



รายงานวิจัย

เรื่อง

การโคลนยีน *chalcone reductase (CHR)* จากถั่วเหลือง

**Molecular Cloning of *Chalcone Reductase (CHR)* Gene
from *Glycine max (L.) Merr.***

รช
สบ
๒๐๕
๙๔
๙๑๒๓
๑๖ ๑

นางสาวมณฑินี ชีรารักษ์

นางสาวนิตา ดวงกั้งแสน

นางสาวนิภาพร ยลสวัสดิ์

b. 1๒๑๐๘๙๘๕
i.

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 121226

วัน, เดือน, ปี 26 ส.ค. 2555

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2548

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณหลักสูตรพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ได้สนับสนุนโครงการวิจัย เรื่อง การโคลนยีน *chalcone reductase (CHR)* จากถั่วเหลือง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย การโคลนยีน *chalcone reductase (CHR)* จากถั่วเหลือง

Molecular Cloning of *Chalcone Reductase (CHR)* Gene from *Glycine max (L.) Merr.*

แหล่งเงิน _____ เงินรายได้ _____

ประจำปีงบประมาณ _____ 2548 _____ จำนวนเงินที่ได้รับ _____ 90,000 บาท _____

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2547 ถึง กันยายน 2548

ผู้ดำเนินงานวิจัยพร้อมหน่วยงานต้นสังกัดและอีเมลล์

1. นางสาวมณฑินี ชีรารักษ์ หัวหน้าโครงการวิจัย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520 E-mail: ktmontin@kmitl.ac.th

2. นางสาววนิดา ดวงกั้งแสน ผู้ร่วมโครงการวิจัย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520 E-mail: kdwanida@kmitl.ac.th

3. นางสาวนิภาพร ยลสวัสดิ์ ผู้ร่วมโครงการวิจัย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520 E-mail: kynipapo@kmitl.ac.th

คำสำคัญ (Keywords) ถั่วเหลือง, การโคลนยีน, ยีน *chalcone reductase*

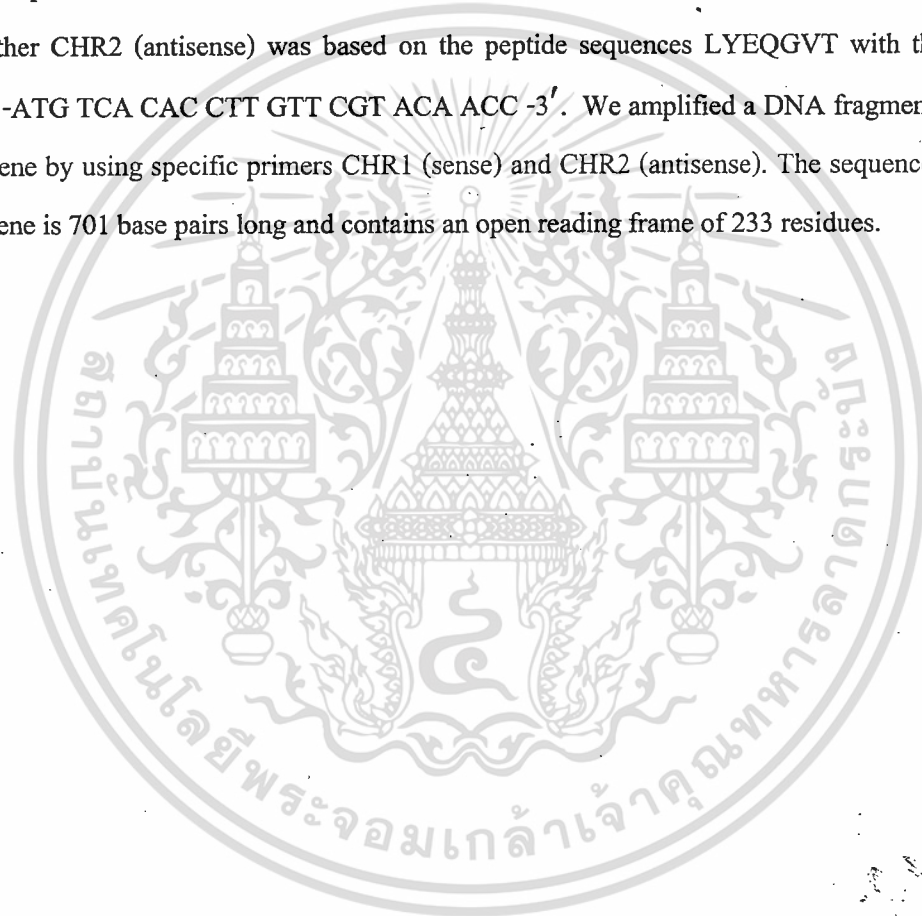
บทคัดย่อ

ในการโคลนยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ *chalcone reductase (CHR)* ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) จากต้นถั่วเหลืองที่ได้รับแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเริ่มต้นจากการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลืองที่แยกได้โดย Perfect RNA TM, Eukaryotic Mini Kit และนำมาสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายแรก ด้วยไพรเมอร์ oligo(dT)₁₅ ตามวิธี ImProm-II™ Reverse Transcriptase system และนำ cDNA มาใช้เป็นตัวแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ CHR1 (sense) มีการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน SAPDFTC และมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3' และ ไพรเมอร์ CHR2 (antisense) มีการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน LYEQVGT และมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3' ทำการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นยีน *chalcone reductase* ด้วยไพรเมอร์ CHR1 (sense) และ ไพรเมอร์ CHR2 (antisense) พบว่าเมื่อศึกษาการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 701 คู่เบส โดยกำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 233 เรซิดิว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Glycine max (L.) Merr. was grown under standard greenhouse conditions. For isolation of *chalcone reductase* gene by Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), the template cDNA was prepared from UV-treated seedlings. Total RNA was isolated from the seedling according to Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini Kit and first-strand cDNA was synthesized with oligo(dT₁₅)-anchor primer using ImProm-II™ Reverse Transcriptase system. The specific primer CHR1 (sense) was based on the peptide sequences SAPDFTC with the nucleotide sequence 5'-ATC TGC GCC TGA CTT CAC ATG-3' and another CHR2 (antisense) was based on the peptide sequences LYEQGVV with the nucleotide sequence 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3'. We amplified a DNA fragment of *chalcone reductase* gene by using specific primers CHR1 (sense) and CHR2 (antisense). The sequence of *chalcone reductase* gene is 701 base pairs long and contains an open reading frame of 233 residues.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญภาพ	ii
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	10
อุปกรณ์	10
วิธีการ	12
ผลและวิจารณ์	15
สรุป	24
เอกสารอ้างอิง	25



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การกระบวนกรสังเคราะห์แคโรทีนอยด์	5
2 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์แสดงลักษณะวง A, B และ C การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวง B และ C ทำให้เกิดฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ	6
3 กระบวนกรสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม anthocyanin และฟลาโวนอยด์ในบางกลุ่ม	8
4 การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ชนิด 5-hydroxyflavonoids และ 5-deoxyflavonoids	9
5 การวิเคราะห์ multiple alignment โปรตีนของยีน <i>chalcone reductase</i> ในพืช 5 ชนิด	16
6 การแยกอาร์เอ็นเอด้วย Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini Kit	18
7 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ของยีน CHR จากอาร์เอ็นเอของถั่วเหลือง โดยวิธี RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ CHR1/CHR2	20
8 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CHR</i> จำนวน 701 คู่เบสที่แยกได้จากใบถั่วเหลือง แปลเป็นรหัสกรดอะมิโน 233 เรซิดิว (แถว+2 และขีดเส้นใต้)	22
9 การวิเคราะห์ multiple alignment ระหว่างโปรตีนของยีน <i>CHR</i> จากใบถั่วเหลือง กับโปรตีน CHR ในพืชชนิดอื่น	23

การโคลนยีน *chalcone reductase* (CHR) จากถั่วเหลือง
Molecular Cloning of *Chalcone Reductase* (CHR) Gene
from *Glycine max* (L.) Merr.

คำนำ

ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกนอกจากจะมุ่งเน้นในการปรับปรุงเรื่องของกลิ่น รูปทรง ขนาดของดอก และอายุการใช้งานของดอกไม้ สีของดอกไม้จะเป็นจุดเด่นและเป็นส่วนสำคัญต่อการตัดสินใจซื้อของผู้ใช้ดอกไม้อย่างมาก นักปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกจึงให้ความสำคัญต่อสีของดอกไม้เช่นกัน แต่ไม้ดอกบางพันธุ์ยังขาดความหลากหลายของสีดอก อาทิเช่น กล้วยไม้จัดเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะในปัจจุบันนี้ประเทศไทยได้รับการยอมรับจากต่างประเทศว่าเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญของโลก กล้วยไม้จัดเป็นสินค้าไม้ดอกไม้ประดับซึ่งเป็นที่นิยมสูงในตลาดโลก และเป็นสินค้า product champion ที่สำคัญของไทย มีความสวยงามโดดเด่น มีเสถียรภาพ มีมูลค่าสูง และจัดเป็นสินค้าที่อยู่ในเศรษฐกิจสร้างสรรค์ (Creative Economy) โดยอุตสาหกรรมกล้วยไม้ของไทยสามารถสร้างรายได้นำเงินเข้าสู่ประเทศได้เป็นจำนวนมาก ในปี 2552 ประเทศไทยส่งออกดอกกล้วยไม้และต้นกล้วยไม้คิดเป็นมูลค่า 2,738.82 ล้านบาท (คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2553) ดอกกล้วยไม้เป็นที่นิยมใช้ทั้งในตลาดภายในประเทศและต่างประเทศมาเป็นเวลานาน กล้วยไม้ที่นิยมปลูกเพื่อตัดดอกมากที่สุด คือ กล้วยไม้หวาย พันธุ์ที่ได้รับการส่งเสริมได้แก่ *Dendrobium Pompadour*, *Dendrobium Walter Oumae*, *Dendrobium Jaquelyn Thomas*, *Dendrobium Ekapol 'Panda'*, *Dendrobium Caesar*, *Dendrobium Waipahu*, *Dendrobium Sonia*, *Dendrobium Kasam Gold*, *Dendrobium Mary Muk*, *Dendrobium Mary Muk*, *Dendrobium Mary Trowse* ประเทศผู้นำเข้าดอกกล้วยไม้ที่สำคัญของไทยคือ ญี่ปุ่น ส่วนใหญ่ของกล้วยไม้ที่ปลูกตัดดอกเป็นกล้วยไม้สกุลหวาย และส่งออกประมาณครึ่งหนึ่งของผลผลิตทั้งหมด กล้วยไม้สกุลหวายที่ปลูกตัดดอกเพื่อการค้ามีสีจำกัดอยู่เพียงไม่กี่สี ส่วนมากจะเป็นดอกสีขาว (*Dendrobium Jaquelyn Thomas 4N*) ดอกสีม่วงปนขาว (*Dendrobium Venus*) ดอกสีม่วง (*Dendrobium Pompadour*, *Dendrobium Sabin*) (จิตรพรพรรณ, 2542) เนื่องจากในปัจจุบันพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายสีเหลืองมีอยู่น้อยพันธุ์ และส่วนใหญ่มีรูปร่างลักษณะและสมบัติอื่นๆ ค่อนข้างคล้ายกับสีม่วง และพันธุ์ดอกสีขาว ดอกกล้วยไม้สกุลหวายสีเหลืองมักให้ดอกขนาดเล็ก มีสีเขียว และสีน้ำตาลปน ไม่มีลักษณะที่เหมาะสมที่จะนำมาปลูกเลี้ยงเพื่อตัดดอกทั้งในด้านรูปร่างลักษณะดอก และช่อดอก (กรรชิต, 2541) อีกทั้งไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดยังไม่มีพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ให้ดอกสีเหลือง เช่น geranium, cyclamen และ saintpaulia (Ono *et al.*, 2006) หรือถ้ามีพันธุ์ที่ให้ดอกสีเหลือง เช่น ดอกพิทูเนีย และ pelargonium แต่ก็พบว่ามีการสืบพันธุ์ด้วย (Doroles *et al.*, 2000)

การปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกจะต้องดำเนินต่อไปเรื่อยๆ และควรมีหลายๆ พันธุ์ที่มีความหลากหลาย เพื่อตอบสนองต่อผู้บริโภค ที่มีความต้องการแตกต่างกันทั้งในเรื่องของรสนิยมและค่านิยม ในการเริ่มต้นจากการโคลนยีน *chalcone reductase* และนำยีนที่โคลนได้ถ่ายเข้าไปในต้นพืช ทำให้เกิดการเปลี่ยนวิถีของการเกิดปฏิกิริยาเคมีภายในต้นพืช เพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์สีดอกไม้ด้วยยีนดังกล่าวคาดว่าจะน่าจะเป็นดอกในโทนสีเหลือง ซึ่งช่วยในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ และพืชต้นใหม่ยังคงลักษณะที่ดีไว้ได้ต่อไปในอนาคตการศึกษาวิจัยการปลูกเลี้ยง เช่นเดียวกับการทดลองของ Doroles *et al.*, (2000) ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ดอกพิทูเนียพันธุ์ใหม่ที่มีดอกสีเหลืองด้วยการถ่ายยีน *chalcone reductase (chr)* จาก alfalfa เข้าสู่พิทูเนียดอกสีขาวพันธุ์ Mitchell ทำให้ดอกพิทูเนียจากเดิมสีขาวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน



การตรวจเอกสาร

1. กลุ่มสารที่ทำให้เกิดสีในดอกไม้

สีของดอกไม้เกิดจากกลุ่มเม็ดสี 3 กลุ่มใหญ่ คือ เฟลโวนอยด์ (flavonoid) คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เหมือนกับที่พบในดอกไม้อื่นๆ สารในกลุ่มเฟลโวนอยด์พบในพืชชั้นสูงทุกชนิดเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญต่อพืช เช่น การเกิดของสีดอกไม้ การงอกของละอองเกสร การควบคุมการขนส่งฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซิน และเป็นสาร chemoattraction ของ rhizobia และชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *nod* และยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในพืช เฟลโวนอยด์จึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการการเติบโตและพัฒนาของพืช บทบาทของเฟลโวนอยด์ในการทำให้เกิดสีของดอกไม้ซึ่งเป็นกลุ่มเม็ดสีที่ละลายในน้ำ อยู่ในส่วนของแวคคิวโอ เป็นสารกลุ่มใหญ่และกลุ่มหลักที่ให้สีแก่พืชมีเมล็ดที่ค่อนข้างกว้าง ตั้งแต่สีเหลืองอ่อน ๆ จนถึงสีแดง สีม่วง สีนํ้าเงิน (Folkman, 1991) เช่น anthocyanins ให้สีม่วง สีนํ้าเงิน สีส้ม และสีแดง flavonols chalcone aurones ให้สีเหลือง flavonones และ flavanones ไม่ให้สี ซึ่งจะเห็นเป็นสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน คลอโรฟิลล์เป็นกลุ่มเม็ดสีที่ละลายได้ในอะซีโตน และ เมธานอล อยู่ในคลอโรพลาสต์ เป็นเม็ดสีกลุ่มเดียวที่ให้สีเขียว คลอโรฟิลล์ที่พบในพืชชั้นสูง คือ คลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี โดยเฉพาะในระยะดอกตูมจะเห็นสีเขียวชัดเจน เมื่อดอกเริ่มบานสีเขียวจะจางลงเนื่องจากการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ และปรากฏสีขาวหรือสีเหลืองชัดเจนขึ้น ส่วนแคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มเม็ดสีที่ละลายได้ในไขมันอยู่ในคลอโรพลาสต์ของเนื้อเยื่อที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ เช่น ใบ และเนื้อเยื่อสีเขียวและอยู่ใน chloroplast ของเนื้อเยื่อที่ไม่มีสีเขียวซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์แสง เช่น ดอกไม้ ผลไม้ และเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่มีสีเหลืองและสีส้ม แคโรทีนอยด์ให้สีเหลือง สีส้ม และส้มแดง หน้าที่ที่สำคัญของแคโรทีนอยด์ ได้แก่ ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสง ป้องกันพลังงานแสงที่จะทำลายคลอโรฟิลล์ (Bartley and Scolnik, 1995)

2. กลุ่มสารที่ทำให้เกิดสีเหลืองในดอกไม้

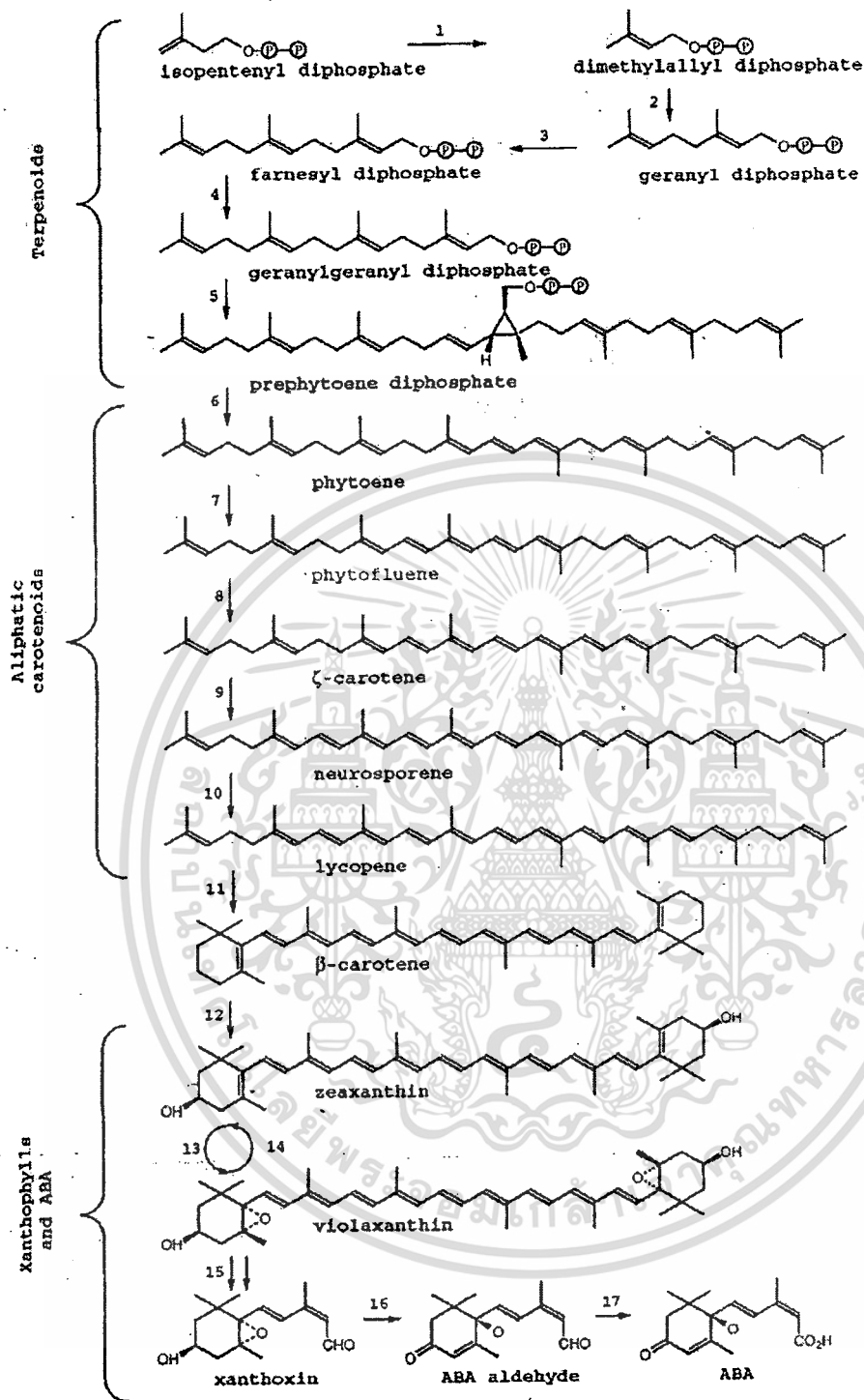
กลุ่มแคโรทีนอยด์ เป็นกลุ่มรงควัตถุที่ให้สีดอกไม้ในโทนสีเหลือง สีส้ม และสีแดง ส่วนใหญ่ของดอกไม้สีเหลืองเกิดจากรงควัตถุพวกแคโรทีนอยด์ ปัจจุบันมีการศึกษากระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์กันอย่างกว้างขวาง ได้มีการแยกและโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากพืชหลายชนิด เช่น ยาสูบ ข้าว ข้าวโพด พริกไทย ถั่วเหลือง มะเขือเทศ เป็นต้น ในพืชชั้นสูงแคโรทีนอยด์ถูกสร้างผ่านกระบวนการสังเคราะห์ isoprenoids (ภาพที่ 1) โดยสะสมอยู่ในคลอโรพลาสต์ทำหน้าที่ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสง ป้องกันพลังงานแสงที่จะทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรฟิลล์ และสะสมในคลอโรพลาสต์ในปริมาณสูงทำให้ปรากฏเป็นสีเหลือง สีส้ม หรือสีแดง ในส่วนของผล ดอก ใบที่เสื่อมสภาพ และรากของพืชบางชนิด สีเหลืองทั่วไปของดอกไม้เกิดจากการสะสมสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ แต่การรวมกันของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ และ anthocyanin ทำให้เกิดสีเหลืองในโทนสีที่แตกต่างออกไป (Bartley and Scolnik, 1995) ยีนที่ใช้ในการกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ถูกถอดรหัสมาจากนิวเคลียส และแปลรหัสเป็นโปรตีน และถูกส่งเข้าเข้ามาในพลาสต์ แคโรทีนอยด์ตัวแรกที่สังเคราะห์ขึ้นตัวแรกที่สังเคราะห์ขึ้นคือ phytoene โดยการทำงานของเอนไซม์ phytoene synthase ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงสารประกอบ geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) 2 โมเลกุล เป็นสาร prephytoene pyrophosphate จึงเปลี่ยนเป็น phytoene เป็นสารที่ไม่มีสี ต่อมา phytoene จะถูกเปลี่ยนเป็น ζ -carotene เป็นสารสีเหลือง โดยการทำงานของเอนไซม์ phytoene desaturase สาร ζ -carotene สามารถเปลี่ยนเป็นแคโรทีนอยด์ตัวอื่น เช่น lycopene เป็นสารที่มีสีแดง β -carotene เป็นสารที่มีสีส้ม และ xanthophyll ซึ่งมีสีเหลือง (Cunningham and Gantt, 1998)

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *phytoene synthase* ในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยตรวจระดับ mRNA ของผล melon ในส่วนของราก ใบ และ ผล พบว่าที่ส่วนผล melon ในระยะที่ผลมีสีเขียวมีการแสดงออกของยีน *phytoene synthase* ในระดับต่ำ แต่มีการแสดงออกสูงสุดเมื่อผลเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีส้ม และลดต่ำลงเมื่อผลสุกเต็มที่ ส่วนที่ใบและรากมีการแสดงออกน้อยมาก (Karvouni *et al.*, 1995) เม็ดสีเหลืองเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ซึ่งมักพบอยู่ร่วมกัน 6 ชนิด คือ neoxanthin violaxanthin antherxanthin lutein zeta-xanthin และ β -carotenoid แคโรทีนอยด์เป็นเม็ดสีที่พบในพลาสต์ให้โทนสีเหลือง สีส้ม พบในดอกทานตะวัน ผลมะเขือเทศ (Bartley and Scolnik, 1995) นอกจากดอกสีเหลืองเกิดจากเม็ดสีในกลุ่มแคโรทีนอยด์แล้ว ดอกไม้สีเหลืองเกิดจากการสะสมสาร flavonoids ชนิด chalcones aurones และ flavonol บางชนิด โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids ประกอบด้วยอะโรมาติกคาร์บอน 2 วง (A และ B) และ heterocyclic ring 1 วง (C) (ภาพที่ 2)

