Thesis Title Transformation of Modified Antifreeze Protein Gene in Strawberry

Author Mr. Saranyu Khammuang

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Lect. Dr. Sasitorn Wongroung	Chairperson
Lect. Dr. Prasert Hanmoungjai	Member
Lect. Dr. Srisulak Dheeranupattana	Member

ABSTRACT

Antifreeze proteins (AFPs) are proteins that depress the freezing point of water through a non-colligative action by interacting with growing ice crystals. AFPs have been found in a number of plants, insects, bacteria and fish. There is interest in the possible applications of these proteins. The examples are as protecting agents in the cryogenic or hypothermic storage of whole organisms, tissues or cell lines, maintaining texture and reducing nutrient leakage from frozen food, improvement of cold tolerance in plants and animals. In this research, the cDNA from Atlantic ocean pout (*Macrozoarces americanus*) coding for type III AFP isoform

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

HPLC 6 was attempted to transform in strawberry plant (*Fragaria x ananassa*) cultivar Tioga. The cultivar Tioga was studied for *in vitro* regeneration optimization. The optimum condition for leaf explant regeneration was MS media, containing 1 mg/L N_6-Benzyladenine (BA) and 0.2 mg/L 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). Antibiotic sensitivity tests with leaf explants revealed that this cultivar was very sensitive to kanamycin (Km). Shoot regeneration was inhibited by more than 90% at concentration as low as 5 mg/L of this antibiotic. High frequency usage codons, observed in cultivated strawberry plants, were used for construction of a synthetic strawberry optimized codon gene, encoding for ocean pout type III antifreeze protein (AFP) isoform HPLC 6, by polymerase chain reaction. Plant expression vector was constructed by inserting the strawberry optimized codons of AFP gene fragment into pBI121, the resulting plasmid was called pBB. Tioga leaf explants were transformed with plasmids containing the original antifreeze protein gene (pSW1) and strawberry codons optimized antifreeze protein gene (pBB) by *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. The strawberry plants, transformed with both AFP genes, were able to root in MS media, containing 50 mg/L Km, while no roots grew from nontransformed plant in this condition and polymerase chain reaction indicated that the transgenes were integrated in genome of transformants. Western blot analysis of leaf protein extracted from five positive clones of strawberry plants transformed with pSW1 and three positive clones of strawberry plants transformed with pBB showed no band correspond to AFP but expected band was observed in ocean pout serum lane as positive control.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การถ่ายยีนแอนติฟรีซโปรตีนดัดแปรในสตรอเบอรี

ชื่อผู้เขียน นายศรัณยู คำเมือง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ. ดร. ศศิธร วงศ์เรือง ประธานกรรมการ

อ. ดร. ประเสริฐ หาญเมืองใจ กรรมการ

อ. ดร. ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา กรรมการ

บทคัดย่อ

แอนติฟรีซโปรตีน (antifreeze protein) เป็นกลุ่มโปรตีนที่เมื่ออยู่ในสารละลายจะทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายนั้นต่ำลงกว่าปรกติ จุดเยือกแข็งที่ลดต่ำลงนี้มิใช่เนื่องจากสมบัติคอลลิเกตีฟ แต่เนื่องจากสมบัติของโปรตีนชนิดนี้ที่เข้าจับกับผลึกของน้ำแข็งแล้วขัดขวางมิให้รวมตัวเป็นผลึกที่ใหญ่ขึ้น สามารถพบแอนติฟรีซโปรตีนได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช แมลง แบคทีเรียและปลา จากสมบัติของโปรตีนชนิดนี้ที่สามารถยับยั้งการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ ทำให้มีการสนใจนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในกระบวนการแช่แข็งของสิ่งมีชีวิต อวัยวะหรือเซลล์ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อช่วยรักษาสภาพของอาหารไม่ให้ถูกทำลายโดยผลึกน้ำแข็งซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียสารอาหารหรือ ช่วยทำให้พืชหรือสัตว์มีความต้านทานต่อความหนาวเย็นมากขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการถ่ายยีนแอนติฟรีซโปรตีนในสตรอเบอรีพันธุ์ ทิโอก้า

(Tioga) ยีนที่นำมาศึกษาอยู่ในรูป cDNA จากปลาโอเชียนเพาท์ในมหาสมุทรแอทแลนติก (Atlantic ocean pout) ซึ่งสร้างเป็น type III antifreeze protein isoform HPLC 6 ขั้นตอนแรกของงานวิจัยเริ่มจากศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญกลับเป็นยอดใหม่จากชิ้นใบสตรอเบอรีพันธุ์ทิโอก้า พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดคือ อาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA เข้มข้น 1 มก/ล และ 2,4-D เข้มข้น 0.2 มก/ล การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของชิ้นใบสตรอเบอรีพบว่า มีความไวต่อยากานามัยซินมาก แม้ที่ความเข้มข้นของยานี้ต่ำเพียง 5 มก/ล ก็สามารถยับยั้งการเจริญกลับเป็นยอดใหม่ได้ถึง 90% ขั้นตอนต่อไปคือทำการเปลี่ยนโคดอนให้เหมาะสมสำหรับแสดงออกในสตรอเบอรี โดยโคดอนที่มีความถี่ในการใช้สูงในสตรอเบอรี ถูกนำมาใช้ในการสร้างยีนสังเคราะห์ที่โคดสำหรับ type III antifreeze protein isoform HPLC 6 โดยวิธีโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น หลังจากนั้นสร้าง พลาสมิดที่เหมาะสมสำหรับแสดงออกของยีนในพืช โดยตัดต่อยีนแอนติฟริซโปรตีนที่มีโคดอนเหมาะสมแสดงออกในสตรอเบอรีใส่ลงในพลาสมิด pBI121 เรียกพลาสมิดที่ได้นี้ว่า pBB จากนั้นถ่ายยีนเข้าในชิ้นใบสตรอเบอรีโดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 ยีนแอนติฟริซโปรตีนที่ถ่ายเข้าไปมีสองชนิด ชนิดแรกเป็นยีนที่มาจากปลาอยู่ในพลาสมิด pSW1 และอีกชนิดเป็นยีนสังเคราะห์ที่เปลี่ยนโคดอนให้เหมาะสมสำหรับแสดงออกในสตรอเบอรีอยู่ในพลาสมิด pBB ต้นสตรอเบอรีที่ถูกถ่ายยีนในพลาสมิดทั้งสองสามารถออกรากได้ ในอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้มข้น 50 มก/ล ในขณะพืชที่ไม่ถูกถ่ายยีนไม่สามารถออกรากได้ และผลการทำโพลีเมอเรสเชนรีแอคชันพบยีนที่ถ่ายเข้าในจีโนมของสตรอเบอรี ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดจากใบสตรอเบอรีที่ถูกถ่ายยีนเข้าไปด้วยพลาสมิดทั้งสองด้วยวิธี western blot ไม่พบโปรตีนที่คาดว่าเป็นแอนติฟริซโปรตีนในตัวอย่างแต่พบในเซรุ่มของปลาซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved