนายน 2548

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาลำดับเบสของยีนแวคซีที่ควบคุมการสร้างแป้งในเอ็นโดสเปริ์มของเมล็ดข้าวเพื่อค้นหาข้ออธิบายรูปแบบการแสดงออกของยีน

โดย

รศ. ดร. ปรีชา ประเทพา และคณะ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (โครงการ BRT) ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณโครงการ BRT ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยยีนแวคซีของข้าวมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้ผู้วิจัยสามารถผลิตผลงานวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานที่สามารถนำไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติได้ อันเป็นแนวทางยกระดับความรู้ความสามารถของนักวิจัยวิทยาศาสตร์พื้นฐานให้มีมาตรฐานเข้าสู่ความเป็นสากลมากขึ้น

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับเบสของยีนแวคซีบริเวณเป้าหมายที่มีรายงานว่าถ้ามีการเปลี่ยนแปลงบริเวณดังกล่าวจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน บริเวณดีเอ็นเอเป้าหมายกำหนดไว้เพื่อศึกษา 3 แห่งคือ บริเวณ splice site ของ intron 1, Exon 2 และ Exon 7

บริเวณ splice site ของ intron 1 ประกอบด้วย splice donor site (ด้าน 5' ของ intron) และ splice acceptor site (ด้าน 3' ของ intron) ข้าวที่มีปริมาณอมิโลสต่ำ (<19%) และข้าวเหนียว เบสของ splice donor site คือ GT และเบสของ splice acceptor site คือ AG ในขณะที่พันธุ์ข้าวที่มีอมิโลสปานกลางถึงสูงจะมีเบส GG และ AG ตามลำดับ การวิเคราะห์ลำดับเบสความยาว 332-333 คู่เบสของตัวอย่างพันธุ์ข้าวพบว่ามีความหลากหลายของเบสบริเวณ splice donor site (GG และ GT) และ splice acceptor site (AG, AD, AR, AS และ AT)

Exon 7 ของยีนแวคซีมีขนาด 101 คู่เบส การแปลรหัสของบริเวณนี้ โคดอนเริ่มต้นจะได้เบส G จากปลาย 3' ของ exon 6 มารวมกับเบส GT กลายเป็นโคดอน GGT และแปลรหัสได้กรดอมิโนจำนวน 34 หน่วย มีรายงานว่าโคดอนที่ 32 เกิดมิวเทชันโดย มีการเปลี่ยนแปลงจากโคดอน TGG (แปลรหัสเป็น Trp) เป็น TGA เป็นรหัสหยุด (termination codon หรือ stop codon) ซึ่งรายงานโดย Isshiki et al. (2001) ที่พบในข้าวพันธุ์ EM 21 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวเหนียวที่เกิดจากการกลายพันธุ์จากข้าวเจ้าโดยการชักนำด้วยรังสี

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon 7 ในพันธุ์ข้าวไทยจำนวน 13 พันธุ์และข้าวเหนียวพื้นบ้านจากเวียดนาม พบว่าโคดอน TGG ของข้าวจำนวน 13 พันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่พบการเปลี่ยนแปลง TGG ไปเป็น CGG (แปลรหัสเป็น Arg) พบในข้าวพันธุ์ กข 15

ข้าวเหนียว ข้าวเจ้าอมิโลสสูงและข้าวเจ้าอมิโลสต่ำ บริเวณ exon 2 มีการสอดแทรกของเบส 23 คู่เบส จำนวน 2 ชุด ยกเว้นข้าวพันธุ์หอมมะลิที่มีการสอดแทรกของเบสไม่ครบชุด (ผลของการสอดแทรกของเบสชุดนี้ ทำให้เกิดการแปลรหัสเปลี่ยนแปลงไปในรูปแบบที่เรียกว่า frame shift mutation ทำให้การแปลรหัสหยุดลงที่รหัสหยุดคือ TGA ที่เกิดจากการเรียงตัวกันใหม่ของเบส

ผลจากการศึกษาในข้าวจำนวน 14 พันธุ์ที่เป็นข้าวเหนียวและข้าวเจ้าพบว่าข้าวทุกพันธุ์มีการสอดแทรกของ 23 คู่เบส ที่บริเวณดีเอ็นเอส่วนที่เป็น exon 2

Abstract

The rice *waxy* gene encodes an enzyme granule-bound starch synthase (GBSS), which plays a critical role in amylose synthesis. This study aims to identify DNA sequences of the gene at three positions; the splice sites of intron 1, DNA sequences of exon 2 and exon 7, which plays an important role in the gene expression.

The genomic sequence of rice varieties bearing the splice-site alternations of mutant intron 1. The point mutations that altered the 5'-splice site GG to GT and the 3'-splice site AG to AT, AD(A/G/T), AR (A/G), AS(C/G) of intron1. DNA sequences of exon 7 of the 14 glutinous rice varieties was not found termination codon (TGA) that there has been reported previously. The duplicated of 23 bp sequence motif, ACGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCC, was found in the exon 2 in both glutinous and non-glutinous rice, except a non-glutinous variety, Hom Mali. When tranlation was predicted to be initiated from the first start codon ATG, the translation was terminated prematurely at different positions in exon 2 of all rice varieties.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ยีนแวคซีเป็นยีนที่มีความสำคัญยีนหนึ่ง ยีนนี้จะกำหนดการสังเคราะห์เอ็นไซม์ GBSS ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แป้งอมิโลส ซึ่งแป้งชนิดนี้เป็นสิ่งกำหนดคุณภาพการหุงต้มของข้าว ยีนแวคซีในข้าวไทยมีการศึกษาความหลากหลายของยีนนี้โดยศึกษาจากดีเอ็นเอเครื่องหมายคือ ไมโครแซทเทลไลท์ จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการ BRT ซึ่งได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ และองค์ความรู้จากการวิจัยของโครงการนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ เช่นเดียวกัน

การแสดงออกของยีนนี้ มีนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามศึกษากลไกการแสดงออก ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยใน และมีข้อสรุปออกมาเป็นระยะ ๆ แต่ข้อสรุปของผลงานวิจัยมักจำกัดอยู่เพียงพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง ไม่สามารถสรุปเป็นองค์ความรู้ที่ใช้อธิบายในภาพรวมได้ ดังนั้นการศึกษาในทำนองเดียวกันนี้ยังมีความจำเป็นในข้าวไทยที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากเพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่และนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการบริหารจัดการทรัพยากรพันธุกรรมในแง่มุมของข้อมูลยีนแวคซีของข้าวไทยในอนาคตต่อไป

Executive Summary

Rice starch consists of amylose and amylopectin, the former coponent is a major determinant of processing, cooking quality and consumption of rice grains. The rice *waxy* gene (*wx)* encodes a granule-bound starch synthase (GBSS) necessary for amylose synthesis in endosperm. Prevoiusly, knowledge of rice *waxy* in Thai rice has been published in interntional journal, resulting from supporting of BRT funding agency. Also, the results obtained from this research project have been accepted to publish in an international journal. Rice *waxy* gene has been studied for a period of time using various rice varieties having different genetic background. Thus, there is still unclear in gene expression affected by internal and/or external factors. Therefore, understanding the variation of *waxy* gene and processes or mechanism of gene expression in Thai rice are very important, knowledge obtained from research projects would play an important role in rice genetic resource management in the future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อ	**ข**
Abstract	**ค**
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	**ง**
Executive Summary	**จ**
สารบัญภาพ	**ช**
สารบัญตาราง	**ซ**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการ	**3**
บทที่ 3 ผลการศึกษา	**5**
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์	**15**
เอกสารอ้างอิง	**18**
ภาคผนวก	**19**

สารบัญภาพ

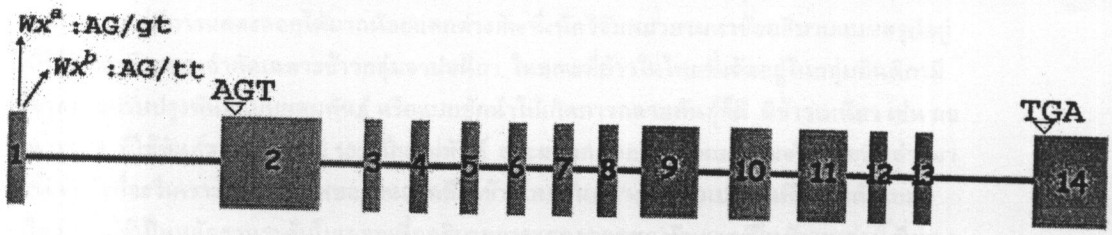
		หน้า
ภาพที่ 3.1	ลำดับเบสบริเวณ 3' splice acceptor site ของ intron 1	7
ภาพที่ 3.2	เปรียบเทียบลำดับเบสของ exon 7 ในพันธุ์ข้าวที่ศึกษา	9-10
ภาพที่ 3.3	เปรียบเทียบลำดับเบสของ exon 2 ในพันธุ์ข้าวที่ศึกษา	11
ภาพที่ 3.4	ลำดับกรดอะมิโนจากการแปลรหัสบริเวณ exon 2 ในพันธุ์ข้าวที่ศึกษา	14

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3.1	ลำดับเบสบริเวณ 5' splice donor site และ 3' splice acceptor site ในพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา	5

บทนำ ๑

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน GBSS หรือยีนแวคซีโดยใช้ข้อมูลของยีน GBSS ที่มีอยู่ใน GenBank (Accession number AF031162) พบว่า Waxy gene ประกอบด้วยดีเอ็นเอบริเวณที่เป็น exon จำนวน 14 exon และดีเอ็นเอส่วนที่เป็น intron จำนวน 13 intron ยีนนี้จะกำหนดการสร้างเอนไซม์ granule-bound starch synthase (GBSS enzyme) เอนไซม์ชนิดนี้เรียกชื่ออีกอย่างหนึ่งว่า Waxy protein มีขนาดโมเลกุลประกอบด้วย กรดอะมิโน 609 หน่วย ซึ่งขนาดของดีเอ็นเอส่วนที่ใช้เป็นต้นแบบของการแปลรหัส (หรือ mRNA) จำนวน 1,827 bp ไดอะแกรมของยีนนี้แสดงดังภาพต่อไปนี้ การจัดระบบของยีน GBSS ในข้าว บริเวณที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมคือ exon ส่วนที่เป็นเส้นตรงอยู่ระหว่างรูปสี่เหลี่ยมคือ intron



ยีน GBSS มีอยู่ 2 อัลลีลส์ คือ อัลลีล a (Wx^a) และอัลลีล b (Wx^b) โดยอัลลีล a มีการแสดงออกของยีนมากกว่าอัลลีล b ประมาณ 10 เท่า โดยวัดจากปริมาณของโปรตีน Waxy (หรือเอนไซม์ GBSS) อัลลีล a จะมีเบสที่เป็นเบสเริ่มต้นของ intron1 เป็น G ในขณะที่เบสเริ่มต้นของอัลลีล b คือ T (ดูภาพด้านบนประกอบ) ซึ่งการแสดงออกของอัลลีล a มากกว่าอัลลีล b เป็นผลสืบเนื่องจากการเกิดมิวเทชันของเบสดังกล่าวนี้จาก G ไปเป็น T

รายละเอียดของกลไกการแสดงออกของ Waxy gene ที่เบสตำแหน่งเริ่มต้นของ intron 1 ที่เปลี่ยนแปลงจาก G เป็น T ซึ่ง เป็นบริเวณรอยต่อระหว่าง Exon 1 กับ Intron 1 (the 5' splice site) โดยเบสเริ่มต้นของ Intron 1 ในพันธุ์ข้าวกลุ่มอมิโลสปานกลางและสูงจะมีเบสชนิด G (GGTATA) พันธุ์ข้าวที่มีเบส G เรียกว่าอัลลีล a (Wx^a) ซึ่งถือว่าเป็น wild-type allele พันธุ์ข้าวที่มีอมิโลสต่ำจะมีเบสชนิด T (GTTATA) ข้าวกลุ่มนี้จะมีอัลลีล b (Wx^b) เป็นความโชคดีของชนชาวเอเชียที่มีพันธุ์ข้าวกลุ่มนี้ที่เมื่อหุงสุกแล้วจะนุ่มเหนียว โดยอัลลีล b เกิดขึ้นโดยธรรมชาติจากการเกิดการผ่าเหล่า หรือมิวเท ชัน (mutation) จากเบส G ไปเป็นเบส T ผลของการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G ไปเป็น T ส่งผลทำให้กลไกของการแสดงออกของยีนที่มีอัลลีล b มีระดับการแสดงออกลดลง เมื่อเทียบกับพันธุ์ข้าวที่มีอัลลิล a ซึ่งกลไกระดับโมเลกุลผลจากการศึกษาดังที่ได้กล่าวถึงในตอนต้นแล้วนั้นสรุปได้ว่า การแสดงออกของอัลลีล b น้อยกว่าการแสดงออกของอัลลีล a เนื่องจากพันธุ์ข้าวที่มีอัลลีล b มี GBSS mRNA 2 แบบ คือ แบบที่มีความสมบูรณ์และแบบที่ผิดปกติ GBSS mRNA แบบที่สมบูรณ์นั้นมีขนาด 2.3 bp ซึ่งในกระบวนการตัด Intron ออกไปและต่อ Exon เข้าด้วยกันเป็นไปโดยสมบูรณ์ ส่วน GBSS mRNA แบบที่ไม่สมบูรณ์นั้นเกิดจากการตัด Intron 1 ออกไปไม่ได้และยังคงติดอยู่กับ Exon ของยีนนี้ที่ต่อกันตามลำดับ ดังนั้นทำให้เซลล์มีสัดส่วนของ GBSS mRNA ที่สมบูรณ์น้อยทำให้มีปริมาณการแสดงออกของยีนได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวที่มี GBSS mRNA แบบสมบูรณ์ทั้งหมดในเซลล์ของพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอมิโลสปานกลางและสูง (Wang *et al., 1995; Cai et al., 1998; Isshiki et al., 1998; Isshiki et al., 2001)*

