

บทคัดย่อ

ต้นกะเพราแดงมีการแสดงออกของเม็คสีกกลุ่มแอนโทไซยานิน บริเวณเซลล์ของเนื้อเยื่อชั้นนอกสุด คาดว่าน่าจะมีหน้าที่ในการปกป้องเซลล์จากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การออกแบบไพรเมอร์จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนกลุ่มเฟลโวนอยด์ 3'ไฮดรอกไซเลส และ กลุ่มเฟลโวนอยด์ 3',5'ไฮดรอกไซเลส เพื่อใช้เทคนิค RT-PCR จาก cDNA ของกะเพราแดงพบว่ายังไม่มี ความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับ cDNA ต้นแบบของกะเพราแดง ทั้งจึงทำการแยกโคลน cDNA ของยีนเฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกไซเลส จากอะราบิโดปซิสแทนเพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่ต่อไป จากการศึกษาการผลิตสารแอนโทไซยานินโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะเพราแดง โดยการศึกษาความเข้มข้นของฮอร์โมนต่อการชักนำแคลลัส พบว่าใบกะเพราจากต้นอายุ 4 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ซึ่งมี NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ BA 1-1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรให้แคลลัสที่มีสีเขียวสด แต่เมื่อนำมาสกัดสารและวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน พบว่ามีการสะสมของสารแอนโทไซยานินต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับต้นกะเพราในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเรือนเพาะชำ

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ทำการเกษตรเป็นหลัก งานวิจัยในการศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ ยังอยู่ในระยะเริ่มต้นและยังอยู่ในวงจำกัด คือสนับสนุนการศึกษาเฉพาะพืชเศรษฐกิจเพียงบางชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด และ มันสำปะหลัง เป็นต้น ในขณะที่ประเทศไทยเรามีแหล่งพืชที่มีคุณค่าควรได้รับการสนับสนุน พืชเหล่านี้ได้รับความสนใจจากนานาชาติ พืชแต่ละชนิดมีคุณลักษณะเด่นในการผลิตสารที่ต่างกันออกไป การศึกษาพัฒนาเพื่อสร้างองค์ความรู้ในระดับโมเลกุลนั้น ต้องการชนิดของพืชที่มีชีวสังเคราะห์สารที่เด่นชัดสำหรับใช้ในการศึกษา ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่ศึกษากะเพราเขียวและแดง ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของไทย กะเพราแดงนิยมนำมาทำเป็นยาพื้นบ้าน เนื่องจากให้น้ำมันหอมระเหยและปริมาณแอนโทไซยานินในปริมาณที่สูงกว่ากะเพราเขียว

แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นสารกลุ่มเม็คสีกสะสมอยู่ในแวคคิวโอลของเนื้อเยื่อดอกและใบของพืชเป็นที่ทราบกันว่าสารกลุ่มนี้ให้คุณค่าทางอาหารเสริมสุขภาพและเภสัชเวช เช่นฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดการก่อมะเร็งและลดปริมาณคอเลสเตอรอล การสะสมของแอนโทไซยานินในพืชถูกควบคุมโดยสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น แสง อุณหภูมิ สารอาหาร และสภาวะเครียดอื่นๆ แอนโทไซยานินเป็นสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสารส่งสัญญาณของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อแสง UV-B การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีรายงานถึงการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่างเกิดขึ้น

เลขหมู่..... 64465..... สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง
เลขทะเบียน..... 11 ก.ย. 2549.....
วัน,เดือน,ปี.....
b..... 11629471.....
i.....

เมื่อพืชได้รับการรบกวนจากเชื้อโรค (Lo และ Nichoson 1998) เช่นเดียวกับข้าวโพดมีการสะสมของแอนโทไซยานิน เมื่อถูกหนอนรบกวนและพืชได้แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินกับการเพิ่มความต้านทานของหนอน (Byrne และ คณะ 1996)

วิถีชีวสังเคราะห์จาก phenylalanine ammonialyase (PAL) จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งได้แก่ ฟลาวอนอล แทนนิน และแอนโทไซยานิน (Weisshaar และ Jenkins 1998) วิถีชีวสังเคราะห์นี้ต้องการเอนไซม์หลายตัวเพื่อให้ได้สารกลุ่มเมดิสินี มีการแยกและจำแนกยีนซึ่งให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิด ชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในพืชหลายชนิด ชีวสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานินต้องการยีน 2 กลุ่มกลุ่มแรกคือกลุ่มยีนโครงสร้าง (structural gene) ซึ่งถอดและแปลรหัสให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีของการเกิดสารกลุ่มแอนโทไซยานิน กลุ่มที่สองคือกลุ่มยีนควบคุม (regulatory gene) ซึ่งถอดรหัสและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง (กนกพร 2002) ส่วนใหญ่จะควบคุมที่ระดับการถอดรหัส (transcriptional level) (Holton และ Cornish 1995) ยีนโครงสร้างในวิถีชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากพืชต่างชนิดกันจะมีบริเวณอนุรักษ์ ซึ่งให้กรดอะมิโนที่คล้ายคลึงหรือเหมือนกัน ดังนั้นรูปแบบการสร้างสารและหน้าที่การทำงานของยีนจึงน่าจะขึ้นกับการควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

มีการศึกษาและแยกยีนในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิดโดยทำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์และคัดเลือกพืชที่มีการกลายพันธุ์ และคัดเลือกพืชที่มีการเปลี่ยนแปลงสีของดอกหรือเมล็ด โดยเริ่มศึกษาในพืชจำพวกข้าวโพด สแนพครากอน และพิทูเนีย ทำให้สามารถแยกยีนโครงสร้างและยีนควบคุมกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้จำนวนมาก พบว่าเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการสร้างสารฟลาโวนอยด์ที่ติดกับผนังเซลล์และจับกลุ่มกันเป็นกลุ่ม โดยทดลองระบบ two-hybrid พบการจับกันเองของเอนไซม์ในต้นวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในอะราบิดอปซิส (Burbulis และ Winkel-Shirley 1999)

สีส้มในส่วนต่างๆของพืชถูกกำหนดโดยอัตราส่วนของแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin : กลุ่มของสารเคมีในแอนโทไซยานินที่ให้สีเฉพาะ) และโครงสร้างของแอนโทไซยานิดินที่ได้รับการเปลี่ยนแปลง เช่นการถูกเติมหมู่เอซิด, กลูโคส หรือหมู่เมธิล นอกจากนี้การเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินยังขึ้นกับค่า pH ในแวคคิวโอล และเมดิสินีที่อยู่ร่วมกัน ความพยายามที่จะควบคุมเปลี่ยนสีของดอกไม้ เพิ่งได้รับความสนใจเมื่อไม่นานมานี้ การเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) ให้กับวง B ของฟลาโวนอยด์เป็นจุดเริ่มต้นในการกำหนดเมดิสีสารฟลาโวนอยด์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 4 โดยเอนไซม์ flavanone 3-hydroxylase จะให้สารกลุ่มเพลาโกนิน (pelargonidin) ซึ่งมีสีโทนส้ม การเติมหมู่ไฮดรอกซีโดยเอนไซม์กลุ่มไซโตโครม (cytochrome) P450 เพิ่มเติม จะชักนำให้ดอกไม้เปลี่ยนแปลงสีส้มโดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F 3' H) จะชักนำให้เติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 3 ของวง B และให้สารกลุ่มไซยานิดินซึ่งมีสีโทนชมพูแดง และเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่สามารถตีพิมพ์ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'-H) จะชักนำให้เกิดการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 3 และหรือ 5 ของวง B และให้สารกลุ่มเดลฟิเนติน (delphinidin) ซึ่งให้สีโทนม่วงน้ำเงิน

ในส่วนพืชส่วนใหญ่พบว่าเอนไซม์ F3'-H และ F3',5'-H มีความสำคัญในการกำหนดเม็ดสี (Holton และ Tanaka 1994 ; Mol และคณะ 1998 ; Mol และคณะ 1999) ได้มีการแยกยีน F3',5'-H จากต้นพิทูเนีย โดยอาศัยการพื้นฐานความคล้ายคลึงของลำดับเบสกับเอนไซม์กลุ่ม P450 ชนิดอื่นๆ พบว่ายีนกลุ่มนี้แสดงออกสูงในดอกไม้ (Holton และคณะ 1993) และยีนของ F3'-H ก็สามารถแยกได้โดยใช้เทคนิคเดียวกัน (Brugliera และคณะ 1999) เมื่อเร็วๆนี้ Schoenbohm และคณะ 2000 ได้แยก cDNA ของ F3'-H จาก *Arabidopsis thaliana* มีรายงานว่า การแสดงออกเพิ่มขึ้น (overexpression) ของยีน F3',5'-H เพียงลำพังไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสีของดอกกุหลาบ (*Rosa* spp.) และดอกคาร์เนชัน (*Dianthus caryophyllus*) ซึ่งปกติจะไม่ให้เม็ดสีสีน้ำเงินม่วง (Brugliera และคณะ 2000)

อย่างไรก็ตามได้มีรายงานเอนไซม์ F3',5'-H ของพิทูเนียต้องการ cytochrome b5 (cty b5) ที่จำเพาะ เพื่อให้เกิดความสามารถในการทำงานสูงสุด โดยคาดว่า cty b5 จะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนต่อเอนไซม์ NADPH : cytochrome P450 reductase เพื่อให้เอนไซม์สามารถจับกับโปรตีน cytochrome P450 (de Vetterm และคณะ 1999) เมื่อเร็วๆนี้มีรายงานถึงการนำยีน F3',5'-H และ cty b5 จากพิทูเนียถ่ายโอนเข้าไปในคาร์เนชันพร้อมกัน พบว่าสีของดอกเปลี่ยนแปลงจากเดิมไปเป็นม่วงเข้ม (Brugliera และคณะ 2000) ในปัจจุบัน ได้มีรายงานการศึกษาถึงการสร้างสารแอนโทไซยานิน รวมถึงแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารกลุ่มนี้ โดยอาศัยความรู้ทางพันธุศาสตร์ เคมี และชีวเคมี แต่มีวิธีการสังเคราะห์สารกลุ่มนี้มีความซับซ้อน จึงไม่ทราบแนวทางการควบคุมการผลิตที่ชัดเจนในระดับโมเลกุล การโคลนยีนซึ่งสร้างแอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารจึงน่าจะเป็นจุดสำคัญในการศึกษาการสร้าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาเอนไซม์ที่ late limiting step จะมีผลให้สามารถนำความรู้มาใช้ในวิศวกรรมเมแทบอลิซึม เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างยีน การโอนถ่ายยีน เพื่อให้ได้ผลผลิตจากพืชที่มีลักษณะตามความต้องการผลิตอาหารเสริมหรือเภสัชเวชเป็นการค้า

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมพันธุ์กะเพรา

นำเมล็ดกะเพราแดงมาทำให้ปลอดเชื้อโดยใส่สารคลอโรกซ์[®] ซึ่งมีสารออกฤทธิ์โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 6% ลงไป 1.5 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่านาน 20 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อประมาณ 8 ครั้ง นำไปปลูกในอาหาร MS (Murshige และ Skoog 1962) เป็นเวลา 8 สัปดาห์จนได้ต้นกะเพราสูงประมาณ 3-4 เซนติเมตร

2.2 การศึกษาดำแหน่งของเม็ดสีแอนโทไซยานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำส่วนต่างๆของต้นกะเพราแดงที่สมบูรณ์มาแช่ในน้ำเย็น และสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อให้มีความบางมากที่สุด โดยส่งดูตำแหน่งเมื่อดีสเอนโทไซยานินในกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาตำแหน่งของเมื่อดีสเอนโทไซยานินในแต่ละชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อและบันทึกภาพ

2.3 การออกแบบไพรเมอร์

ลำดับไพรเมอร์สำหรับทำ PCR จะกำหนดจากกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequenced) ของยีนกลุ่มไซโตโครม P450 ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากพืชชนิดอื่น โดยการสืบค้นข้อมูลจาก GeneBank คัดเลือกโคลนและจัดเรียงกรดอะมิโนจะใช้โปรแกรม Clustalx

2.4 การสกัด RNA

กะเพราแดงและกะเพราเขียวที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ด อายุ 2 เดือนจะถูกนำมาสกัด total RNA โดยวิธีของ Pawlowski และ คณะ 1994 และทำการสร้างสาย cDNA จาก total RNA 10 นาโนกรัม โดย iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories)

2.5 การโคลนยีนโดยเทคนิค PCR

การแยกยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์จะใช้เทคนิค PCR โดยปฏิกิริยาของ PCR คือ cDNA จากกะเพราเขียวและแดง 3 ไมโครลิตร dNTP 10 mM 1 ไมโครลิตร 10X buffer 5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ 3 ไมโครลิตร ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ 1 ไมโครลิตร รีเวอร์สไพรเมอร์ 1 ไมโครลิตร เอนไซม์แทคตีเอ็นเอโพลีเมอเรส 1 ยูนิตต่อ ไมโครลิตร น้ำดีไอออไนซ์ 35.8 ไมโครลิตร และสภาวะที่ใช้ทำ PCR มีดังนี้

เฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกซีเลส denaturing ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing เปลี่ยนอุณหภูมิที่ 42, 45, 48 และ 50 องศาเซลเซียส 2 นาที และช่วง extension 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 35 รอบ

เฟลโวนอยด์ 3', 5' ไฮดรอกซีเลส denaturing ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing เปลี่ยนอุณหภูมิที่ 50, 52, 54 และ 58 องศาเซลเซียส 2 นาที และช่วง extension 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 35 รอบ

การแสดงออกของยีนที่แยกได้โดยวิธี RT-PCR จะใช้ total RNA ของกะเพราเขียวและแดง มาสร้างสาย DNA และใช้เทคนิค PCR ในการดูการแสดงออกของยีน ไพรเมอร์และสภาวะที่ใช้ทำ PCR ใช้เช่นเดียวกับการการแยกยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์

2.6 การโคลนยีนเฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกซีเลส จาก cDNA อะราบิโดปซิสเพื่อใช้เป็นแนวทางในการโคลนยีนในกะเพรา

ไพรเมอร์ดีไซด์จากยีน เฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกซีเลส ของอะราบิโดปซิสเพื่อให้ได้ช่วง ORF โดยการสืบ ค้นข้อมูลจาก GeneBank กำหนดลำดับดังนี้ F3'H F5' CGGGATCCATGG CAACTCTATTTCTCAC3' และ F3'H R 5' CGGGATCCACCCGACCCGAGTCCATAAA3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่ใช้คือ denaturing ที่ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 55 องศาเซลเซียส 2 นาที และ ช่วง extension 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 35 รอบ

2.5 การผลิตสารแอนโทไซยานินโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เพาะเมล็ดกะเพราแดงโดยเทคนิคปลอดเชื้อจนต้นมีอายุ 2 เดือน จากนั้นตัดชิ้นส่วนพืชให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตรแล้วไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีอัตราส่วนความเข้มข้นของฮอร์โมน NAAต่อBA ต่างๆกัน ดังตารางที่ 1 ทำการทดลองอย่างละ 8 ซ้ำ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่ 4 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะสมบูรณ์นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมนเหมือนกับแคลลัสอื่นๆ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงแล้วนำแคลลัสที่ได้ไปสกัดสารหาค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มแอนโทไซยานิน (Harborne และคณะ 2000) โดยเปรียบเทียบกับสารสกัดจากต้นกะเพราแดงในห้องเพาะเลี้ยงและจากต้นกะเพราแดงที่ปลูกในธรรมชาติ

ตารางที่ 1 สูตรอาหาร MS ที่มีสัดส่วนของฮอร์โมน NAA และ BA

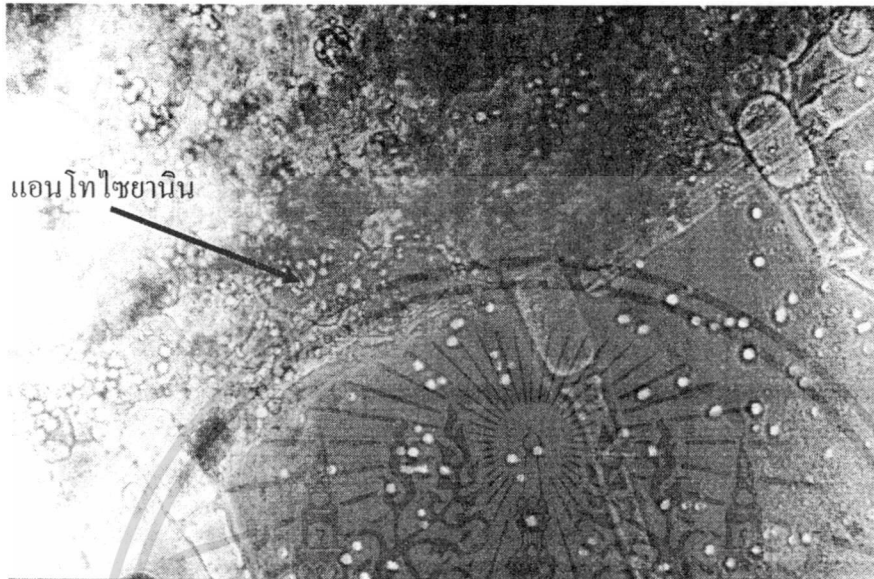
| BA(mg/l) \ NAA(mg/l) | A(0) | B(0.5) | C(1) | D(1.5) | E(2) |
|----------------------|------|--------|------|--------|------|
| F(0) | AF | BF | CF | DF | EF |
| G(0.25) | AG | BG | CG | DG | EG |
| H(0.5) | AH | BH | CH | DH | EH |
| I(1) | AI | BI | CI | DI | EI |
| J(1.5) | AJ | BJ | CJ | DJ | EJ |
| K(2) | AK | BK | CK | DK | EK |

3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาดำแหน่งของเมล็ดสีแอนโทไซยานิน

จากการตัดขวางแนวลำต้นของต้นกะเพราแดงจะพบว่า ตำแหน่งของเมล็ดสีแอนโทไซยานินมีการจัดเรียงตัวอยู่บริเวณเนื้อเยื่อชั้นเดียวๆ ในเซลล์ชั้นนอกสุด (epidermal cell) ดังรูปที่ 1

การพบเม็ดสีแอนโทไซยานินในเซลล์ที่บริเวณนอกสุดนั้น คาดว่าน่าจะเกิดจากคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์ของแอนโทไซยานิน เนื่องจากมีรายงานถึงความสามารถในการป้องกันรังสี UV-B ที่มีอันตรายต่อพืชซึ่งอาจมีผลต่อการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอในขั้นตอนการแบ่งเซลล์



รูปที่ 1 ภาพตัดขวางของลำต้นกะเพราแดงแสดงถึงเม็ดสีแอนโทไซยานิน

3.2 การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากฐานข้อมูลของ GeneBank โดยใช้ข้อมูลระดับกรดอะมิโนสามารถออกแบบไพรเมอร์ในยีนกลุ่มเฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกซีเลส (F3'H) และเฟลโวนอยด์ 3',5' ไฮดรอกซีเลส (F3',5'H) คือ

300-310

```

PF F3'H 241: QGVVAKMKKHLHQRFDAPLSLKEEBINN...SQQDQKHEDMLSTLIELKSD...LDGEGGSLTDTEIKALLNMFAGTDTS 307
CC F3'H 235: QGTHKMKKHLHRRDFPFLNILLKEEBIN...SASASATPSMLTTLIELKDSV...EDSGGGKLTDTTEIKALLNMFAGTDTS 310
PH F3'H 235: QGVAKMKKHLHRRFDAPLSLKEEBINN...SQQDQKHEDMLSTLIELKSD...LDGEGGSLTDTEIKALLNMFAGTDTS 307
AT F3'H 232: QGVAKMKKHLHRRFDAPLSLKEEBINN...SQQDQKHEDMLSTLIELKSD...LDGEGGSLTDTEIKALLNMFAGTDTS 307
MI F3'H 231: QGVAKMKKHLHRRFDAPLSLKEEBINN...SQQDQKHEDMLTTLIELKSD...FDGEGASLTDTEIKALLNMFAGTDTS 307
    
```

F3'H forward ไพรเมอร์ ช่วงลำดับกรดอะมิโนที่ 300-310 ได้ลำดับไพรเมอร์คือ F3'HF 5'GAYAYN GARATHAARGCNYT 3'