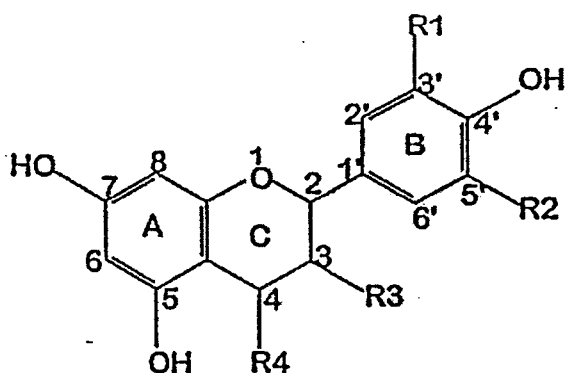
การสังเคราะห์สารในกลุ่ม flavonoids (ภาพที่ 3) เริ่มจากสารตั้งต้น malonyl-CoA และ p-coumaroyl-CoA โดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดการรวมตัวเป็นสารประกอบ chalcone เป็นสารที่ทำให้เกิดสีเหลือง (Holton and Cornish, 1995) มีอยู่ 2 ชนิด คือ 6'-hydroxychalcones มีหมู่ hydroxy ตำแหน่งที่ 6' ของวง A เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารในกลุ่ม flavonoids เช่น anthocyanin และ flavonols เป็นต้น และอีกชนิดหนึ่งคือ 6'-deoxychalcones ไม่มีหมู่ hydroxy ตำแหน่งที่ 6' ของ วง A เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์สาร 5-deoxyflavonoids (Tanaka *et al.*, 1998) พบในพืชไม่กี่ชนิดเท่านั้น เช่น พืชในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) (Dixon and Pavia, 1995) สาร chalcone ชนิด 6'-hydroxychalcones จะถูกสังเคราะห์ขึ้นเมื่อมี



ภาพที่ 1 การกระบวนการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

ที่มา: Cunningham and Gantt (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์แสดงลักษณะวง A, B และ C การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวง B และ C ทำให้เกิดฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ

ที่มา: Madhuri and Reddy (1999)

เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เพียงชนิดเดียว ส่วน 6'-deoxychalcones จะถูกสร้างขึ้นเมื่อมีเอนไซม์ CHR และร่วมทำงานกับเอนไซม์ CHS ซึ่ง chalcone ทั้ง 2 ชนิดเปลี่ยนไปเป็น 5'-hydroxyflavonoids และ 5'-deoxyflavonoids ตามลำดับโดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) (Deroles *et al.*, 2000) ดังนั้นในดอกไม้บางพันธุ์และบางชนิดการสะสมของ chalcones จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อเกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ CHI (ภาพที่ 4) (Heller and Forkmann, 1988) แต่อย่างไรก็ตามในการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ CHI ด้วยเทคนิค antisense RNA ในพืชเนื้อเยื่อ ยังไม่ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืชเนื้อเยื่อให้มีดอกสีเหลือง เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเกิด isomerisation ของ 6'-hydroxychalcone และ 6'-deoxychalcones โดยการทำงานของเอนไซม์ CHI พบว่า 6'-deoxychalcones มีอัตราการเกิด isomerisation ต่ำกว่า 6'-hydroxychalcone (Miles and Main, 1989) ในดอกไม้สีเหลือง เช่น Cosmos Dahlia Coreopsis และ Bidens มีการสะสม chalcones ชนิด 6'-dexychalcone เป็นจำนวนมาก (Bohm, 1993) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงพืชให้ผลิต 6'-deoxychalcone จะทำให้อัตราการเกิด isomerisation ไปเป็นสารอื่น ทำให้เกิดการสะสม chalcones มากขึ้น น่าจะทำให้เกิดเป็นดอกไม้สีเหลืองขึ้น

3. ยีน *chalcone reductase*

ยีน *CHR* เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สาร isoflavonoids (ภาพที่ 1) พบใน alfalfa และพืชวงศ์ถั่วบางชนิด การสร้างสาร isoflavonoids ขึ้นอยู่กับระยะในการพัฒนาของต้นพืช และมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อพืช หรือเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น การได้รับแสง ultraviolet การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน รวมทั้งการอยู่เข้าทำลายของเชื้อ (Dixon and Paiva, 1995) ตัวอย่างพืชที่ได้มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการโคลนยีน *CHR* มาแล้ว เช่น alfalfa พันธุ์ Nagyszensai (Sallud *et al.*, 1995) *Sesbania rostrata* (Gorrmachtig *et al.*, 1999) และ *Pueraria montana* (GenBank : AF462632)

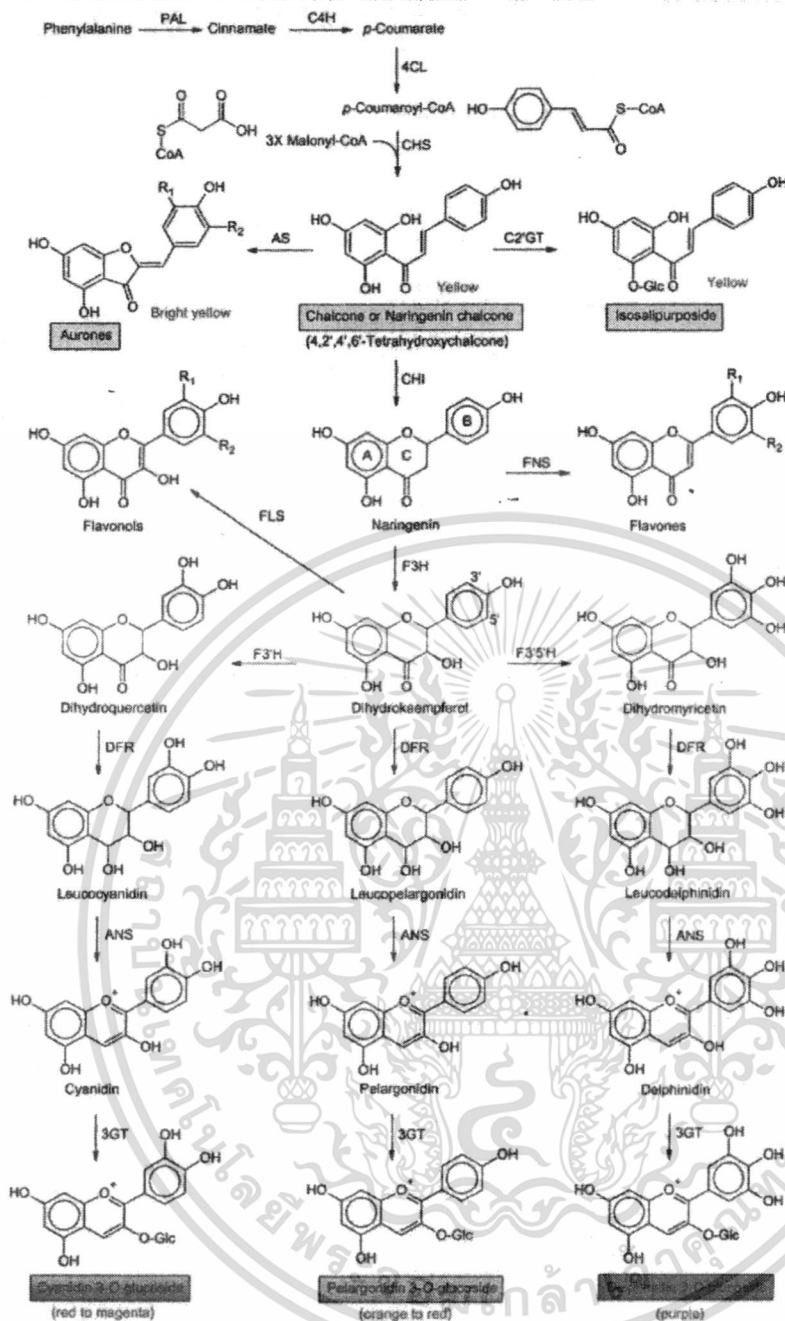
4. ความก้าวหน้าและความเป็นไปได้ของ metabolic engineering ในพืชเพื่อผลิตไม้ดอกสีเหลือง

metabolic engineering คือ การเปลี่ยนวิถีของการเกิดปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ โดยเปลี่ยนปฏิกิริยาทางเคมีที่มีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง 1 ปฏิกิริยา หรือ มากกว่า 1 ปฏิกิริยา เพื่อผลิตสารประกอบชนิดใหม่ หรือผลิตสารประกอบเดิมให้มากขึ้น หรือทำให้เกิดการสลายตัวของสารประกอบที่เดิมผลิตได้ในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (DellaPenna, 2001) ตัวอย่างความก้าวหน้าและความเป็นไปได้ของ metabolic engineering ในวิถีของการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เพื่อผลิตไม้ดอกสีเหลือง

Van Blokland *et al.* (1993) ทดลองถ่ายยีนที่ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ CHI แบบ antisense ในพิทูเนีย และ lisianthus โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้เกิดการสะสม chalcone เป็นกลุ่มสารที่ให้สีเหลือง แต่ไม่ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พิทูเนีย และ lisianthus ให้มีดอกสีเหลือง ภายหลังได้ค้นพบยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ chalcone 2'-glucosyltransferase (C2'GT) สามารถเปลี่ยน chalcone ไปเป็นสารตัวอื่น ทำให้ไม่เกิดการสะสม chalcone จึงเป็นสาเหตุให้ไม้ดอกทั้ง 2 ชนิดไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีดอกมาเป็นสีเหลือง (Yu *et al.*, 2006)

Doroles *et al.*, (2000) ได้ทดลองถ่ายยีน *chalcone reductase (chr)* จาก alfalfa เข้าสู่พิทูเนีย ดอกสีขาวพันธุ์ Mitchell ทำให้เกิดการสะสมสาร chalcones ชนิด 6'-deoxychalcones ที่บริเวณกลีบดอกจำนวนมาก พบว่าดอกพิทูเนียจากเดิมสีขาวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนวิถีของปฏิกิริยาของการสังเคราะห์ chalcones ชนิด 6'-hydroxychalcones เป็น chalcones ชนิด 6'-deoxychalcones ส่งผลให้เอนไซม์ CHI ชนิด type I ที่ถูกสังเคราะห์จากยีนภายในพิทูเนียเองไม่สามารถใช้ 6'-deoxychalcones เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาได้ จึงทำให้เกิดการสะสม 6'-deoxychalcones เช่นเดียวกับการทดลองของ Akashi *et al.* (1997) ได้ถ่ายยีน *chr* จากต้น licorice เข้าสู่พิทูเนีย

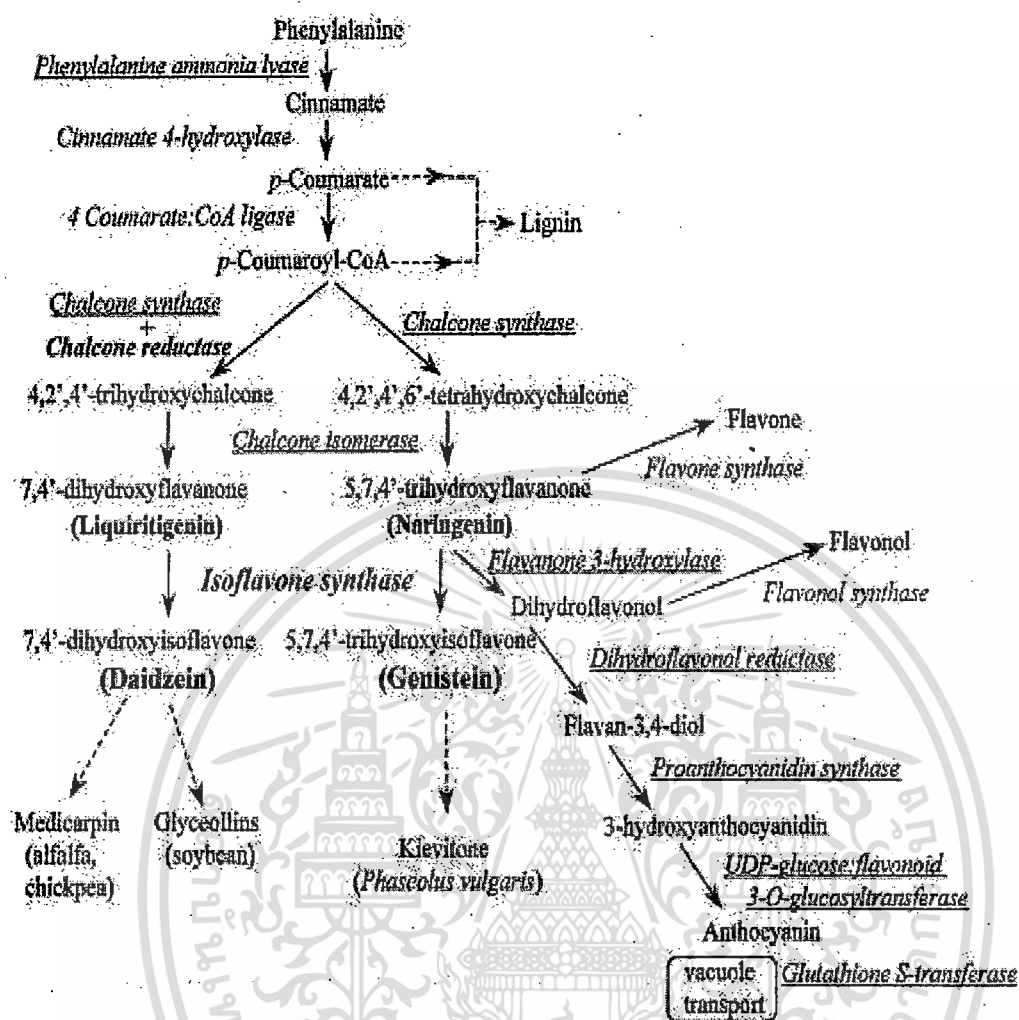
Ono *et al.* (2006) ได้ถ่ายยีน *aureusidin synthase (AS)* จากต้นลิ้นมังกร แบบ sense ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนสาร chalcone ไปเป็นฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม aurones เป็นกลุ่มสารที่ให้สีเหลืองกับพืช เข้าสู่ต้น torenia (*Torenia hybrida*) พันธุ์ Summer Wave Blue เป็นพันธุ์ที่ให้ดอกสีน้ำเงินที่เกิดจาก anthocyanins ชนิด malvidin พบว่า ต้น torenia ที่ได้รับการถ่ายยีนมีการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก และไม่มีการสะสมสาร aurones ในการทดลองต่อมาจึงทดลองถ่ายยีน *chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT)* แบบ sense เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ให้เกิดปฏิกิริยา glucosylation ให้กับ chalcone ที่ตำแหน่ง 4' ของวง B ถูกเปลี่ยนไปเป็น



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม anthocyanin และฟลาโวนอยด์ในบางกลุ่ม โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ ANS, anthocyanin; AS, aureusidin synthase; C2'GT, chalcone 2'-O-glucosyltransferase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; CHI, chalcone isomerase; CHR, chalcone reductase; DFR, dihydroflavonol-4-reductase; F3H, flavanone-3-hydroxylase; F3'H, flavonoid-3'-hydroxylase; F3',5'H, flavonoid-3'5'-hydroxylase; PAL, phenylalanine ammonia lyase; 3GT, UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 4CL, 4-coumarate CoA ligase

ที่มา: To and Wang (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ชนิด 5-hydroxyflavonoids และ 5-deoxyflavonoids
ที่มา: Yu et. al, (2000)

ฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม aurones ในลำดับต่อมาโดยเอนไซม์ AS พบว่า ดิ้น torenia ที่ได้รับการถ่ายโอนไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก แต่มีการสะสม tetrahydroxychalcone 4'-O glucoside เป็นกลุ่มสารที่ให้สีเหลืองอ่อนในกลีบดอก แต่สีของดอก torenia ยังคงมีสีน้ำเงินเช่นเดิม เมื่อทดลองถ่ายยีน AS ร่วมกับยีน 4'CGT แบบ sense เข้าสู่ดิ้น torenia พบว่า ทำให้เกิดสีเหลืองที่เกสรตัวผู้ และบางส่วนของกลีบดอก ต่อมาจึงทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยถ่ายยีน AS และยีน 4'CGT แบบ sense ร่วมกับการยับยั้งการทำงานของยีน *dfr* (*dihydroflavonol 4-reductase*) เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารสีในกลุ่ม anthocyanins ภายในดิ้น torenia ด้วยเทคนิค RNA interfere ทำให้ได้ดอก torenia สีเหลือง เนื่องจากปริมาณ anthocyanins ลดลง และเกิดการสะสมฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม aurones จำนวนมาก จึงทำให้ได้ลักษณะดอกที่มีสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ถั่วเหลือง

ต้นถั่วเหลืองพันธุ์สุโขทัย

2. ไพรมเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *CHR*

ไพรมเมอร์สำหรับสังเคราะห์บริเวณกลางยีนตั้งแต่ปลาย 5' จนถึงปลาย 3' (ตำแหน่งที่ 81-781) คือ

CHR1 (sense) 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3'

CHR2 (antisense) 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3'

ไพรมเมอร์ oligo T₍₁₅₎

3. เครื่องมือที่ใช้ในการโคลนยีน

Pipetman model P20, P200, P1000

Spectrafuge 16 M Microcentrifuge

Mini centrifuge

GelCam Camera (

UV Transilluminator

Cooling Bath Model AB-1600 Super Stat Mini

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

โปรแกรม Blast จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายดีเอ็นเอ หรือ โปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล

โปรแกรม 6 Frame Translation Tool จาก website <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html> สำหรับเปลี่ยนสายดีเอ็นเอเป็น โปรตีน

โปรแกรม Clustal W จาก website <http://ebi.ac.uk> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มโปรตีนที่กำลังศึกษา



วิธีการ

1. การออกแบบไพรเมอร์

การเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างในการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของโปรตีน chalone reductase พืชที่รายงานใน GenBank จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> และโปรแกรม CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment จาก website <http://ebi.ac.uk> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มโปรตีน chalone reductase

2. การแยกอาร์เอ็นเอรวมจากของถั่วเหลือง

นำต้นกล้าถั่วเหลืองอายุ 2 สัปดาห์ที่ได้รับแสง UV เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ transilluminator เป็นแหล่งกำเนิดแสง หลังจากต้นกล้าได้รับแสง UV เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จึงนำมาแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini Kit (บริษัท Eppendorf สหรัฐอเมริกา) เริ่มต้นจากบดต้นถั่วเหลือง 0.2 กรัม ในไนโตรเจนเหลวใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติม 350 ไมโครลิตรของ lysis buffer ที่นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ผุ่ดสารละลาย ส่วนบน ผสมกับ 70% เอทานอล 350 ไมโครลิตร และ 200 ไมโครลิตร ของสารละลาย binding matrix ผสมให้เข้ากัน ผุ่ดสารละลายใส่ใน spin column ที่ตั้งอยู่บนหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ หมุนเหวี่ยงนาน 30 วินาที ล้างตะกอนด้วย wash solution I นำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที ล้างอีกครั้งด้วย 95 % เอทานอล : wash solution II (อัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตร) หมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 30 วินาที หมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้คอลัมน์แห้ง เติมน้ำ (เกรดสำหรับงานวิจัยด้านชีวโมเลกุล) จำนวน 50 ไมโครลิตร ใน spin column ที่ตั้งอยู่บนหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โมง จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที

นำอาร์เอ็นเอรวมมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้จากต้นถั่วเหลือง

3. สังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

3.1 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายแรกโดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcriptase system (บริษัท Promega สหรัฐอเมริกา)

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) สายแรก นำอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลืองที่แยกได้โดยใช้ Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini จำนวน 1 ไมโครกรัม เติม cDNA synthesis เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

primer (oligo dT₁₈)₁ ไมโครกรัม ปรับปริมาณเป็น 5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที แช่น้ำแข็ง นาที เติมส่วนผสมของบัฟเฟอร์สำหรับการสังเคราะห์ cDNA สายแรก นิวคลีโอไทด์ ribonuclease inhibitor และ ImProm-II™ Reverse Transcriptase โดยมี ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับอาร์เอ็นเอต้นแบบ และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA สายแรก และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ reverse transcriptase โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

3.2 การเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ cDNA เจือจางในน้ำด้วยอัตราส่วน 1 : 10 แบ่ง 1 ไมโครลิตร ใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่ม ปริมาณยีน *CHR* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 ชนิด คือ

CHR1 (sense) 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3'

CHR2 (antisense) 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC-3'

เติมส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ นิวคลีโอไทด์ และ *AmpliTaq* DNA polymerase โดยให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1	ที่ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ
โปรแกรมที่ 2	ที่ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	
	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	

นำผล PCR มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% อะกาโรสเจล เปรียบเทียบขนาดของ ดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker

4 การตรวจสอบผล PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยการใส่ gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker ด้วย 1% อะกาโรสเจลใน 1X TAE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที ย้อมสีด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที สึกษาและสังเกตแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator ถ่ายรูปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 การทำให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ และหาลำดับเบส (direct sequencing from PCR product)

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาแยกด้วยนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็ก เกลือ และโปรตีนออกเพื่อทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR purification kit เติม 5 เท่าโดยปริมาตร ของบัฟเฟอร์ PB ต่อ 1 เท่า โดยปริมาตรของปริมาตร PCR ผสมให้เข้ากัน บรรจุลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบ ต่อนาที นาน 1 นาที ล้างด้วย 750 ไมโครลิตร ของบัฟเฟอร์ PE นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที หมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้คอลัมน์แห้ง จึงเติม TE 50 ไมโครลิตร และนำไปสู่ขั้นตอนการหาลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน

6 การวิเคราะห์และประเมินผล

นำข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *chalcone reductase* ของพืชต่างชนิดกันที่มีรายงานในต่างประเทศ

ผลและวิจารณ์

1. การออกแบบไพรเมอร์

ศึกษาการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของพืชที่รายงานใน GenBank จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ในพืช 5 ชนิด ดังนี้ *Glycine max* (accession: X55730), *Glycyrrhiza glabra* (accession: D86559), *Medicago sativa* (accession: X82366) *Pueraria montana* (accession: AF462632) และ *Hydrangea macrophylla* (accession: AY382665) และนำมาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างในการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของพืชทั้ง 5 ชนิด ด้วยโปรแกรม CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment จาก website <http://ebi.ac.uk> (ภาพที่ 5)

นำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *chalcone reductase* ประกอบด้วย

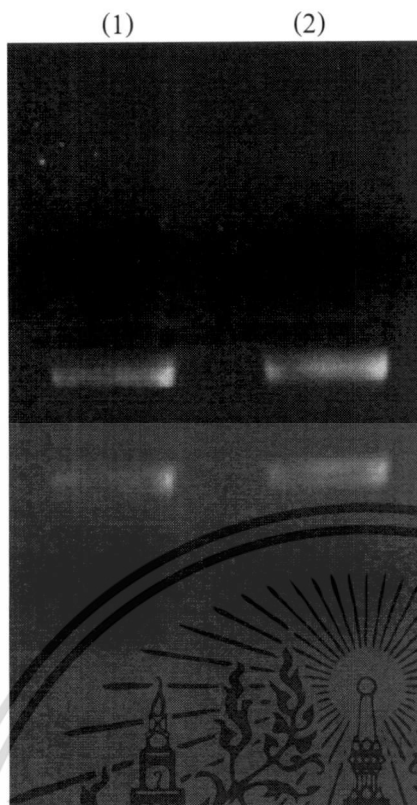
ไพรเมอร์ CHR1 (sense) มีการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน SAPDFTC เป็นตำแหน่งที่ 28-34 เมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *Glycine max* (accession: X55730) และมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3' เป็นตำแหน่งที่ 91-111 เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Glycine max* (accession: X55730)