มีผลงานวิจัยล่าสุดและน่าสนใจมากคือผลงานวิจัยของ *Isshiki et al., (2001)* ที่พบว่าในข้าวเจ้าพันธุ์ Kinmaze มีอัลลีล b, ข้าวเจ้า Kinmaze กลายพันธุ์เป็นข้าวเหนียว และ ข้าวเหนียวจาปอนิกาพันธุ์ Mussshimochi มีปริมาณของ GBSS mRNA แบบสมบูรณ์ (ไม่มีดีเอ็นเอส่วน intron 1 ติดอยู่) และ GBSS mRNA แบบไม่สมบูรณ์ (unspliced GBSS mRNA, มีดีเอ็นเอส่วน intron 1 ติดอยู่) เช่นเดียวกันกับที่เคยมีรายงานในทำนองนี้ แต่ผลงานที่น่าสนใจคือ ทีมวิจัยทีมนี้พบว่า GBSS mRNA แบบสมบูรณ์พบในข้าวทั้งสามชนิดนี้ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน คือ GBSS mRNA แบบสมบูรณ์ในข้าวเจ้ากลายพันธุ์ และข้าวเหนียว พบในปริมาณเพียง 20% ของปริมาณที่พบในข้าวเจ้า ส่วน GBSS mRNA ที่ไม่สมบูรณ์มีปริมาณไม่แตกต่างกันในข้าวทั้งสามชนิด แต่ที่น่าสนใจคือ เวลาครึ่งชีวิต (half-life) ของ GBSS mRNA ของข้าวเจ้ากลายพันธุ์และข้าวเหนียว เท่ากับ 5.3 นาที ในขณะที่ GBSS mRNA แบบสมบูรณ์ของข้าวเจ้ามีเวลาครึ่งชีวิตเท่ากับ 17.5 นาที จากผลการตรวจสอบสาเหตุของนักวิจัยทีมนี้พบว่า มีกลไกธรรมชาติที่เรียกว่า **"Nonsense-mediated decay"** หรือ NMD เกิดขึ้นกับ GBSS mRNA ของข้าวเจ้ากลายพันธุ์และข้าวเหนียว

(*Nonsense-mediated decay means the loss of mRNAs carrying premature stop codon. NMD is a process by which cells recognize and degrade nonsense mRNAs to prevent possibly toxic effects of truncated peptides (Rajavel and Neufeld, 2001)* สาเหตุที่ GBSS mRNA แบบสมบูรณ์ที่เวลาครึ่งชีวิตสั้นเกิดจากการเกิดมิวเทชันแบบ nonsense (ทำให้เกิด stop codon) ที่บริเวณ exon 2 ในข้าวเหนียว และใน exon 7 ในข้าวเจ้ากลายพันธุ์

สืบเนื่องจากความจริงที่ว่า การแสดงออกของยีนแวคซีในข้าวเหนียวและข้าวเจ้ากลุ่มอมิโลสต่ำ (<19%) แม้ว่ามีอัลลีลเดียวกันคือ *Wx*^{a} แต่มีการแสดงออกได้มากน้อยแตกต่างกัน ซึ่งนักวิจัยพยายามหาข้ออธิบายแบบสรุปอยู่ในเวลานี้ แต่ข้าวที่ใช้ศึกษามีแวดวงจำกัดเฉพาะข้าวกลุ่มจาปอนิกา ในขณะที่ข้าวในไทยซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มอินดิกามีข้าวสายพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมพันธุ์ หรือแบบชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ก็ดี มีข้าวเหนียว เช่น กข 6 และข้าวเจ้า เช่น กข 15 ที่ใช้พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นแม่พันธุ์ และผนวกกับการค้นพบความจริงตามที่กล่าวมานี้ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแวคซีในข้าวไทยพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณใดบริเวณใด ที่อาจใช้เป็นหลักฐานระดับโมเลกุลเพื่ออธิบายการแสดงออกของยีนแวคซีในข้าวเหล่านี้ ซึ่งอาจพบว่ามีความเหมือนกันระหว่างข้าวจาปอนิกาและข้าวอินดิกา หรืออาจพบข้อแตกต่างระหว่างข้าวสองกลุ่มนี้ รวมทั้งอาจพบข้อแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอระหว่างข้าวไทยพันธุ์ต่าง ๆที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบหลักฐานบางอย่างที่อาจจะใช้เป็นข้ออธิบายถึงสาเหตุที่ยีนแวคซีมีการแสดงออกได้หมือนกันหรือแตกต่างกันในข้าวพันธุ์ต่าง ๆที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์โดยการใช้รังสีชักนำและคัดเลือกพันธุ์

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้

เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสเป้าหมายคือ 1) **splice acceptor site ของ intron 1, เบสเริ่มต้นของ exon 2 ของยีนแวคซี** 2) **ลำดับเบสของ exon 7** (ขนาด 101 bp) และ 3) **23 bp insertions บริเวณ exon 2** ซึ่งบริเวณเป้าหมายเหล่านี้ล้วนแล้วมีรายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของเบสของดีเอ็นเอจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน โดยการศึกษาจะใช้ตัวอย่างข้าวพันธุ์ต่างๆของไทยทั้งที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการ ๒

ตัวอย่างพันธุ์ข้าว

1) พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเบสบริเวณ splice acceptor site ของ intron 1 และเบสเริ่มต้นของ exon 2 ของยีนแวคซี ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 กข 15 หอมนางนวล (ข้าวเหนียวพื้นบ้าน) กข 6 ข้าวเหนียวจากชนกลุ่มทางวัฒนธรรมทางภาคเหนือ ได้แก่ แบลเล่าเปลา แบลเปลาซัง เบ้ากู๋ เป้นเนิรยิ้ม จงาย ชิว แบเด๋าเดอก และข้าวเหนียวพื้นบ้านจากลาว ได้แก่ ลูกปา ขาวขน พันธุ์แผ่ อีดูก ดอลาย

2) พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาลำดับเบสของ exon 7 จำนวน 14 พันธุ์ แบ่งออกเป็น ข้าวเหนียว 6 พันธุ์ คือ ดอวี ดอเตี้ย ดอเขี้ยวงู กข 6 หอมนางนวล และ ข้าวเหนียวป่า (*O. nivara*) ข้าวเจ้าที่มีปริมาณอมิโลสต่ำ คือ ขาวดอกมะลิ 105 (จากร้อยเอ็ด และมหาสารคาม) กข 15 และข้าวเจ้าที่มีปริมาณอมิโลสสูง ได้แก่ นางพญา 132 เฉี้ยงพัทลุง ปทุมธานี 60 และ พิษณุโลก 60-2

3) พันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาการสอดแทรกของ 23 bp บริเวณลำดับเบสของ exon 2 แบ่งออกเป็นข้าวเหนียว 13 พันธุ์ ได้แก่ ก่ำ (จากมุกดาหาร) เหนียวอุบล หางยี 71 อุคำ ป้องแอ้ว ข้าวไร่เกษตร ก่ำ (จากร้อยเอ็ด) หอมนางนวล ขี้ตม ข้าวสกลนคร และ กข 6 ข้าวเจ้าได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15

เทคนิคที่ใช้ศึกษา

1) **การสกัด DNA** ใช้วิธี CTAB ที่สกัด DNA ตามขั้นตอนของ Doyle and Doyle (1987) ที่ปรับเปลี่ยนรายละเอียดเล็กน้อยตามขั้นตอนของ Prathepha and Baimai (2003)

2) **การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)**

2.1 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเบสบริเวณ splice acceptor site ของ intron 1 จะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ที่มีลำดับเบสดังนี้ WXF3 (5'-ATGTCATATCCCCTAGCCA-3') และ WXR3 (5'-TGGTTGTCTAGCTGTTGC-3') เงื่อนไขการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นดังนี้ denatured at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94° C for 1 min, 55° C for 1 min and 72° C for 2 min. The final extension was at 72 °C for 5 min ปริมาตรรวมขององค์ประกอบต่างๆ คือ 40 □l ประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTPs, 10 pmol each primer, and 0.5 units *Taq* polymerase (Promega)

2.2 การศึกษาลำดับเบสของ exon 7 ของยีนแวคซี จะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบครอบคลุม exon 7 มีลำดับเบสดังนี้ EXON7-F (5'-CTTCGAAGGAATCCA-3') และ EXON7-R (5'-ACAGAATGCAGTGTGCA-3') เงื่อนไขการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นดังนี้ ปริมาตรรวมขององค์ประกอบต่างๆ คือ 40 □l ประกอบด้วย 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTPs, 10 pmol each primer, and 0.5 units *Taq* polymerase (Promega) เงื่อนไขของการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นดังนี้ denatured at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94° C for 1 min, 60° C for 1 min and 72° C for 2 min. The final extension was at 72 °C for 5 min. After PCR, the amplified products was electrophoresed 45 min at 75 V. Bands were detected by ethidium bromide staining. PCR products were cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison,WI). Sequencing of cloned products was performed by using the M13 forward or reverse primers with a BigDye Terminator kit (PE Biosystem) and ABI PRISM DNA sequencing system

2.3 การศึกษาการเกิดการสอดแทรกของ 23 bp จะใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Wanchana et al.(2003) มีลำดับเบสดังนี้ Glu-23F (5'-TGCAGAGATCTTCCACAGCA-3') และ Glu-23R (5'-GCTGGTCGTCACGCTGAG-3') องค์ประกอบต่างๆของปฏิกิริยาลูกโซ่ และการวิเคราะห์ลำดับเบสเป็นแบบเดียวกันกับ (2.2) และเงื่อนไขของการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่เป็นดังนี้ denatured at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles of 94° C for 1 min, 55° C for 1 min and 72° C for 1 min. The final extension was at 72 °C for 1 min

ผลการศึกษา ๓

3.1 การเปลี่ยนแปลงของเบสบริเวณ splice donor/acceptor sites ของ intron 1 และ โคดอนเริ่มต้นของ exon 2 ของยีนแวคซี

บริเวณ splice site ของ intron 1 ประกอบด้วย splice donor site (ด้าน 5' ของ intron) และ splice acceptor site (ด้าน 3' ของ intron) ข้าวที่มีปริมาณอมิโลสต่ำ (<19%) และข้าวเหนียว เบสของ splice donor site คือ GT และเบสของ splice acceptor site คือ AG ในขณะที่พันธุ์ข้าวที่มีอมิโลสปานกลางถึงสูง จะมีเบส GG และ AG ตามลำดับ การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ใช้ไพรเมอร์ WxF3/R3 จะได้ความยาวของลำดับเบส 332-333 คู่เบส ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา นิวคลีโอไทด์บริเวณ**5'-splice donor site/ 3'-splice acceptor site** และกรดอมิโนชนิดแรกที่แปลรหัสได้จากโคดอนแรกของ exon 2

Cultivar	**5'-splice donor site/ 3'-splice acceptor site**	**First codon of Exon 2/ Amino acid**
Lemont (HAC) (USA rice)	GG.....AG	TGC= Cys
KDML 105 (LAC)*	GT.....AG	TGC= Cys
RD 15 (LAC)	GT.....AD(A/G/T)	GGC= Gly
RD 6 (G)**	GT.....AR(A/G)	GRC= Asp / Gly
Hohm Nahng Nuan (G)	GT.....AS(C/G)	TGC= Cys
Bael Jao Blao (G)	Not got data	
Bael Plao Chong (G)	GT.....AG	TGC= Cys
Bao Ku (G)	GT.....AG	TGC= Cys
Pirnneonyim (G)	GT.....AG	TGC= Cys
Ja Ngai (G)	GT.....AG	TGC= Cys
Siu (G)	GT.....AG	TGC= Cys
Be Dao Derk (G)	GT.....AT	TCC= Ser
Look Pla (G)	GT.....AG	TGC= Cys
Khaw Khon (G)	GT.....AG	TGC= Cys
Phan Pae (G)	GT.....AG	TGC= Cys
E-Dook (G)	GT.....AG	TGC= Cys
Daw Lai (G)	GT.....AG	TGC= Cys