400-407

```

PF F3'H 399: RGSLLLVNVAIARDPFDKSNADPLSFRPERFLPGGKPNVDVKGNDVFELIPFGAGRRICAGMSLGLRMVQLLIATLVDFEN 478
CC F3'H 395: RGSLLLVNVAIARDPFDKSNADPLSFRPERFLPGGKPNVDVKGNDVFELIPFGAGRRICAGMSLGLRMVQLLIATLVDFEN 474
PH F3'H 391: RGSLLLVNVAIARDPFDKSNADPLSFRPERFLPGGKPNVDVKGNDVFELIPFGAGRRICAGMSLGLRMVQLLIATLVDFEN 470
AT F3'H 389: RGSLLLVNVAIARDPFDKSNADPLSFRPERFLPGGKPNVDVKGNDVFELIPFGAGRRICAGMSLGLRMVQLLIATLVDFEN 467
MI F3'H 388: RGSLLLVNVAIARDPFDKSNADPLSFRPERFLPGGKPNVDVKGNDVFELIPFGAGRRICAGMSLGLRMVQLLIATLVDFEN 467
    
```

F3'H reverse ไพรเมอร์ ช่วงลำดับกรดอะมิโนที่ 400-407 ได้ลำดับไพรเมอร์คือ F3'HR 5'GGRTCNCNGCDATNGCCCA 3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรรมใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

332-337

```

      280      290      300      310      320      330      340      350      360
SM F3'5'H 250: D L L T K M F E E H A S N E R R G . . . . . K P D F L D V M A N . . . R D N S E G E R L S I T N K A L L N L F T A G T D T S S S I E W A L A E M K N P A I L K K A : 330
LRF3'5'H 251: D L L T K M F E E H A T N E R R G . . . . . K P D F L D V M A N . . . R D N S E G E R L S T N N K A L L N L F T A G T D T S S S I E W A L A E M K N P A I L K K V : 331
PH F3'5'H 247: D A L L T K M F D E H K A T Y E R R G . . . . . K P D F L D V M E N . . . G D N S E G E R L S T T N K A L L N L F T A G T D T S S S I E W A L A E M K N P A I L K K A : 327
Phy F3'5'H 247: D A L L T K M F D E H K A T Y E R R G . . . . . K P D F L D V M E N . . . G D N S E G E R L S T T N K A L L N L F T A G T D T S S S I E W A L A E M K N P A I L K K A : 327
TH F3'5'H 255: D K L F T R M L E O H E A S A H . . . . . K P D F L D A T A A S L D D Y S S E E E R L S T S N K A L L N L F T A G T D T S S S I E W A L A E M K K K R L K R A : 334
CM F3'5'H 263: D V L L N K M I K E H T E S A H R E K D . . . . . N P D F L D I M A A T . . . Q E N T E G I O L N L V N K A L L L O L F T A G T D T S S S I E W A L A E M K N H R O L L N R A : 344
PF FSII 240: D A L L E K E I T D R E K Q R R T H G G G G G G E A K D F L D H F E D I M . . . E S G K A E V K F T R E H K A L L O F F T A G T D T T A I V C W A A E H T N N P N V L K K A : 327
OS F3'5'H 247: D L L F T K I Q Q R M R Q Q D G G E . . . . . M T D F L E C L K M E . K E G S D G K T T F M D N V G F L L E V V V G G T D T S N S V E W I M A E L D M P O V L N K V : 330
AT F3'5'H 257: D A V D R A I E Q M K P L R G R D D . . . . . E V K D F L Y I M K L . D O E G D S E V P I I N H K A L L T D V V V G G T D T S N T I E R M A E M S M P E E D R A : 340

```

F3',5'H forward ไพรมเมอร์ ช่วงลำดับกรดอะมิโนที่ 332-337 ได้ลำดับไพรมเมอร์คือ
 F3',5'H F 5' K T N R Y N G S N G G N A C N G A Y A C 3'