ไพรเมอร์ CHR2 (antisense) มีการจัดเรียงลำดับกรดอะมิโน LYEQVVT เป็นตำแหน่งที่ 253-259 เมื่อเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ *Glycine max* (accession: X55730) และมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3' เป็นตำแหน่งที่ 768-791 เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Glycine max* (accession: X55730)

2. การแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Perfect RNA™, Eukaryotic, Mini Kit

นำต้นกล้าถั่วเหลืองอายุ 2 สัปดาห์ที่ได้รับแสง UV เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ transilluminator เป็นแหล่งกำเนิดแสง หลังจากต้นกล้าได้รับแสง UV เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จึงนำมาแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Perfect RNA™, Eukaryotic, Mini Kit ด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย guanidium thiocyanate และ 2β-mercaptoethanol นำไปตรวจบน agarose gel สามารถแยกอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลือง (ภาพที่ 6) ในการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากพืช และนำอาร์เอ็นเอรวมมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้จากต้นถั่วเหลือง ตรวจพบแถบของ ribosomal RNA (rRNA) 2 ขนาดคือ แถบของ 18s rRNA จาก ribosomal subunit ขนาดเล็ก (light subunit) และ แถบของ 28s rRNA จาก ribosomal subunit ขนาดใหญ่ (heavy subunit) ส่วนอาร์เอ็นเอชนิด mRNA จะเป็นแถบต่างๆ ที่มีหลายขนาดใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 6) เป็นอาร์เอ็นเอเป้าหมายที่นำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป ในสิ่งมีชีวิตที่จัดเป็น eukaryote รวมทั้งพืชด้วย ribosome สิ่งเป็นโครงสร้างสำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน โดยทั่วไป eukaryote มีไรโบโซมขนาด 80s ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 60s ribosomal subunit และ 40s ribosomal subunit โดยที่ 60s ribosomal subunit ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอขนาด 28s rRNA, 5.8s rRNA, 5s rRNA และโปรตีนประมาณ 45 ชนิด ส่วน 40s ribosomal subunit ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอขนาด 18s rRNA และโปรตีนประมาณ 21 ชนิด (ประดิษฐ์, 2543)

สิ่งสำคัญในการแยกอาร์เอ็นเอ คือการป้องกันการสลายตัวของอาร์เอ็นเอในระหว่างการสกัด วิธีการแยกอาร์เอ็นเอในพืชเริ่มต้นจาก การทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืชที่ประกอบด้วย cellulose pectin และ xyloglucans (Carpita and Gibeaut, 1993) การใช้วิธีกลเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ โดยการบดชิ้นส่วนพืชในไนโตรเจนเหลว ในสภาพอุณหภูมิต่ำ ribonuclease ไม่สามารถทำงานได้ ร่วมกับการเติมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ nuclease รักษาสภาพของอาร์เอ็นเอ ทำลายโครงสร้างของโปรตีน เซลล์เมมเบรน เพื่อให้เซลล์แตกออก และปลดปล่อยอาร์เอ็นเอออกสู่ภายนอกเซลล์ การทำลายเซลล์เมมเบรนมีผลต่อปริมาณอาร์เอ็นเอที่แยกได้ (Wilkins and Smart, 1996) สาร guanidium thiocyanate มีผลทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ และยับยั้งกิจกรรมของ ribonuclease (Jones *et. al*, 1994) ส่วน 2β-mercaptoethanol เป็น reducing agent ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของ ribonuclease และป้องกันการ oxidized สารในกลุ่มฟีนอลิก กำจัดอนุมูลอิสระที่เข้าไปจับสารฟีนอลิก และจับเข้ากับกรดนิวคลีอิก เนื่องจากการจับกันระหว่างฟีนอลิกกับกรดนิวคลีอิกในสภาพ oxidized ทำให้คุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไป (Wilkins and Smart, 1996)



ภาพที่ 6 การแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Perfect RNA™, Eukaryotic, Mini Kit

- (1) ต้นกล้าถั่วเหลืองต้นควบคุม
- (2) ต้นกล้าถั่วเหลืองที่ได้รับแสง UV

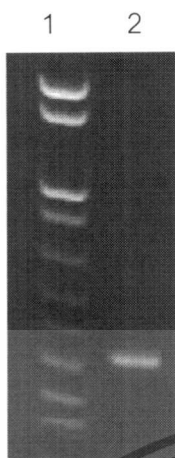
ก่อนการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลือง ได้นำพืชตัวอย่างไปปรับแสง UV เพื่อชักนำการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* เป็นการเพิ่มโอกาสในการประสบความสำเร็จในการแยกยีน *chalcone reductase* มากกว่าการแยกยีนจากต้นถั่วเหลืองปกติ ยีน *chalcone reductase* เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สาร isoflavonoids พบใน alfalfa และพืชวงศ์ถั่วบางชนิด การสร้างสาร isoflavonoids ขึ้นอยู่กับระยะในการพัฒนาของต้นพืช และมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อพืช หรือเมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด เช่น การได้รับแสง ultraviolet การขาดธาตุอาหารไนโตรเจน รวมทั้งการอยู่เข้าทำลายของเชื้อ (Dixon and Paiva, 1995) ในการทดลองของ Sallaud *et al.*, (1995) เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* ใน alfalfa ในวัยระต่าง ๆ และการพัฒนาในระยะของการเติบโตที่แตกต่าง ด้วยการตรวจสอบเทคนิค Northern Blot Hybridization และใช้ยีน *chalcone reductase* จาก alfalfa เป็นตัวตรวจสอบ และยังคงศึกษาการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* เมื่อได้รับแสง UV การทำให้เกิดบาดแผล และการเข้าทำลายของเชื้อโรค ผลปรากฏว่า พบการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* ที่ราก และ hypocotyls แต่ไม่พบในใบเลี้ยงของต้นกล้าที่มีอายุ 5 วัน นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนในส่วนของลำต้น ก้านใบ และราก แต่ไม่พบในดอกตั้งแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะดอกตูมจนกระทั่งดอกบานเต็มที่ในต้น alfalfa อายุ 8 สัปดาห์ การแสดงออกของยีน *chalcone reductase* ในต้นกล้าที่มีอายุ 5 วัน และต้นที่เติบโตเต็มที่แล้วพบที่บริเวณรากมากที่สุด เมื่อนำต้นกล้าไปรับแสง UV เป็นเวลา 45 นาที ภายหลังจากได้รับแสง UV ไปแล้ว 6 ชั่วโมง พบการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* ในส่วนต่างๆพืชได้แก่ ราก hypocotyls ใบเลี้ยง เพิ่มขึ้นมากกว่าพืชปกติ ส่วนของรากยังเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* มากที่สุดแต่ไม่พบการแสดงออกในใบแท้ เมื่อนำใบจากต้น alfalfa ที่มีอายุ 6 สัปดาห์ มาชักให้เกิดบาดแผลโดยการขัดด้วยกระดาษทราย พบการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* เพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 3-9 ชั่วโมงภายหลังการทำให้เกิดบาดแผล เมื่อชักนำการเข้าทำลายเชื้อโรค *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfa* ที่บริเวณใบ พบการแสดงออกของยีน *chalcone reductase* เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาดังแต่ 6 ชั่วโมงภายหลังการเข้าทำลายของเชื้อ *X. campestris* pv. *alfalfa*

3. การเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* ในถั่วเหลืองด้วยเทคนิค PCR