* Low amylose rice

** Glutinous rice

ข้อมูลเปรียบเทียบความหลากหลายของ 3' splice site ของ intron 1 ที่พบในข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 กข 15 ข้าวเหนียวหลายพันธุ์ คือ หอมนางนวล แบเด๋าเดอก และความหลากหลายของโคดอนที่ 1 ของ exon 2 ได้จากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสในตำแหน่งเดียวกันของพันธุ์ข้าวอื่นๆ ที่ใช้ศึกษา ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับเบสจะใช้โปรแกรม CLUSTAL W (V. 1.82) แสดงในภาพที่ 3.1 ดังนี้

ภาพที่ 3.1 เปรียบเทียบลำดับเบสของยีนแวคซีที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ WxF3/R3 เพื่อศึกษาชนิดของนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' splice site ของ intron 1 แสดงด้วยตัวหนาและขีดเส้นใต้ สัญลักษณ์ * แสดงถึงชนิดเบสไม่แตกต่างกัน

```
Phan Pae-F3R3       TATGTCATATCCCCTAGCCACCCAAGAAACTGCTCCTTAAGTCCTTATAAGCACATATGG 60
Ja Ngai-F3R3        TATGTCATATCCCCTAGCCACCCAAGAAGCTGCTCCTTAAGTCCTTATAAGCACATATGG 60
Hohmnahngnuan       -ATGTCATATCCCCTAGCCACCCAAGAAACTGCTCCTTAAGTCCTTATAAGCACATATGG 59
RD6-F3R3            -ATGTCATATCCCCTAGCCACCCAAGAAACTSCTCCTTAAGTCCTTATAAGCACATATGG 59
Be Dao Derk-F3R3    -ATGTCATATCCCCTAGCCACCCAAGAAACTGCTCCTTAAGTCCTTATAAGCACATATGG 59
                     *************************** ** ************************** 

Phan Pae-F3R3       CATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACAATTTTTTTAAAAACTTTTGGTCCTTTT 120
Ja Ngai-F3R3        CATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACAATTTTTTTAAAAACTTTTGGTCCTTTT 120
Hohmnahngnuan       CATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACAATTTTTTTAAAAACTTTTGGTCCTTTT 119
RD6-F3R3            CATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACAATTTTTTTAAAAACTTTTGGTCCTTTT 119
Be Dao Derk-F3R3    CATTGTAATATATATGTTTGAGTTTTAGCGACAATTTTTTTAAAAACTTTTGGTCCTTTT 119
                    ************************************************************ 

Phan Pae-F3R3       TATGAACGTTTTAAGTTTCACTGTCTTTTTTTTTCGAATTTTAAATGTAGCTTCAAATTC 180
Ja Ngai-F3R3        TATGAACGTTTTAAGTTTCACTGTCTTTTTTTTTCGAATTTTAAATGTAGCTTCAAATTC 180
Hohmnahngnuan       TATGAACGTTTTAAGTTTCACTGTCTTTTTTTTTCGAATTTTAAATGTAGCTTCAAATTC 179
RD6-F3R3            TATGAACGTTTTAAGTTTCACTGTCTTTTTTTTTCGAATTTTAAATGTAGCTTCAAATTC 179
Be Dao Derk-F3R3    TATGAACGTTTTAAGTTTCACTGTCTTTTTTTTTCGAATTTTAAATGTAGCTTCAAATTC 179
                    ************************************************************ 

Phan Pae-F3R3       TAATCCCCAA-TCCAAATTGTAATAAAC-TTCAATTCTCCTAATTAACATCTTAATTCAT 238
Ja Ngai-F3R3        TAATCCCCAA-TCCAAATTGTAATAAAC-TTCAATTCTCCTAATTAACATCTTAATTCAT 238
Hohmnahngnuan       TAATCCCCAA-TCCAAATTGTAATAAAC-TTCAATTCTCCTAATTAACATCTTAATTCAT 237
RD6-F3R3            TAATCCCCAA-TCCAAATTGTAATAAAC-TTCAATTCTCCTAATTAACATCTTAATTCAT 237
Be Dao Derk-F3R3    TAATCCCCNAATCCAAATTGTAATAAACATTCAATTCTCCTMNTTAACMTCTTAATTCCT 239
                   ******** * ***************** ************  ***** ********* * 

Phan Pae-F3R3       TTATTTG-AAAACBAGTTCAA-ATT-CTTTTAGGCTCACCAAACCTTAA--ACAATTCAA 293
Ja Ngai-F3R3        TTATTTG-AAAACCAGTTCAA-ATT-CTTTTAGGCTCACCAAACCTTAA--ACAATTCAA 293
```

```
Hohmnahngnuan       TTATTTG-AAAACCAGTTCAA-ATT-TTTTTAGGCTCACCAAACCTTAA--ACAATTCAA 292
RD6-F3R3            TTATTTG-AAAACCAGTTCAA-ATT-CTTTTAGGVTCACCAAACCTTAA--ACAATTCAA 292
Be Dao Derk-F3R3    TTATTTGGAAAACCVGTTVCACATWACYNYCACGTGCTCCNACMMATACTYACAAACATT 299
                    ******* *****  ***  * **       * *  * ** *    **   ****

Phan Pae-F3R3        TTCAGTGCAGAGATCTTCCACAGCAACAGCTAGACAACCA 333
Ja Ngai-F3R3        TTCAGTGCAGAGATCTTCCACAGCAACAGCTAGACAACCA 333
Hohmnahngnuan       TTCASTGCAGAGATCTTCCACAGCAACAGCTAGACAACCA 332
RD6-F3R3            TTCARTRCAGAGATCTTCCACAGCAACAGCTAGACAACCC 332
Be Dao Derk-F3R3    CCCATTCCAGRKG----SCASAR-AATAYTCCCCCAGG-- 332
                      ** * ***        ** *  ** *      **
```

Exon 2 →

3.2 ลำดับเบสของ exon 7 และการแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน

Exon 7 ของยีนแวคซีมีขนาด 101 คู่เบส การแปลรหัสของบริเวณนี้ โคดอนเริ่มต้นจะได้เบส G จากปลาย 3' ของ exon 6 มารวมกับเบส GT กลายเป็นโคดอน GGT และแปลรหัสได้กรดอมิโนจำนวน 34 หน่วย มีรายงานว่าโคดอนที่ 32 เกิดมิวเทชันโดย มีการเปลี่ยนแปลงจากโคดอน TGG (แปลรหัสเป็น Trp) เป็น TGA เป็นรหัสหยุด (termination codon หรือ stop codon) ซึ่งรายงานโดย Isshiki et al. (2001) ที่พบในข้าวพันธุ์ EM 21 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวเหนียวที่เกิดจากการกลายพันธุ์จากข้าวเจ้าโดยการชักนำด้วยรังสี

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ exon 7 ในพันธุ์ข้าวไทยจำนวน 13 พันธุ์และข้าวเหนียวพื้นบ้านจากเวียดนาม พบว่าโคดอน TGG ของข้าวจำนวน 13 พันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่พบการเปลี่ยนแปลง TGG ไปเป็น CGG (แปลรหัสเป็น Arg) พบในข้าวพันธุ์ กข 15 แสดงในภาพที่ 3.2

>Nahng Pa-yah 132
DNA sequence:
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
Deduced Amino acid:
E D V V F V C N D **W** H T G P L A S Y L K N N Y Q P N
G I Y R N A K
>PSL60-2
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>Chiangphatthalung
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>KDML105
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>Daw Vee
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>Daw Tia
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>Phatthalung 60
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>RD 6
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>Daw Khaew Ngoo
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATTTACAGGAATGCAAAG
>Hawm Nahng Nuan
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>Khaw Dawk Mali 105
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>Khaw Niaw Tai Dam
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]CACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>Oryza sativa (Acc.**GS44000-1**)
GTGAGGATGTTGTGTTCGTCTGCAACGAC[TGG]YAMACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG
>RD15

GTGAGGATGTTGTGTTCGCCTGCAACGACCGGCACACTGGCCCACTGGCGAGCTACCTGAAGAACAACTA
CCAGCCCAATGGCATCTACAGGAATGCAAAG

E D V V F V C N D **R** H T G P L A S Y L K N N Y Q
P N G I Y R N A K

ภาพที่ 3.2 การเปรียบเทียบลำดับเบสของ exon 7 และลำดับกรดอมิโนที่ได้จากการแปลรหัสในพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาจำนวน 14 พันธุ์

3.3 การสอดแทรกของนิวคลีโอไทด์ 23 bp บริเวณลำดับเบสของ exon 2

ข้าวเหนียวพันธุ์ Musashimochi ของญี่ปุ่นมีรายงานว่าบริเวณ exon 2 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการแปลรหัส ถ้านับจากโคดอนเริ่มต้นแปลรหัส (start codon) คือ ATG ไปอีกที่ตำแหน่งเบส +111 จะมีลำดับเบสจำนวน 23 คู่เบสสอดแทรกเข้ามา (23 bp duplication) และจากรายงานของ Wanchana et al. (2003) ที่ศึกษาในข้าวไทย พบว่าข้าวเหนียวและข้าวเจ้าอมิโลสต่ำ บริเวณ exon 2 มีการสอดแทรกของชุดเบสดังกล่าว ผลของการสอดแทรกของเบสชุดนี้ ทำให้เกิดการแปลรหัสเปลี่ยนแปลงไปในรูปแบบที่เรียกว่า frame shift mutation ทำให้การแปลรหัสหยุดลงที่รหัสหยุดคือ TGA ที่เกิดจากการเรียงตัวกันใหม่ของเบส (the presence of premature translation termination codon)

ผลจากการศึกษาในข้าวจำนวน 15 พันธุ์พบว่าข้าวทุกพันธุ์มีการสอดแทรกของ 23 คู่เบส ที่บริเวณดีเอ็นเอส่วนที่เป็น exon 2 แสดงดังภาพดังนี้

ภาพที่ 3.3 ลำดับเบสของดีเอ็นเอส่วนที่เป็น exon 2 ในข้าว 12 พันธุ์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ Exon 2 ของพันธุ์ข้าวที่มีในฐานข้อมูล NCBI สังเกตลำดับเบสที่เป็น 23 คู่เบสที่สอดแทรกใน exon 2 ของข้าวเหนียวและข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1

ก่ำ(ร้อยเอ็ด)	----------ACCATGT-GG-TCTCA 14
เหนียวอุบล	----------ACCATGTCGG-TCTCA 15
อุคำ	----------GACCATGT-GG-TCTCA 15
ชัยนาท 1	----------GGTAACCATGT-GG-TCTCA 18
ป้องแอ้ว	----------ACACATGTCGGCTCTCA 17
Exon 2	TGCAGAGATCTTCCACAGCAACAGCTAGACAACCACCATGTCGGCTCTCA 50
ข้าวไร่เกษตร	----------ACACATGTCGGCTCTCA 17
ข้าวสกลนคร	----------GAACACATGTCGGCTCTCA 19
ก่ำ(มุกดาหาร)	----------GACACATGT-GGCTCTCA 17
หอมนางนวล	----------GACACATGT-GGCTCTCA 17
ขี้ตม	----------ACACAGTGGN-CNCA 14
หอมมะลิ	----------ACACAGTGGC-NNCA 14
RD6	----------ACACAGTGGCTCTCA 15

ก่ำ(ร้อยเอ็ด)	C-ACGT-CTNAGCTCGCCAC-T--GGCAC-GGCTTCGGCAT-GC-GACAG 56
เหนียวอุบล	C-ACGTGCCTAGCTCGCCAC-CTCGGCAC-GGCTTCGGCAT-GCCGACAG 61
อุคำ	C-ACGT-NTATGCTCGC-AC-TCGGCCAC-GGCTTCGGCATTGC-GACAG 59
ชัยนาท 1	CCACGT-CTA-GCTCGCCAC-TCGGCCACCGGCTTCGGCATTGCCGACAG 65
ป้องแอ้ว	CCACGT-CTA-GCTCGCCAC-TCGGCCACCGGCTTCGGCATTGCCGACAG 99
Exon 2	CCACGT-CCCAGCTCGCCACCTCGGCCACCGGCTTCGGCATCGCCGACAG 99
ข้าวไร่เกษตร	C-ACGT--CCAGCTCGCCACCTCGGCCACCGGCTTCGGCAT-GCCGACAG 63
ข้าวสกลนคร	C-ACGTTCTCAGCTCGCCAC--TGGCCAC-GGCTTCGGCAT-GCCGACAG 64
ก่ำ(มุกดาหาร)	C-ACGT--CCAGCTCGCCAC-TCGGCCAC-GGCTTCGGCAT-GCCGACAG 61
หอมนางนวล	C-ACGT--CCAGCTCGCCAC-TCGGCCAC-GGCTTCGGCAT-GCCGACAG 61