496-502

```

      460      470      480      490      500      510      520      530      540
SM F3'5'H 421: S E K N A K I E H R G N D F E L I P F G A G R R I C A G R R G I V M V E Y I L G T L V H S F D W K L P N . D V V D N M E E T F G L A L Q K A P L E A M V T P R L S F D I T Q S : 509
LRF3'5'H 422: S G K N V K I D P R G N D F E L I P F G A G R R I C A G R R G I V M V E Y I L G T L V H S F D W K F S N . D V K E I N M E E S F G L A L Q K A P L E A M V T P R L P F D V V Y T : 510
PH F3'5'H 418: S G R N S K I D P R G N D F E L I P F G A G R R I C A G R R G I V M V E Y I L G T L V H S F D W K L P S . E V I E I N M E E A F G L A L Q K A P L E A M V T P R L Q L D V V P : 506
Phy F3'5'H 418: S G R N S K I D P R G N D F E L I P F G A G R R I C A G R R G I V M V E Y I L G T L V H S F D W K L P S . E V I E I N M E E A F G L A L Q K A P L E A M V T P R L Q L D V V P : 506
TH F3'5'H 425: H S . . . . . K D P R G N D F E L I P F G A G R R I C A G R R G I V M V E Y I L A T V H S F D W K A A D Q D N N I N M E E A F G L A L Q K A P L K A E V T P R L P L H C Y L P : 511
CM F3'5'H 435: S E K H A K I D P R G N H F E L I P F G A G R R I C A G R R G A S V E Y I L G T L V H S F D W K L P D . G V V E V N M E E S F G L A L Q K P L S A E V T P R L P P P S S Y T V : 523
PF FSII 417: E K E K A A L D V K G S H F E L I P F G G R R R C P G V L E A I Q E V I I P G T L I Q C F D W K L P D . G S G H V E M A R P G L T A P R E T D L F C R V W P R D L V V S T : 505
OS F3'5'H 421: R D G G H H G D F T G S Q L D Y L P F G S G R R I C A G M A G E K V M V S Y A M L Q A F D W K L P Q . G V Q L D E S K F G I V H K A T P L V A R P T P R L S R P E L Y Y : 508
AT F3'5'H 431: D N . . N S C D F T G A N Y S Y P F G S G R R I C A G V A L A E R M V Y T D A T L H S F D W K H P E . G H V D L K E K F G I V L K L K I P L V A R P T P R F S D S N L Y L : 516

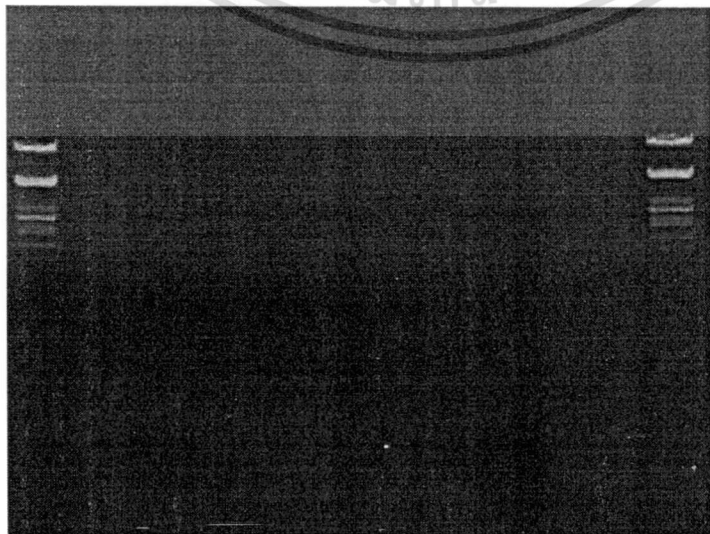
```

F3',5'H reverse ไพรมเมอร์ ช่วงลำดับกรดอะมิโนที่ 496-502 ได้ลำดับไพรมเมอร์คือ
 F3',5'HR 5' R N Y T T C C A R T C R A A N S W R T G 3'

3.3 การโคลนยีนกลุ่มไซโตโครม P450 ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

ในการแยกยีนกลุ่มไซโตโครม P450 หลังจากที่ได้สกัด total RNA และทำ cDNA เามาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับทำ PCR โดยใช้ไพรมเมอร์ที่ออกแบบในข้อ 3.3 มาทำ PCR และทดสอบผลผลิตของ PCR ที่ได้โดยทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ผลตามรูปที่ 2

M a b c d e f g h M



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รูปที่ 2 ผลการทำ PCR โดย a ถึง d เป็นช่วงอุณหภูมิ annealing ที่ 42, 45, 48 และ 50 องศาเซลเซียสของยีนเฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกไซเลสตามลำดับ และ e ถึง h เป็นช่วงอุณหภูมิ annealing ที่ 50, 52,

54 และ 58 องศาเซลเซียส ของยีนเฟลโวนอยด์ 3', 5' ไฮดรอกไซเลส ตามลำดับ

จากรูปเจลไม่พบแบนด์เอ็นเอเกิดขึ้น แม้ว่าจะเปลี่ยนช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ น่าจะเป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่ไม่เหมาะสมทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบได้

ดังนั้นในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่แยกได้โดยเทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกันกับการแยกยีนกลุ่มไซโตโครม P450 ไม่สามารถทำ PCR ต่อไปได้เพราะไพรเมอร์ไม่เหมาะสมต่อการจับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ

3.4 การโคลนยีนเฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกไซเลส จาก cDNA อะราบิดอปซิส

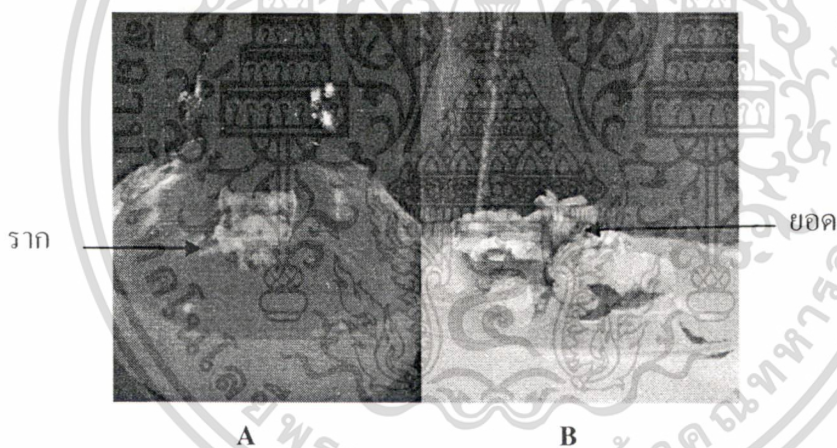


รูปที่ 3 ผลการทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบเป็น cDNA อะราบิดอปซิสและไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนเฟลโวนอยด์ 3' ไฮดรอกไซเลสของอะราบิดอปซิส