ขี้ตม C—ACGTCCTAGCTGC-AC--TGGC-AC-GGCTT-GGCAT-GCCGACAG 54
หอมมะลิ C—GT—CTAGCTGC-AC--TGGCCAC-GGCTT-GGCAT-GC-GACAG 51
RD6 C—ACGT-CCAGCTGCCAC--TGGCCACCGGCTT-GGCAT-GCCGACAG 57

กข๑ ร้อยเอ็ด) GT-GGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCAGGGGCCTCAAGCCCA 105
เหนียวอุบล GTCGGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCA 111
อุดำ GT-GGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCA 108
ชัยนาท1 GTCGGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCA 115
ป้องแอ้ว GTCGGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCA 59
Exon2 GTCGGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCA 149
ข้าวไร่เกษตร GTCGGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGG-CCTCAAGCCCA 112
ข้าวสกลนคร GT-GGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCA 113
กข๑(มุกดาหาร) GTCGGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGG-CCTCAAGCCCA 110
หอมนางนวล GTCGGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTCCAGG-CCTCAAGCCCA 110
ขี้ตม GTGGGCGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTC-AGGGCCTCAAGCCCA 103
หอมมะลิ GTGG-CGCCGTCGTCGCTGCTC-GCCACGGGTTC-AGG———— 86
RD6 GTGG-CGCCGTCGTCGCTGCTCCGCCACGGGTTC-CAGGCCTCAAGCCCA 105

กข๙(ร้อยเอ็ด) CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 155
เหนียวอุบล CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 161
อุดำ CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 158
ชัยนาท 1 CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 165
ป้องแอ้ว CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 109
Exon 2 CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 199
ข้าวไร่เกษตร CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 162
ข้าวสกลนคร CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 163
กข๑(มุกดาหาร) CGGGTTCCAGG-CCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 159

หอมนางนวล	CGGGTTCCAGG-CCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 159
ขี้ตม	CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 153
หอมมะลิ	--------CCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 124
RD6	CGGGTTCCAGGGCCTCAAGCCCCGCAGCCCCGCCGGCGGCGACGCGACGT 155

กำ(ร้อยเอ็ด)	CGCTCAGCGTGACGACCAGNA 176
เหนียวอุบล	CGCTCAGCGTGACGACCAGNA 182
อุดำ	CGCTCAGCGTGACGACCAGNA 179
ชัยนาท 1	CGCTCAGCGTGACGACCAGNA 186
ป้องแอ้ว	CGCTCAGCGTGACGACCAGNA 130
Exon 2	CGCTCAGCGTGACGACCAG-- 218
ข้าวไร่เกษตร	CGCTCAGCGTGACGACCAGAA 183
ข้าวสกลนคร	CGCTCAGCGTGACGACCAGAA 184
กำ(มุกดาหาร)	CGCTCAGCGTGACGACCAGAA 180
หอมนางนวล	CGCTCAGCGTGACGACCAGAA 180
ขี้ตม	CGCTCAGCGTGACGACCAGNA 174
หอมมะลิ	CGCTCAGCGTGACGACCAGNA 145
RD6	CGCTCAGCGTGACGACCAGNA 176

ภาพที่ 3.4 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสที่เริ่มต้นจากรหัสเริ่มต้น (ATG) ที่เปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสอ้างอิงและลำดับเบสของข้าวที่ศึกษา (*) รหัสหยุด

>CDS of exon 2, frame+1, 96 bases, 1C46 checksum.
MSALTTSQLATSATGFGIADRSAPSSLLRHGFQGLKPRSPAGGDATSLSV
TTSARATPKQQRSVQRGSRRFPSVVVYATGAGMNVVFVGAEMAPWS
>Kam (RE)Glu-2(Glu23F), frame+1, 59 bases, 1182 checksum.
MSALTTSSSPLGHGFGMPTGRRRRRCSATGSRPQAHGFQASSPAAPPAAT
RRRSA*RPE
>Khao Rai Kaset Glu-1(Glu23F), frame+1, 60 bases, 14ED checksum.
MSALTTSSSPPRPPASACRQVGAVVAAPPRVPGLKPTGSRASSPAAPPAA
TRRRSA*RPE
>Pong Aew Glu-10(Glu23F), frame+1, 59 bases, 1322 checksum.
MSVSPRLARHWPRLRHADRSAPSSLLRHGFQGLKPTGSRASSPAAPPAAT
RRRSA*RPE
>Kam (MD)Glu-3(Glu23F), frame+1, 58 bases, 13D4 checksum.
MSVSPRLARHWHGFGMRQVAPSSLLRHGFRGLKPTGSRASSPAAPPAATR
RRSA*RPE
>NeawUbol Glu-7 (Glu23F), frame+1, 60 bases, 1090 checksum.
MSVSPRA*LATSARLRHADRSAPSSLLRHGFQGLKPTGSRASSPAAPPAA
TRRRSA*RPE
>Hom Nahng Nuan Glu-13(Glu23F), frame+1, 60 bases, 1092 checksum.
MSVSPRLARHSATGFGIADRSAPSSLLRHGFQGLKPTGSRASSPAAPPAA
TRRRSA*RPE
>U Kam Glu-4(Glu23F), frame+1, 59 bases, 135A checksum.
MSVSPRLCSHSATASALRQVAPSSLLRHGFQGLKPTGSRASSPAAPPAAT
RRRSA*RPE
>Khao Sakon Nakhon Glu-8(Glu23F), frame+1, 59 bases, 12FD checksum.
MSALTRLSSPLATASACRQVAPSSLLRHGFQGLKPTGSRASSPAAPPAAT
RRRSA*RPE
>Hommali (Kudchum) Glu-14(Glu23F), frame+1, 48 bases, 2240 checksum.
MSASPSSCTGHGLACDRWRRRRCSPRVQASSPAAPPAATRRRSA*RPE
>Khitom Glu-6(Glu23F), frame+1, 57 bases, 117F checksum.
MWAHTS*LHWHGLACRQVGAVVAAPPRVQGLKPTGSRASSPAAPPAATRR
RSA*RPE
>RD 6 Glu-9(Glu23F), frame+1, 58 bases, 13C7 checksum.
MSALTRPAATGHRLGMPTGGAVVAAPPRVPGLKPTGSRASSPAAPPAATR
RRSA*RPE

จากภาพที่ 3.4 จะพบว่า exon 2 ของข้าวทุกพันธุ์ทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน พบรหัสหยุด (*) อันเนื่องจากการสอดแทรกของชุดเบส 23 คู่เบสจำนวน 2 ชุด เมื่อมีการแปลรหัสจะพบรหัสหยุดดังกล่าว แม้ว่าในข้าวพันธุ์หอมมะลิจะมีการสอดแทรกไม่ครบทั้งชุดเบสก็ยังพบรหัสหยุด ในขณะที่ข้าวพันธุ์เหนียวอุบล และพันธุ์ขี้ดม จะพบรหัสหยุด 2 แห่ง

สรุปและวิจารณ์ ๔

พันธุ์ ข้าวที่มีความหลากหลายของฟีโนไทป์ของปริมาณอมิโลส อันเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวแต่ละพันธุ์นั้น เป็นผลของการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างแป้งอมิโลส ซึ่งปริมาณแป้งอมิโลสในเมล็ดเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับบ่งชี้ถึงคุณภาพการหุงต้มของข้าวพันธุ์นั้นๆ ดังนั้นจึงมีความพยายามของนักวิจัยที่สนใจในการหาข้อมูลระดับโมเลกุลเพื่ออธิบายการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างแป้งอมิโลส เพื่อค้นหาคำตอบที่เป็นไปได้ว่า รูปแบบการแสดงออกของยีนแวคซีมีลักษณะอย่างไรบ้าง อันที่จะส่งผลถึงการสังเคราะห์แป้งอมิโลสได้มากน้อยแตกต่างกันทั้งในระดับสายพันธุ์เดียวกัน ระหว่างสายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มชั้นอมิโลสเดียวกัน และระหว่างพันธุ์ข้าวที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มชั้นอมิโลสต่างกัน

มีรายงานว่าอุณหภูมิต่ำ (18C) ส่งผลทำให้ยีนแวคซีในสภาพอัลลีล b (Wx^b) แสดงออกได้มากขึ้น โดยวัดการแสดงออกจากปริมาณโปรตีนแวคซี (หรือเอ็นไซม์ GBSS) และปริมาณอมิโลสที่เพิ่มขึ้นจากเดิม ซึ่งการแสดงออกของยีนในสภาพอัลลีลชนิดนี้เกิดขึ้นทั้งในเอ็นโดสเปิร์มและละอองเรณู (Sano et al., 2003) ส่วนในพันธุ์ข้าวที่ยีนแวคซีในสภาพอัลลีล a (Wx^a) อุณภูมิต่ำดังกล่าวไม่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนนี้แต่อย่างใด และจากการศึกษาในรายละเอียดระดับ mRNA พบว่า ข้าวที่จัดอยู่กลุ่มชั้นอมิโลสต่ำ ที่ระดับอุณหภูมิต่ำ จะมี GBSS mRNA ที่มีการตัดต่อที่สมบูรณ์ในเปอร์เซ็นต์ที่มากกว่าข้าวพันธุ์เดียวกันที่ปลูกในอุณหภูมิสูงกว่า (32C) แม้ว่ายีนแวคซีในสภาพอัลลีล b จะมีเบส Tบริเวณ 5' splice donor site ของ intron 1 ซึ่งส่งผลทำให้การตัดต่อ exon1-exon2 เข้าด้วยกันมีความผิดปกติตามที่มีการรายงานผลการศึกษาของ (Cai et al. 1998) แต่ในสภาพความเป็นจริงเมื่อศึกษา GBSS mRNA ในระดับประชากรจะพบว่ามี GBSS transcripts จำนวนหนึ่งที่มีการตัดต่อบริเวณดังกล่าวเป็นแบบปกติในข้าวกลุ่มชั้นอมิโลสต่ำ (Bligh et al., 1999 และ Larkin et al., 1998)

มีความพยายามที่จะหาหลักฐานมายืนยันว่าปรากฏการณ์ NMD ทำให้เกิดความผิดปกติใน GBSS mRNA ทำให้ยีนมีการแสดงออกได้น้อยอันเนื่องมาจากปริมาณของ GBSS mRNA ที่มีความสมบูรณ์มีปริมาณน้อย (*Isshiki et al., 2001)* แต่ข้อค้นพบดังกล่าวอาจอธิบายได้เฉพาะข้าวบางพันธุ์เท่านั้นโดยเฉพาะหลักฐานดังกล่าวใช้อธิบายได้เฉพาะข้าวในกลุ่มจาปอนิกา เท่านั้น หรือใช้อธิบายได้เฉพาะข้าวพันธุ์ที่ใช้ทดลองเท่านั้น ทั้งนี้เพราะหลักฐานจากการศึกษาในข้าวไทยทั้ง 14 พันธุ์ ไม่พบว่าเกิด premature termination codon ในลำดับบเสของ exon 7 ของข้าวทั้ง 14 พันธุ์ ดังนั้นจึงใช้ปรากฏการณ์ NMD มาใช้อธิบายเรื่องการเป็นข้าวเหนียว (ปริมาณอมิโลสน้อย) อันเนื่องจากการสังเคราะห์อมิโลสได้น้อย หรือข้าวเจ้าในกลุ่มอมิโลสสูงหรืออมิโลสต่ำ ซึ่งผลของการศึกษาในวัตถุประสงค์นี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร AJSTD (ASEAN Journal on SCIENCE & TECHNOLOGY FOR DEVELOPMENT Vol . 22 (2005) paper 366) ภายใต้ชื่อเรื่อง Characterization of DNA polymorphism of the Waxy gene in Thai rice (*Oryza sativa* L.)

การสอดแทรกของ 23 คู่เบสบริเวณ exon 2 นั้น ผลการศึกษาของ Wanchana et al. (2003) ที่ศึกษาในข้าวเหนียวจำนวน 24 พันธุ์ที่พบว่าดีเอ็นเอบริเวณ exon2 มีการสอดแทรกของชุดนิวคลีโอไทด์ 23 คู่เบสทุกพันธุ์ ซึ่งได้แนวคิดนี้จากผลการศึกษาที่มีรายงานมาก่อนนี้คือ Isshiki et al. (2001) ที่ศึกษาในข้าวเหนียวที่มีพันธุกรรมแบบจาปอนิกาที่เกิดจากการกลายพันธุ์ (wx mutant) ผลจากการสอดแทรกของนิวคลีโอไทด์ชุดนี้ ทำให้เกิดรหัสหยุด (termination codon) ใน exon 2 ซึ่งส่งผลทำให้ GBSS transcript ผิดปกติเกิดขึ้น และนำไปสู่การสลายไปของ GBSS transcripts แบบนี้โดยกระบวนการ non-mediated decay (NMD) ผลที่ตามมาคือพันธุ์ข้าวเหนียวจึงมีความสามารถหรือไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์แป้งอมิโลส เนื่องจากปริมาณแป้งอมิโลสในข้าวเหนียวมีปริมาณตั้งแต่ 0-9% ในรายงานเดียวกันของ Wanchana et al. (2003) ข้าวเจ้าพันธุ์หอมนิล และขาวดอกมะลิ 105 แม้ว่าจะมีชุดนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวแต่ไม่มี termination codon ซึ่งส่งผลทำให้ข้าวเจ้า 2 พันธุ์นี้สามารถสังเคราะห์แป้งอมิโลสได้มากกว่าข้าวเหนียว ดังนั้นการสอดแทรกของนิวคลีโอไทด์ชุดนี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การสังเคราะห์แป้งอมิโลสไม่เกิดขึ้นหรือเกิดขึ้นได้น้อย ผลจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่ามีชุดนิวคลีโอไทด์ ดังกล่าวในข้าวเหนียวและข้าวเจ้าที่ใช้ในการศึกษานี้สอดแทรกอยู่ ดังนี้ข้อสรุปที่ Wanchana et al. (2003) สรุปไว้ว่า *Interestingly, the same 23 bp duplicated motifs were found exactly in the same exon 2 of all glutinous rices. This result was not only unique in tropical glutinous varieties but also in other spontanous wx mutants.* จึงสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ ที่ตัวอย่างข้าวที่ใช้ทดลองทุกพันธุ์พบการสอดแทรกของ 23 คู่เบสใน exon 2

บทบาทของ 3' splice acceptor site ในการตัดต่อ exon

: *ทำไมต้องศึกษา 3' splice acceptor site*

ในกระบวนการตัดต่อ pre-mRNA นั้นการตัด intron ออกไปและต่อ exon เข้าด้วยกันโดยไม่ความผิดปกติใดๆเป็นขั้นตอนแรกของวิถีการแสดงออกของยีน รอยต่อระหว่าง exon-intron นั้นเรียกว่า 5' และ 3' splice sites จะถูกกำหนดโดยลำดับเบสยิ่งยวดที่มีความสำคัญต่อกระบวนการตัดต่อ pre-mRNA ลำดับเบสยิ่งยวดบริเวณ 5' splice site ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอต คือ 5'-CAG/GUAAGU-3' ซึ่งลำดับเบสยิ่งยวดทั้ง 9 นิวคลีโอไทด์นี้จะสมมาตรกับลำดับเบสของด้านปลาย 5' ของ U1 small nuclear RNA (snRNA) (Nelson and Green, 1990) ในกระบวนการ pre-mRNA splicing กระบวนการที่เกิดขึ้นมีความซับซ้อนมาก โดย spliceosome ประกอบด้วย snRNP 4 ชนิด คือ U1, U2, U5 และ U6/U4 และโปรตีนหลากหลายชนิด เข้าร่วมในปฏิกิริยา

มีรายงานว่าในเอ็นโดสเปิร์มของข้าวโพด ยีน *sh2-i* (shrunken2 intermediate phenotype) และยีน *sh2-7460* เบสบริเวณ 3' splice site เกิดมิวเทชัน AG → AA ผลที่เกิดตามมาคือ ในกรณีของยีน *sh2-i* บริเวณ 3' splice site ถูกเลือกให้เป็นบริเวณที่ตัด intron ออกไปแบบปกติ (authentic splice site) ในการตัดต่อ exon เข้าด้วยกัน มีเพียง 10% ส่วนอีก 90% มีการตัดต่อผิดปกติ (Lal *et al.*, 1999) และยังพบว่า transcripts ที่ผิดปกติเกิดขึ้นจาก การตัดต่อแบบกระโดดข้าม exon (exon skipping) และทำให้ exon 3 ขาดหายไปจาก transcripts ส่วนยีน *sh2-7460* เกิดมิวเทชัน AG→ AA ที่ intron 12 ผลที่ตามมาคือ transcripts ของยีนนี้มีลำดับเบสของ intron 2 และ intron 3 ติดอยู่ใน transcripts เหล่านี้ประมาณ 50% ข้อสังเกตนี้เป็นเรื่องน่าทึ่งเพราะ the terminal AG ของ nuclear introns มีความหลากหลายมากในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งพืช เบส AG มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการจับกันของอนุภาค U5 small nuclear ribonucleoprotein ในกระบวนการ RNA processing (Brown, 1996) เบส G (the termination G) มีความสำคัญสำหรับ the second step ของ RNA splicing ในยีสต์ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลง the terminal AG การ

ตัดต่อ RNA จะไม่เกิดขึ้นและบางครั้งจะไปกระตุ้นการตัดต่อที่บริเวณ down stream cryptic acceptor sites (Simpson et al., 1996) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้สูญเสียการจดจำบริเวณ acceptor site ส่งผลทำให้ยังคงมี intron ใน processed transcript หรือเกิด exon skipping หรือ ไปกระตุ้น a cryptic acceptor splice site ใน exon ถัดไป(the adjacent exon) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการตัดต่อ RNA ที่มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของเบสตรงปลาย intron จาก G ไปเป็น A (the intron terminal G-to-A transition) มีการรวบรวมผลการศึกษาไว้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังโดย Krawczak et al. (1992)

หลักฐานที่ได้กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงของเบส AG ไปเป็น AA ที่บริเวณ 3' splice acceptor site ส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับ pre-mRNA ของยีนต่างๆในพืชและสัตว์ ดังนั้นผลการศึกษาในพันธุ์ข้าวที่พบการเปลี่ยนแปลงของเบสบริเวณดังกล่าว ในข้าวพันธุ์ปรับปรุงโดยการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมและคัดเลือกพันธุ์ ซึ่งพบว่าเบสบริเวณดังกล่าวเปลี่ยนแปลงไปในข้าวพันธุ์ กข 15 และ กข 6 และยังพบว่าข้าวเหนียวพื้นบ้านของชน กลุ่มน้อยทางวัฒนธรรมในภาคเหนือมีเบสบริเวณดังกล่าวเปลี่ยนไปจากเดิมคือพันธุ์ แบเด่าเดอก (AG → AT) และข้าวเหนียวพันธุ์หอมนางนวล (AG →AS(C/G)) หลักฐานเหล่านี้น่าจะใช้อ้างอิงถึงการแสดงออกของของยีนแวคซีที่แตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ข้าว ทำให้มีปริมาณอมิโลสแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ อันเนื่องมาจากความผิดปกติทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของ GBSS transcripts

นอกจากนี้ยังพบว่าโคดอนเริ่มต้นของ exon 2 ของยีนแวคซีในพันธุ์ข้าวที่ศึกษาครั้งนี้ มีการเปลี่ยนแปลงของเบสทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลง แตกต่างกันกับเอ็นไซม์ GBSS ที่เป็น wild type

ยีนแวคซีควบคุมการสังเคราะห์แป้งอมิโลสและสะสมในเอ็นโดสเปร์มของข้าว ในข้าวเหนียว และข้าวเจ้า แม้ว่ามีการศึกษากันมากแต่ยังไม่สามารถสรุปกลไกการแสดงออกของยีนในแนวทางเดียวกันได้ เพราะว่าเมื่อมีการศึกษายีนนี้โดยเฉพาะการ วิเคราะห์ยีนนี้ในระดับละเอียด (fine scale) ของลำดับเบสของยีนนี้ในข้าวพันธุ์ต่างๆ พบความแตกต่างในระดับพันธุ์และระดับสายพันธุ์ ดังเช่นผลการศึกษานี้ที่พบความแตกต่างของลำดับเบสของ exon 7 และ exon 2 ในตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษากับตัวอย่างข้าวที่ได้มีการศึกษาและมีรายงานผลแล้ว ดังนั้นกลไกการแสดงออกของยีนแวคซียังมีความลับซ่อนเร้นอยู่ที่ต้องมีการศึกษาต่อไปอีกทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ เพื่อค้นหาหลักฐานใช้ในการอธิบายกลไกการแสดงออกที่ชัดเจนในข้าวกลุ่มต่างๆที่อาจจะแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวตามกลไกการแสดงออกของยีนนี้หรือแบ่งตามกลุ่มของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างของลำดับเบสบางบริเวณของยีนแวคซี

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้ทุนสนับสนุนจากโครงการ BRT ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณหน่วยบริการวิเคราะห์ลำดับเบสของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

Ayres, N.M., McClung, A.M., Larkin, P.D., Bligh, H.F.J., Jones, C.A., Park, W.D. (1997), *Theor. Appl. Genet.*, vol. **94**, pp. 773-781.

Bligh, H.F.J., Larkin, P.D., Roach, P.S., Jones, C.A., Fu, H., Park, P.D. (1998), *Plant Mol. Biol.*, vol. **38**, pp. 407-415.

Brown, J.W.S. (1996) Arabidopsis intron mutations and pre-mRNA splicing. *Plant J.* vol. 10, pp. 771-780.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987), *Phytochemical Bull.*, vol. **19**, pp. 11-15.

Isshiki, M., Morino, K., Nakajima, M., Okagaki, R.J., Wessler, S.R., Izawa, T., Shimamoto, K. (1998), *Plant J.*, vol. **15**, pp. 133-138.

Isshiki, M., Yamamoto, Y., Satoh, H., Shimamoto, K. (2001), *Plant Physiol.*, vol. **125**, pp. 1388-1395.

Krawczak, M., Reiss, J., Cooper, D.N. (1992), *Hum. Genet.* vol.**90**, pp. 41-54.

Lal, S., Jae-Hyuk, C., Hannah, L.C. (1999), *Plant Physiology*, vol. 120, pp. 65-72.

Larkin, P.D., Park, W.D. (1999), *Plant Mol. Biol.*, vol. **40**, pp. 719-727.

Nelson, K.K., Green, M.R. (1990), *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 87, pp. 6253-6257.

Prathepha, P., Baimai, V. (1999), *Genetica*, vol. **105**, pp. 193-202.

Simpson, G.J., Filipowicz, W. (1996), *Plant Mol Biol* vol. 32, pp. 1-14

Wanchana, S., Toojinda, T., Tragoonrung, S., Vanavichit, A. (2003), *Plant Science*, vol. 165, pp. 1193-1199.

Wang, Z.Y., Zheng, F.Q., Shen, G.Z., Gao, J.P., Snustad, D.P., Li, M.G., Zhang, J.L., Hong, M.M. (1995), *Plant J.*, vol. 7, pp. 613-622.

ภาคผนวก

1. Letter from Chief Editor of ASEAN Journal on SCIENCE & TECHNOLOGY FOR DEVELOPMENT
2. Example of Chromatogram of DNA sequence for Exon 7
3. Chromatogram of DNA sequences for exon2

ASEAN Journal on SCIENCE & TECHNOLOGY FOR DEVELOPMENT

TH/AJSTD/366

Dr. N. Sombatsompop; Chief Editor
School of Energy and Materials,
King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT)
Thungkru, Bangkok 10140, THAILAND
E-mail: narongrit.som@kmutt.ac.th

Mar 18, 2005

Assoc. Prof. Dr. Preecha Prathepha
Department of Biotechnology
Faculty of Technology
Mahasarakham University
Mahasarakham 44000, THAILAND
e-mail: preecha.p@msu.ac.th

Dear Assoc. Prof. Dr. Preecha Prathepha,

I am referring to your paper entitled "Characterization of DNA polymorphism of the Waxy gene in Thai rice (*Oryza sativa* L.)" (AJSTD Paper 366). I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication in our journal, the paper being scheduled to appear in Vol 22 (2005).

We will send you the page proof of the paper for you to make a final check in due course.

Thanks very much for contributing your work to our journal.

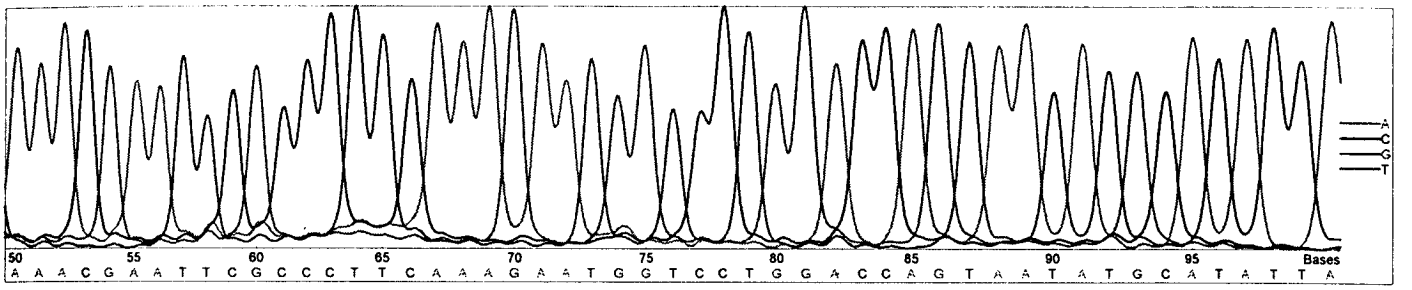
Yours sincerely

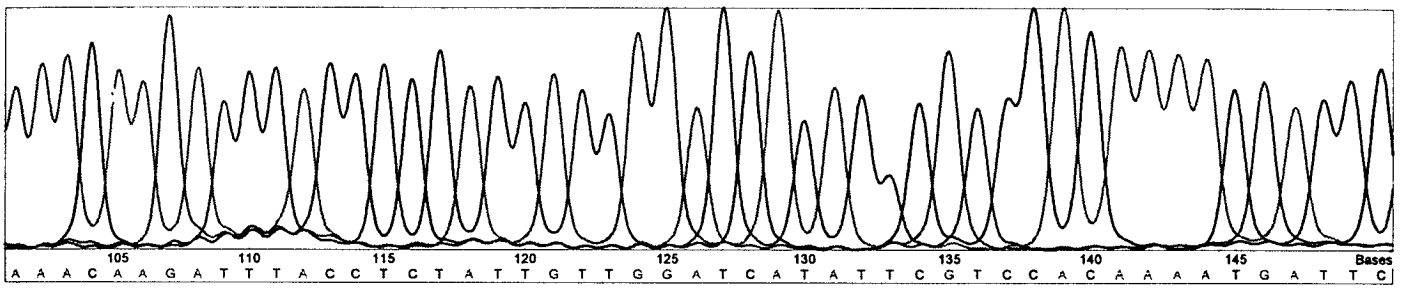
Dr. N. Sombatsompop
Chief Editor

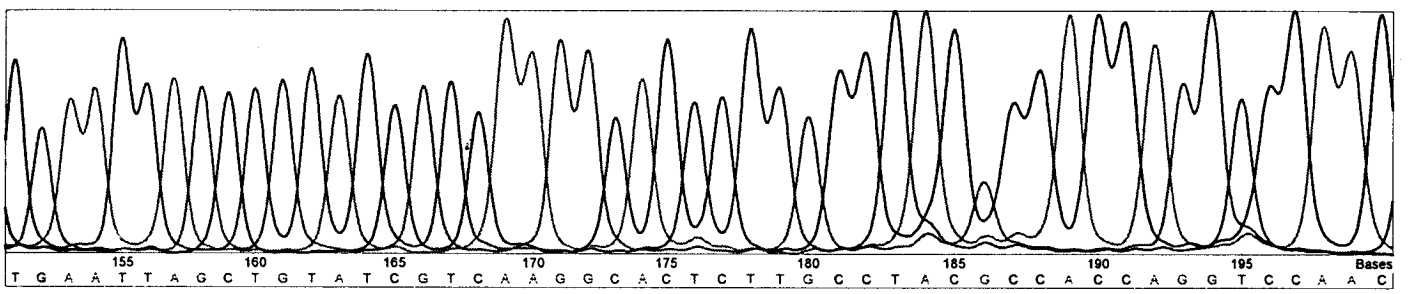
amersham pharmacia biotech

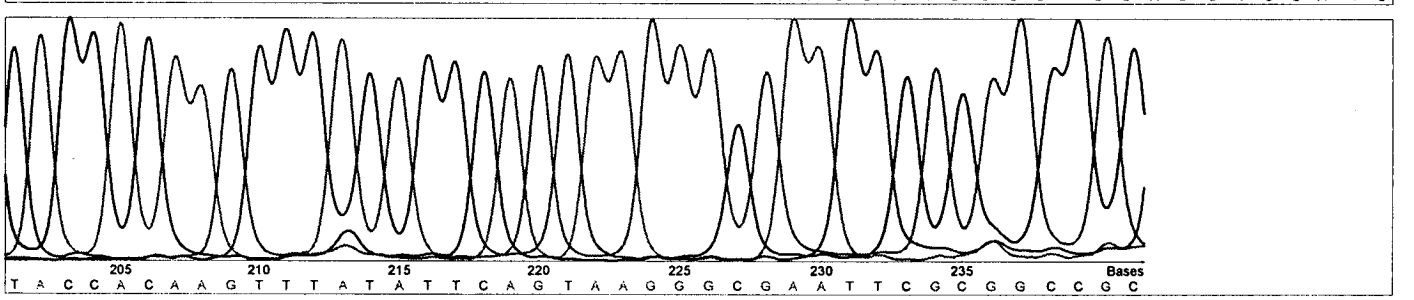
ALFwin Sequence Analyser 2.00 - For research use only

File name	Current user	Current date	Page
exp-25-2-result.alx	kanokwan	December 26, 2003 10:49	1
Clone name	Clone comment	Curve type	Time
Clone02 - Ex7-5	RP/pCR-4 TOPO	Raw/sep/shift	101 - 289 [min]





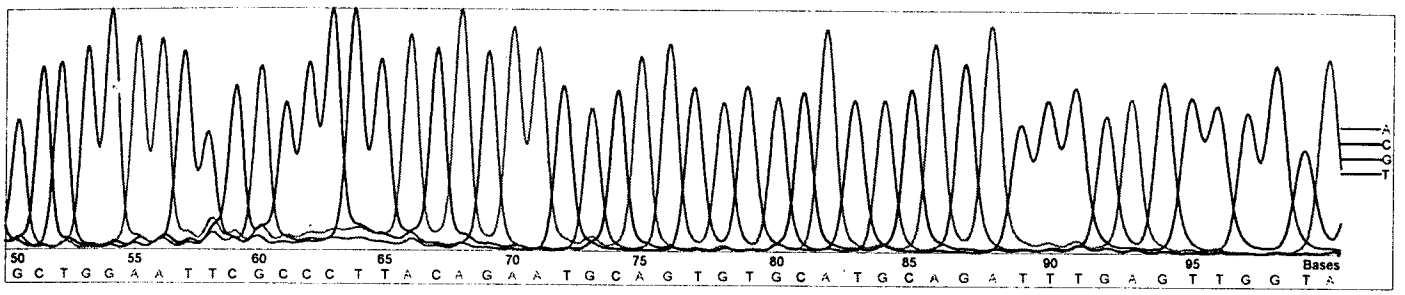


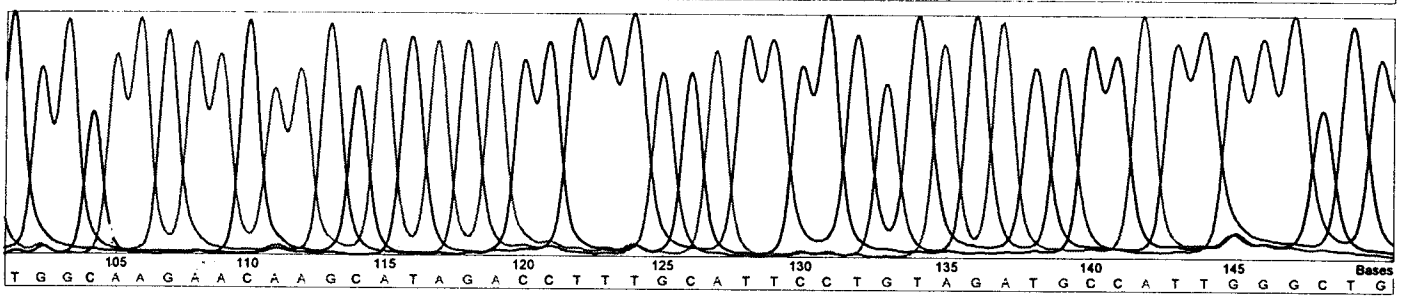


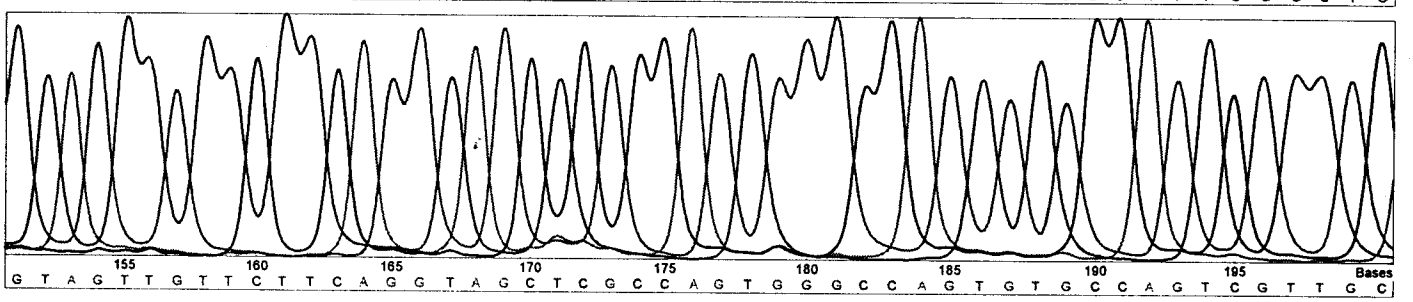
amersham pharmacia biotech

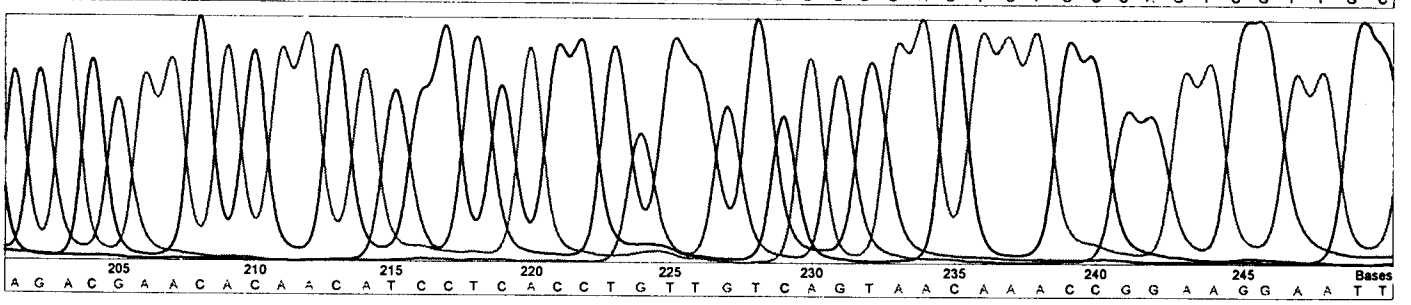
ALFwin Sequence Analyser 2.00 - For research use only

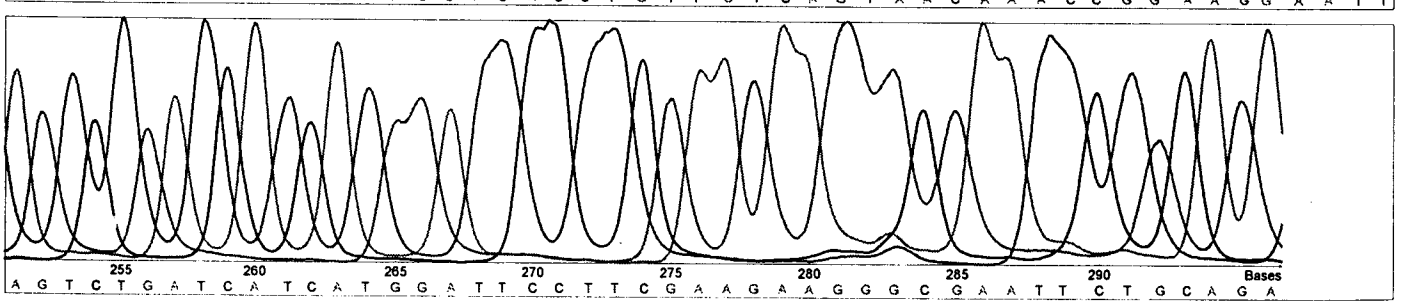
File name	Current user	Current date	Page
exp-25-2-result.alx	kanokwan	December 26, 2003 11:10	1
Clone name	Clone comment	Curve type	Time
Clone10 - Ex7-12	RP/pCR-2.1-TOPO	Raw/sep/shift	102 - 362 [min]