จากรูปเมื่อตรวจสอบการทำ PCR โดยใช้เจลิเล็กโตรโฟรีซิสจะพบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นที่ประมาณ 1500 bp ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นขนาดของยีนเพลวโนยด์ 3' ไฮดรอกไซเลสพอดี ดังนั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบและช่วงอุณหภูมิที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ มีความเหมาะสมในการทำPCRและสามารถเพิ่มยีนเพลวโนยด์ 3' ไฮดรอกไซเลส ได้มีการตรวจสอบโคลนโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อเป็นการยืนยันการโคลนยีนเพลวโนยด์ 3' ไฮดรอกไซเลส

3.3 การผลิตสารแอนโทไซยานินโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

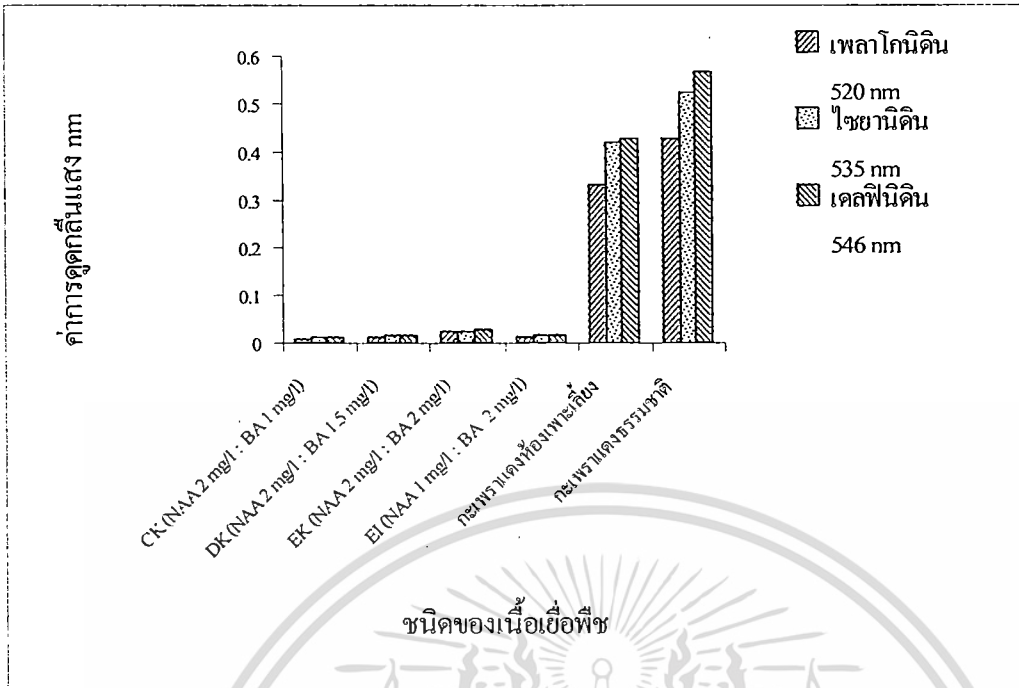
การเจริญเติบโตของใบกะเพราเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ พบว่าอาหารชักนำแคลลัสสูตรที่ปราศจากฮอร์โมน NAA (NAA 0 mg/l) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นแคลลัส อาหารสูตรที่มีฮอร์โมน NAA สูงขึ้นมีแนวโน้มที่จะเกิดแคลลัส เมื่อดูขนาดแคลลัสที่เกิดขึ้นพบว่าระดับฮอร์โมน BA ที่สูงขึ้นมีแนวโน้มชักนำให้เกิดแคลลัสขนาดใหญ่ อาหารสูตร AH (NAA 0.5 mg/l : BA 0 mg/l) มีการพัฒนาไปเป็นรากแต่ไม่เกิดยอด ส่วนอาหารสูตร DH (NAA 0.5 mg/l : BA 1.5 mg/l) พบว่ามียอดเกิดขึ้น 1 ยอด แต่พบเพียงแค่ 1 ชวด



รูปที่ 4 แคลลัสของกะเพราแดงที่เกิดรากและยอด โดย A เป็นแคลลัสจากอาหารสูตร AH สังเกตว่าแคลลัสมีการเจริญของราก (ถ้ารูปเมื่อสัปดาห์ที่ 4) ในรูป B แคลลัสจากอาหารสูตร DH จะสังเกตุยอด (ถ้ารูปเมื่อสัปดาห์ที่ 6)

เมื่อผ่านไป 5 สัปดาห์อาหารชักนำแคลลัสสูตรที่มีฮอร์โมน NAA ต่ำๆ จะเริ่มตาย แคลลัสในอาหารสูตรอื่นๆพบว่าแคลลัสมีขนาดใหญ่มากขึ้นในอาหารที่ความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA และ BA สูงๆ โดยเฉพาะอาหารสูตร CK (NAA 2 mg/l : BA 1 mg/l) และ DK (NAA 2 mg/l : BA 1.5 mg/l) พบแคลลัสขนาดใหญ่สีเขียวสด ส่วนอาหารสูตรที่มีขนาดแคลลัสใหญ่รองลงมาคืออาหารสูตร EK (NAA 2 mg/l : BA 2 mg/l) และ สูตรEI (NAA 1 mg/l : BA 2 mg/l) เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวจะเห็นเนื้อเยื่อแคลลัสมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว น้ำหนักแคลลัสตอนเริ่มเลี้ยงคือ 2 กรัม พอครบ 3 สัปดาห์ แคลลัสมีน้ำหนักถึง 5 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ

จากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกะเพราพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของแคลลัสจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีฮอร์โมนสูตรต่างๆ สารกลุ่มแอนโทไซยานิน มีค่าต่ำกว่าค่าสารสกัดจากต้นกะเพราแดงในห้องเพาะเลี้ยงและกะเพราแดงที่ขึ้นในธรรมชาติดังแสดงในรูปที่ 5

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาตำแหน่งของเมดดีแอนโทไซยานินพบว่า จะมีการสะสมแอนโทไซยานินอยู่ที่บริเวณเนื้อเยื่อชั้นต่างๆ ที่อยู่นอกสุด ซึ่งน่าจะเป็นแวคคิวโอลของเซลล์ การศึกษาการแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยเทคนิค PCR ไพรมเมอร์ที่ออกแบบขึ้นเพื่อใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ไม่เหมาะสมต่อการจับกับดีเอ็นเอแม่แบบให้ไม่เกิดการต่อสายดีเอ็นเอจึงไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นเมื่อทดสอบผลผลิต PCR ด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จึงน่าจะมีการปรับปรุงแก้ไข โดยการออกแบบไพรมเมอร์ใหม่ให้ไพรมเมอร์มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอแม่แบบมากขึ้น เพราะการออกแบบไพรมเมอร์ครั้งนี้ ทำในระดับกรดอะมิโน ซึ่งต้องออกแบบใหม่ให้มีความจำเพาะมากขึ้นในระดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนการโคลนยีนกลุ่มฟลาวอนอยด์ 3'-ไฮดรอกซีเลส โดยใช้ cDNA จากอะราบิดอปซิสโดยใช้ไพรมเมอร์ที่ออกแบบจากยีนฟลาวอนอยด์ 3'-ไฮดรอกซีเลสจากอะราบิดอปซิส พบว่าเมื่อตรวจสอบโดยทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะมีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นที่ประมาณ 1500 bp คาดว่าน่าจะเป็นยีนฟลาวอนอยด์ 3'-ไฮดรอกซีเลส ซึ่งมีการตรวจสอบโคลนแล้วโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

การศึกษากาการผลิตแอนโทไซยานินโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าแนวโน้มของอาหารที่มีความเข้มข้นของฮอร์โมน NAA ต่อ BA ที่สูงๆ การพัฒนาไปเป็นแคลลัสของใบกะเพราแดงจะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แคลลัสขนาดใหญ่ขึ้นและมีความสมบูรณ์ แต่เมื่อเอามาสกัดสารและวัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับต้นกะเพราที่ปลูกในห้องเพาะเลี้ยงและกะเพราที่ปลูกในธรรมชาติ พบว่ามีการสะสมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินน้อยมาก อาจเป็นไปได้ว่าลักษณะเนื้อเยื่อนั้นมีความแตกต่างกันโดยต้นกะเพราที่เป็นต้นนั้นมีอวัยวะครบแล้ว ส่วนแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อที่ยังไม่มีการพัฒนาไปเป็นอวัยวะกลไกในการชักนำและการสะสมของสารแอนโทไซยานิน จึงแตกต่างจากต้นกะเพราที่มีอวัยวะครบแล้วเหมือนในกะเพราที่ปลูกในห้องเพาะเลี้ยงและกะเพราที่ปลูกในธรรมชาติ

ตรวจเอกสาร

- กนกพร สมพรไพลิน. 2545. ผลของชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมเม็ดสีในพืช. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 10(1): 23-27.
- Bryne PF, McMullen MD, Snook ME, Musket TA, Theuri JM, Widstrom NW, Wiseman BR, Coe EH. 1996. Quantitative trait loci and metabolic pathways: genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. Proc Natl Acad Sci USA 93(17):8820-5.
- Burbulis IE, Winkel-Shirley B. 1999. Interactions among enzymes of the arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. Proc Natl acad sci USA 96(22):12929-34.
- Harborne, J.B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis, 1998, 3, 60-75.
- Holton TA, Brugliera F, Lester DR, Tanaka Y, Hyland CD, Menting JG, Lu CY, Farcy E, Stevenson TW, Cornish EC. 1993. Cloning and statement of cytochrome P450 genes controlling flower colour. Nature 366(6452):276-9.
- Holton TA, Cornish EC. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin Biosynthesis. Plant cell 7:1071-1083.
- Lo SC, Nicholson RL. 1998. Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls for a compensatory role in the defense response. Plant Physiol 116(3):979-989.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:431-97.
- Pawlowski K, Kunze R, Vries SD, Bisseling T. 1994. Isolation of total, poly(A) and polysomal RNA from plant tissues. Gelvin SB, Schilpertoort RA, editors:Kluwer Academic Publishers.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Schoenbohm C, Martens S, Eder C, Forkmann G, Weisshaar M. 2000 Identification of arabidopsis thaliana flavonoid 3' hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. *Biol chem.* 381:749-753.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W:improving the Sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Weisshaar B, Jenkins GI. 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* 1(3):251-257.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้