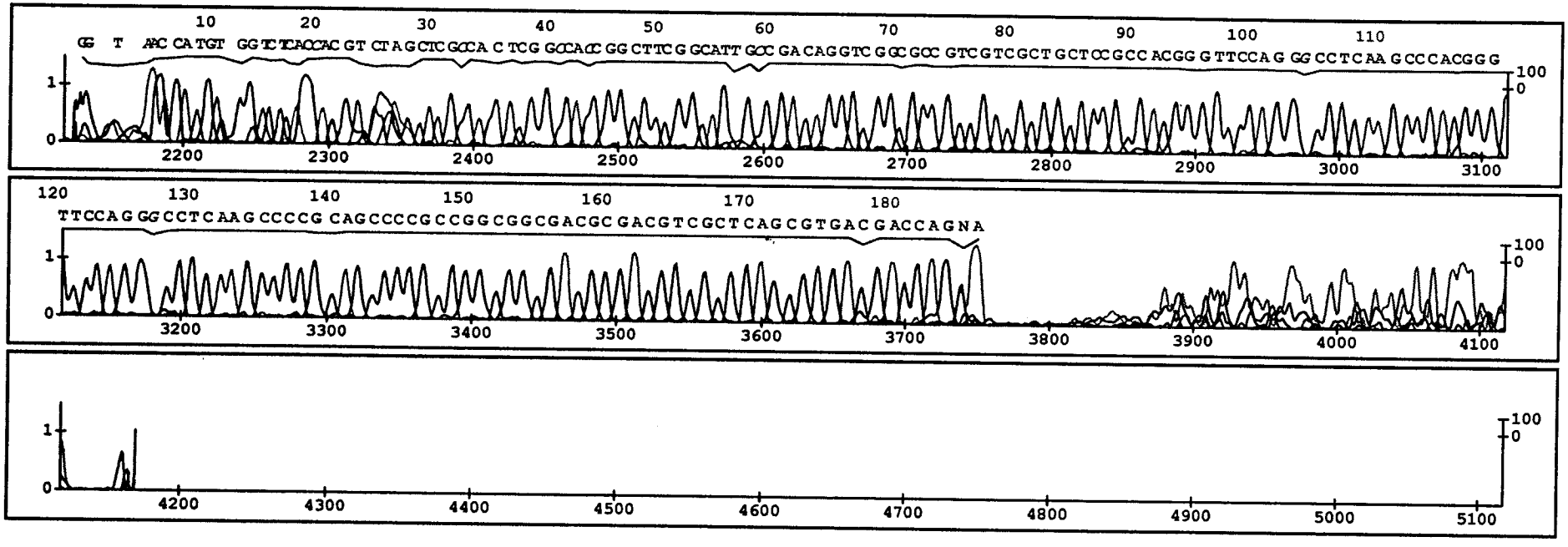






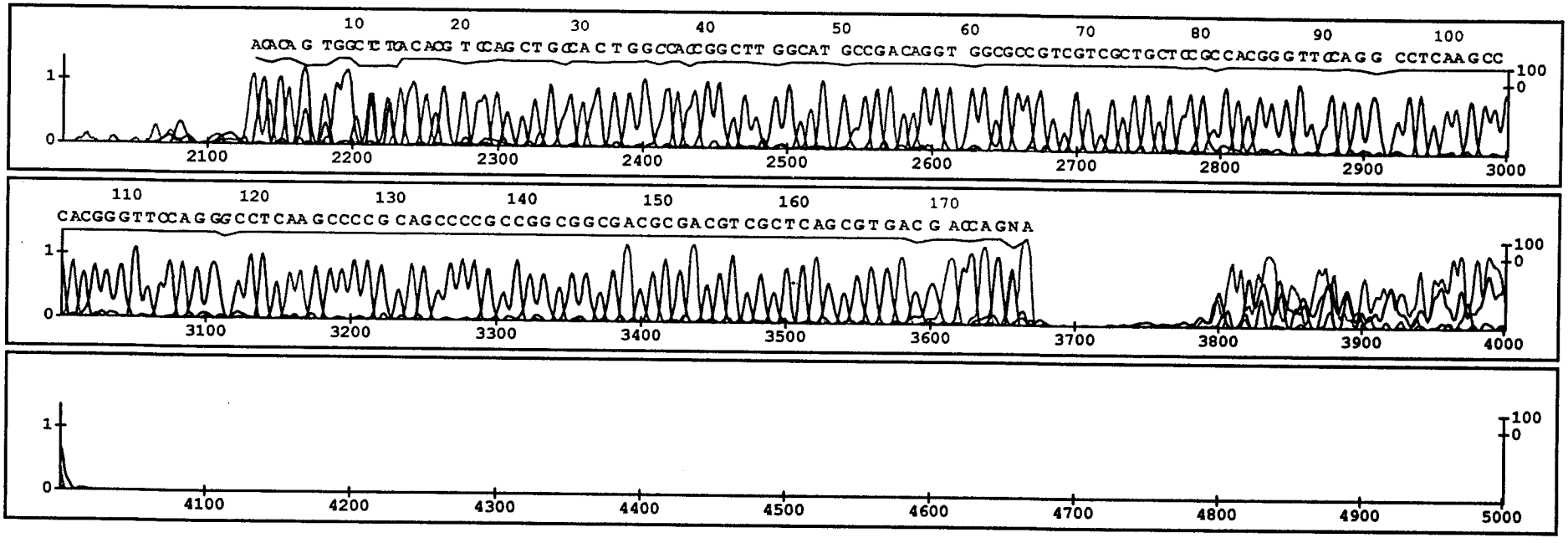
MegaBACE

MegaBACE 1000 Jun20_2005 Cimarron 3.12 Injection: 2.0 kV, 90.0 s
ICM ver. 2.5 Standard Terminator□ A01-D01 are pGEM-T(home-made)Read length: 181neck for Xcm I cassettRun: 9.0 kV, 100.0 min reaction is a
1000-14100 Glu-13(Glu23F) Overall quality: 94.0 Started Mon Jun 20 15:55:52 2005
MEGABACE D02 ET Terminators



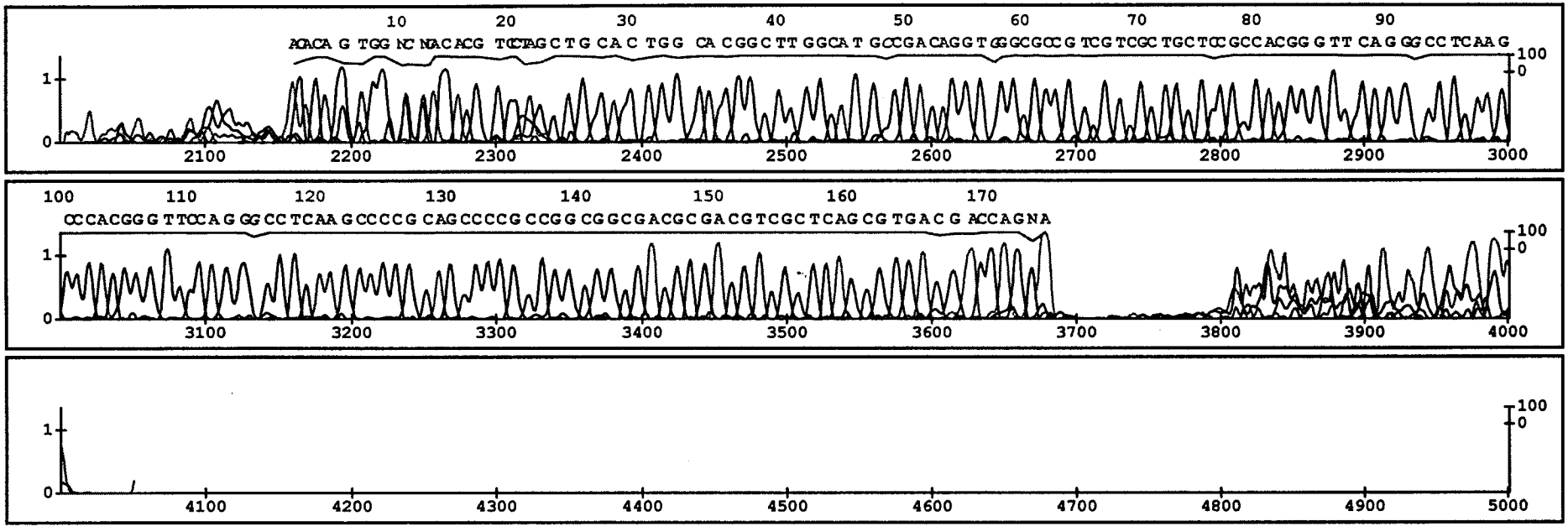
MegaBACE

MegaBACE 1000 Jun20_2005 Cimarron 3.12 Injection: 2.0 kV, 90.0 s
ICM ver. 2.5 Standard Terminator A01-D01 are pGEM-T(home-made)Read length: 161neck for Xcm I cassettRun: 9.0 kV, 100.0 min reaction is a
1000-14100 Glu-9(Glu23F) Overall quality: 96.0 Started Mon Jun 20 15:55:52 2005
MEGABACE B02 ET Terminators



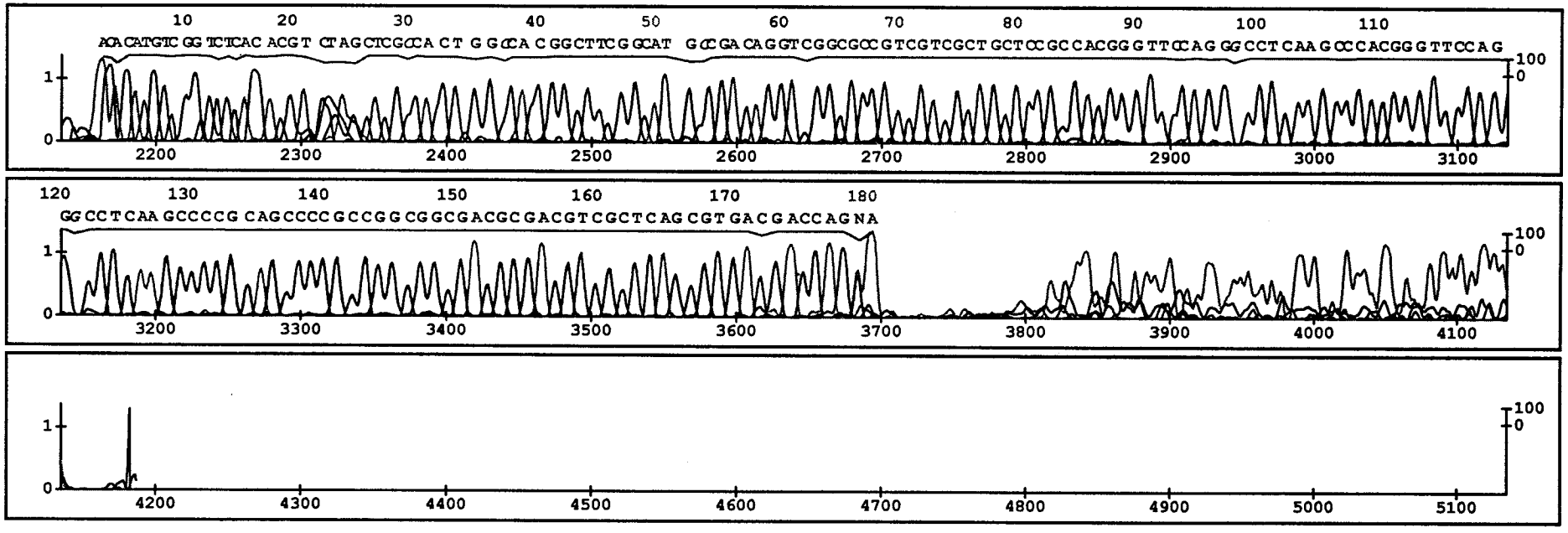
MegaBACE

MegaBACE 1000 Jun20_2005 Cimarron 3.12 Injection: 2.0 kV, 90.0 s
ICM ver. 2.5 Standard Terminator□ A01-D01 are pGEM-T(home-made)Read length: 160heck for Xcm I cassettRun: 9.0 kV, 100.0 min reaction is a
1000-14100 Glu-6(Glu23F) Overall quality: 95.0 Started Mon Jun 20 15:55:52 2005
MEGABACE G01 ET Terminators



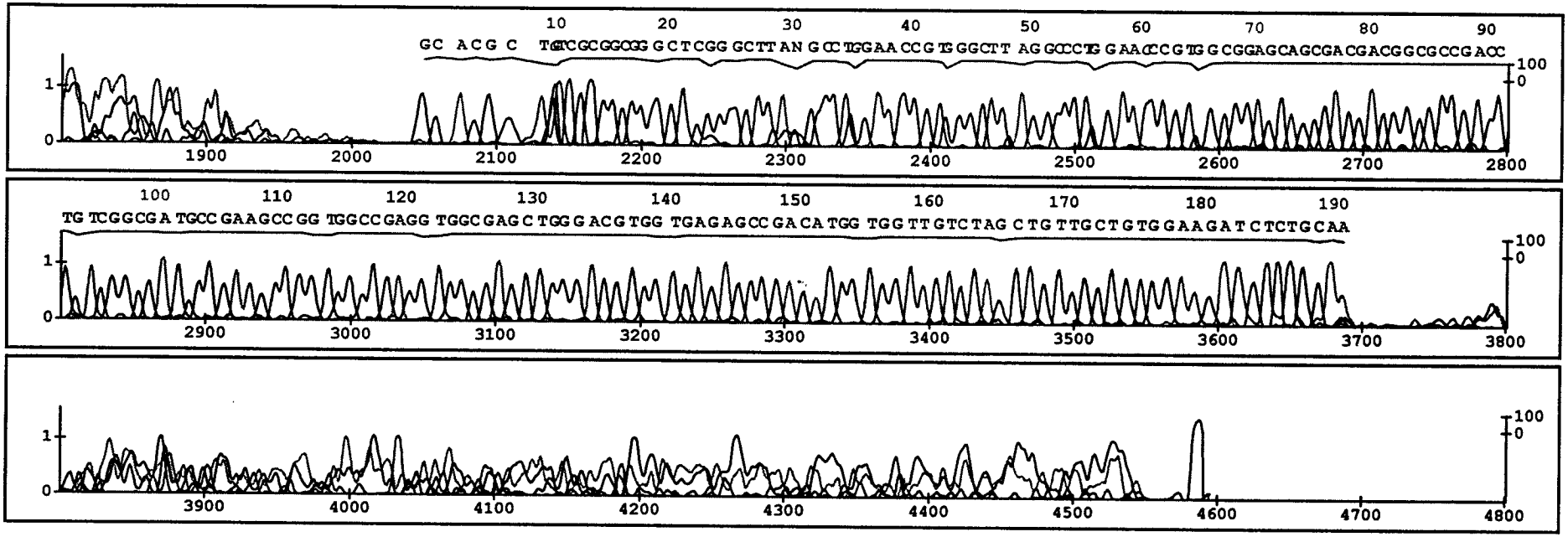
MegaBACE

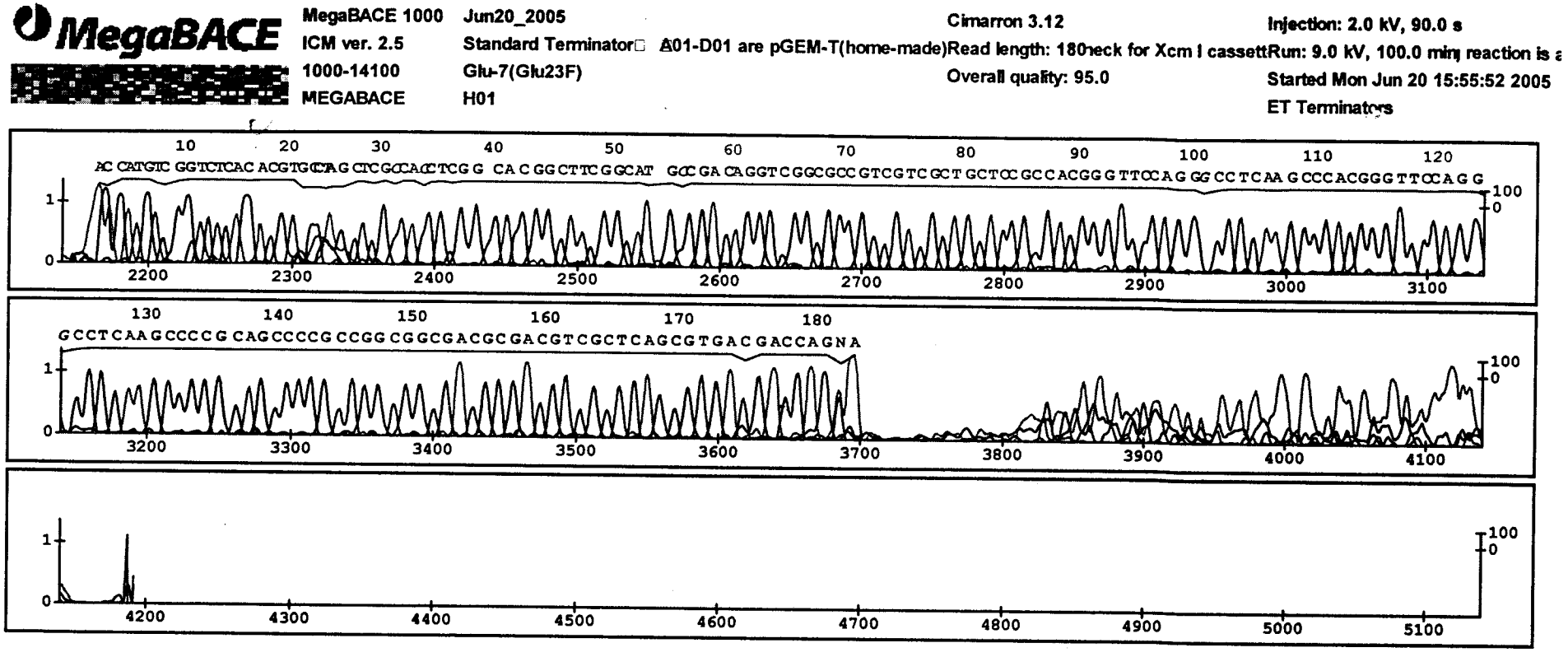
MegaBACE 1000 Jun20_2005 Cimarron 3.12 Injection: 2.0 kV, 90.0 s
ICM ver. 2.5 Standard Terminator A01-D01 are pGEM-T(home-made)Read length: 178neck for Xcm I cassettRun: 9.0 kV, 100.0 min reaction is a
1000-14100 Glu-10(Glu23F) Overall quality: 95.0 Started Mon Jun 20 15:55:52 2005
MEGABACE C02 ET Terminators



MegaBACE

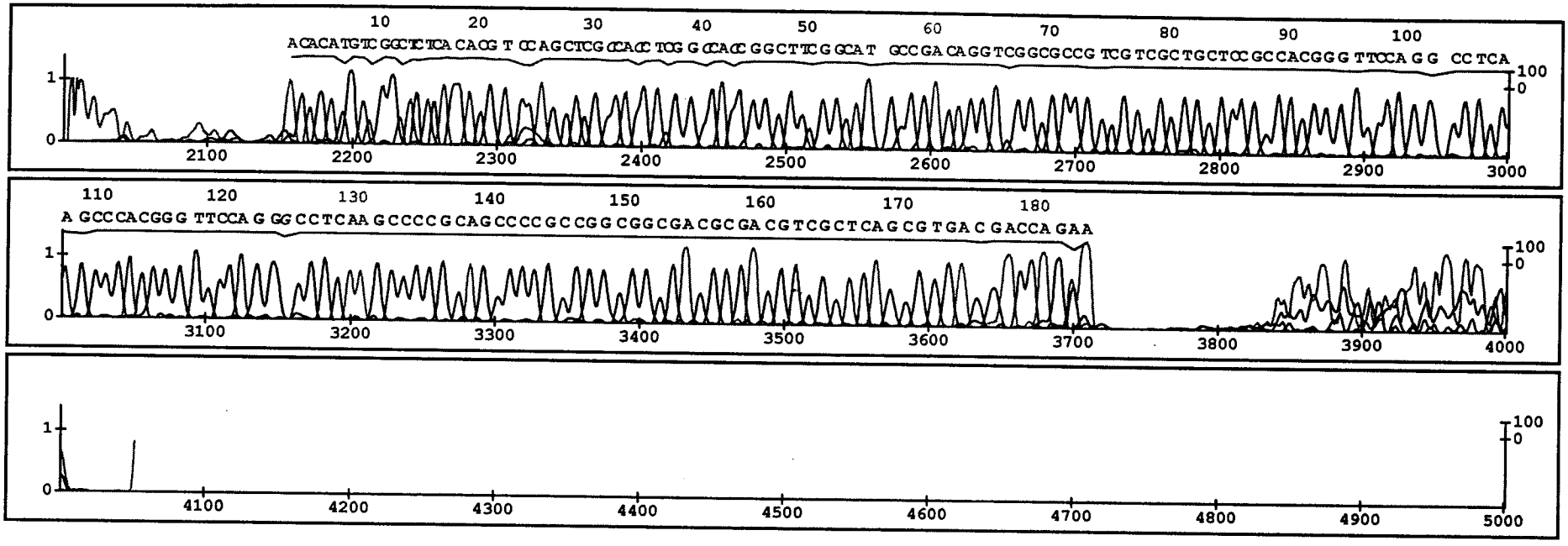
MegaBACE 1000	Jun16_2005	Cimarron 3.12	Injection: 2.0 kV, 90.0 s
ICM ver. 2.5	Standard Terminator	Read length: 188	Run: 9.0 kV, 100.0 min
1000-14100	Glu-2(Glu23R)	Overall quality: 94.0	Started Thu Jun 16 16:05:07 2005
MEGABACE	C01		ET Terminators




MegaBACE
MegaBACE 1000
ICM ver. 2.5
1000-14100
MEGABACE
Jun20_2005
Standard Terminator
Glu-7(Glu23F)
H01
Cimarron 3.12
A01-D01 are pGEM-T(home-made)
Overall quality: 95.0
Injection: 2.0 kV, 90.0 s
Read length: 180
Run: 9.0 kV, 100.0 min
Started Mon Jun 20 15:55:52 2005
ET Terminators
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
AC CATGTC GGTCTCAC ACGTGCCAG CTCGCCAGCTCGG CA C GGCTTCGGCAT GCC GA CAGGTCGGCGCC GTCGTC GCT GCTCC GCCACGGG TTCCAG GG CC TCAA GCCCACGGG TTCCAG G
2200 2300 2400 2500 2600 2700 2800 2900 3000 3100
130 140 150 160 170 180
G CCT CAA GCCCC G CAGCCCCG CCGG CGGCGACGC GACGTCGCTCAGCGTGAC GACCAGNA
3200 3300 3400 3500 3600 3700 3800 3900 4000 4100
4200 4300 4400 4500 4600 4700 4800 4900 5000 5100

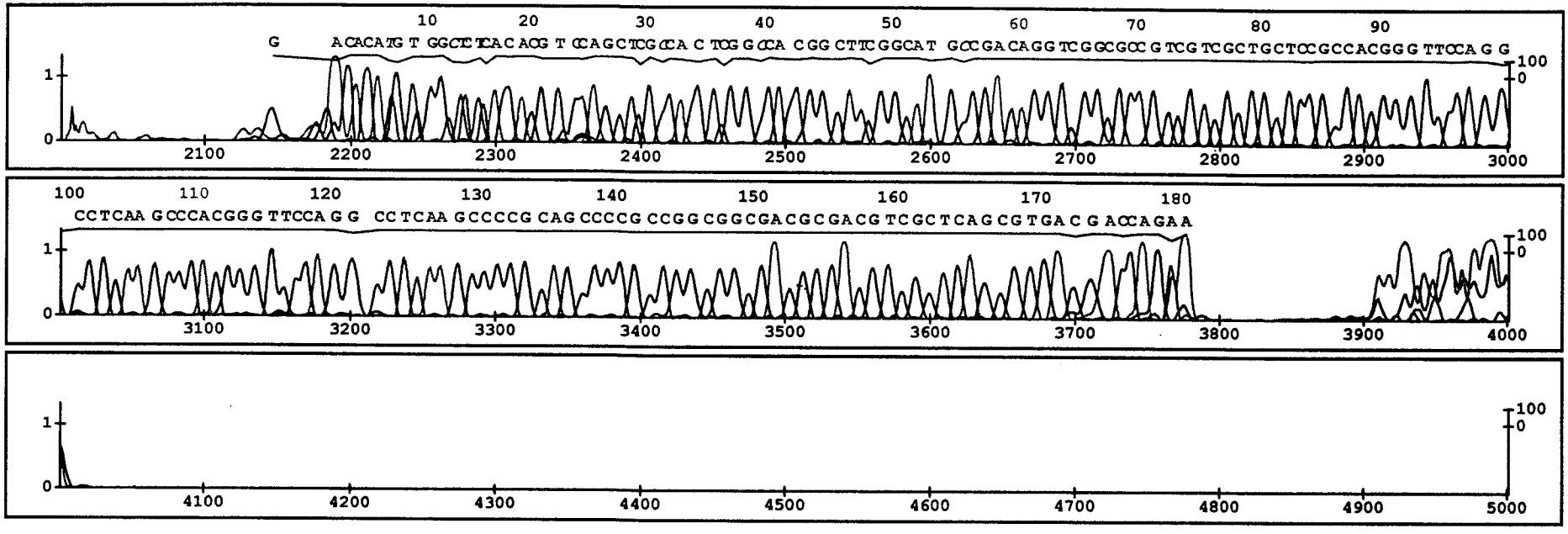
MegaBACE

MegaBACE 1000	Jun16_2005	Cimarron 3.12	Injection: 2.0 kV, 90.0 s
ICM ver. 2.5	Standard Terminator	Read length: 181	Run: 9.0 kV, 100.0 min
1000-14100	Glu-1(Glu23F)	Overall quality: 95.0	Started Thu Jun 16 16:05:07 2005
MEGABACE	B01		ET Terminators



MegaBACE

MegaBACE 1000	Jun16_2005	Cimarron 3.12	Injection: 2.0 kV, 90.0 s
ICM ver. 2.5	Standard Terminator	Read length: 178	Run: 9.0 kV, 100.0 min
1000-14100	Glu-2(Glu23F)	Overall quality: 94.0	Started Thu Jun 16 16:05:07 2005
MEGABACE	D01		ET Terminators



MegaBACE

MegaBACE 1000	Jun16_2005	Cimarron 3.12	Injection: 2.0 kV, 90.0 s
ICM ver. 2.5	Standard Terminator	Read length: 178	Run: 9.0 kV, 100.0 min
1000-14100	Glu-2(Glu23F)	Overall quality: 94.0	Started Thu Jun 16 16:05:07 2005
MEGABACE	D01		ET Terminators