การแยกอาร์เอ็นเอรวมจากต้นถั่วเหลือง โดยวิธี Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini และนำอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้มาสังเคราะห์ cDNA โดยไพรเมอร์ oligo dT(15) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase นำ cDNA เป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะกับยีน *chalcone reductase* 2 ชนิด จากการวิเคราะห์ด้วย multiple alignment ในโปรตีน *chalcone reductase* ของพืช 5 ชนิด ที่รายงานใน GenBank เพื่อหาคำแหน่งอนุรักษ์ คือ SAPDFTC และ LYEQGVT ถูกใช้เป็นตำแหน่งไพรเมอร์ คือ sense primer CHR 5'-ATC TGC CCC TGA CTT CAC ATG-3' เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 91-111 และ antisense primer CHR 5'-ATG TCA CAC CTT GTT CGT ACA ACC -3' เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 768-791 ของยีน *chalcone reductase* ในถั่วเหลือง (*Glycine max*, accession: X55730) ด้วยเอนไซม์ *AmpliTag* DNA polymerase พบว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอของถั่วเหลืองโดยวิธี RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ CHR1/CHR2 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนมีขนาดประมาณ 0.7 กิโลเบส (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ของยีน CHR จากอาร์เอ็นเอของถั่วเหลืองโดยวิธี RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ CHR1/CHR2

(1) DNA ladder marker

(2) ผลผลิต PCR ด้วยไพรเมอร์ CHR1 (sense) และ CHR2 (antisense)

5. การศึกษาการเรียงลำดับเบสของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ CHR

ผลิตภัณฑ์จาก PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ผลปรากฏว่าสามารถวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *chalcone reductase* จากถั่วเหลือง (ภาพที่ 8) การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของจำนวน 701 คู่เบส แปลเป็นรหัสกรดอะมิโน 233 เรซิดิว ในเฟรม +2 และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยการ alignment ด้วยโปรแกรม Blast จาก website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/> เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างโปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูลของ GenBank กับพืชดังต่อไปนี้ *Pueraria montana* var. *lobata* (accession: AF462632) *Medicago sativa* (accession: X82366) *Hydrangea macrophylla* (accession: AY382665) *Glycyrrhiza glabra* accession: D86559 ในการเปรียบเทียบโปรตีน chalcone reductase จากถั่วเหลืองมีส่วนอนุรักษ์ 6 ส่วน (ภาพที่ 9) ดังนี้

ส่วนที่ 1 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 23-31 การเรียงกรดอะมิโน GYRHFDTAA

ส่วนที่ 2 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 34-39 การเรียงกรดอะมิโน SEQALG

ส่วนที่ 3 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 56-63 การเรียงกรดอะมิโน LfvTskLw

ส่วนที่ 4 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 84-102 การเรียงกรดอะมิโน LEYLDLYLIHWPLSSQPG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนที่ 5 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 130-143 การเรียงกรดอะมิโน KLGLTKAIGVSNFS

ส่วนที่ 6 อยู่บริเวณเรซิดิวที่ 160-164 การเรียงกรดอะมิโน VNQVE

ตำแหน่งอนุรักษ์ของ โปรตีน chalcone reductase มีจำนวน 6 กลุ่ม มีตำแหน่งอนุรักษ์ที่ยาว
ต่อเนื่องกันยาวมากที่สุดถึง 18 เรซิดิว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DNA: ATCTGCCCTGACTTCACATGTAAGAAAGACACAAAAGAGGCAATCATTGA
 +3: L P L T S H V R K T Q K R Q S L R
 +2: S A P D F T C K K D T K E A I I E
 +1: I C P * L H M * E R H K R G N H *

DNA: GGCCATGAAACAGGGTTATAGGCACTTTGACACTGCTGCTGCATATGGCTC
 +3: P * N R V I G T L T L L L H M A R
 +2: A M K Q G Y R H F D T A A A Y G S
 +1: G H E T G L * A L * H C C C I W L

DNA: GGAGCAGGCTCTGGAGAAGCTTTGAAGGAGGCACTTGACCTTGGCCTTGT
 +3: S R L L E K L * R R H L T L A L S
 +2: E Q A L G E A L K E A L D L G L V
 +1: G A G S W R S F E G G T * P W P C

DNA: CACCCGTGATGACCTCTTCGTCACCTCCAAGCTTTGGGTCACCTGACAATCA
 +3: P V M T S S S L P S F G S L T I I
 +2: T R D D L F V T S K L W V T D N H
 +1: H P * * P L R H F Q A L G H * Q S

DNA: TCCTCATCTTGTGTTCTCGTCTCCGCAATCTCTCAAACCTTCAACT
 +3: L I L L F L L S A N L S K L F N *
 +2: P H L V V P A L R K S L K T L Q L
 +1: S S S C C S C S P Q I S Q N S S T

DNA: AGACTACTGGACTTGTATCTCATCCACTGGCCCTCAGTTCTCAGCCGG
 +3: S T W T C I S S T G P S V L S P E
 +2: E Y L D L Y L I H W P L S S Q P G
 +1: R V L G L V S H P L A P Q F S A R

DNA: AAAGTTTTCATCCCAATGAGGTGGAGGATCTCTGCCATTCGATGTGAA
 +3: S F H S Q L R W R I S C H S M * R
 +2: K F S F P I E V E D L L P F D V K
 +1: K V F I P N * G G G S L A I R C E

DNA: GGGTGTGGGAAGCCATGGAAGAGAGCCAGAACTTGGCCTCAGAAAGC
 +3: V C G K P W K R A R N L A S Q K P
 +2: G V W E A M E E S Q K L G L T K A
 +1: G C V G S H G R E P E T W P H K S

DNA: CATTGGAGTCAGCAACTTCTCTGTCAAGAAGCTTCAAATCTGCTCTCTGT
 +3: L E S A T S L S R S F K I C S L L
 +2: I G V S N F S V K K L Q N L L S V
 +1: H W S Q Q L L C Q E A S K S A L C

DNA: TGCCACCATCCGCTCTGCGGTCATCAAGTGGAGATGACCTTGCATGGCA
 +3: P P S V L R S I K W R * T L H G N
 +2: A T I R P A V N Q V E M N L A W Q
 +1: C H H P S C G Q S S G D E P C M A

DNA: ACAGAAGAAGCTAAGAGAGTTCTGCAAGCAATGGGATAATCCTAACTGC
 +3: R R S * E S S A K Q M G * S * L H
 +2: Q K K L R * E F C K A N G I I L T A
 +1: T E E A K R V L Q S K W D N P N C

DNA: ATTCTCTCTGAGGAAAGGTGCAAGCAGGGGACCAATGAAGTTATGGA
 +3: S L L * G K V Q A G D Q M K L W R
 +2: F S P L R K G A S R G P N E V M E
 +1: I L S S E E R C K Q G T K * S Y G

DNA: GAATGATGTGCTGAAAGAGATTGCAGATGCTCATGAAAATCCATAGCACA
 +3: M M C * K R L Q M L M E N P * H R
 +2: N D V L K E I A D A H G K S I A Q
 +1: E * C A E R D C R C S W K I H S T

DNA: GGTTCCTCTGAGATGGTTGTACGAACAAGGTGTGACAT
 +3: F L * D G C T N K V * H
 +2: V S L R W L Y E Q G V T
 +1: G F S E M V V R T R C D

>/tmp/outseq.input.18720 [Unknown form], frame+2, 233 bases.
 SAPDFCKKDTKEAIEAMKQGYRHFDTAAYGSEQALGEALKEALDLGL
 VTRDDL FVTSKLVWTDNHPHLVVPALRKS LKTLQLEYLDLYLIHWPLSSQ
 PGKFSFPIEVEDLLPFDVKGWEAMEESQKLG LTKAIGVSNFVSKLQNL
 LSVATIRPAVNQVEMNLAWQQKLR EFC KANGI ILTAFSPLRRGASRGNP
 EVMENDVLKEIADAHGKSI AQVSLRWLYEQGVT

ภาพที่ 8 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHR* จำนวน 701 คู่เบสที่แยกได้จากไบถั่วเหลือง

แปลเป็นรหัสกรดอะมิโน 233 เรซิดิว (แถว+2 และขีดเส้นใต้)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

SOYBEAN                -----SAPDFTCKKDT-KEAIEAMKQGYRHFDTAAAYG 33
AF462632Pueraria      MAAEIPTIVFPNSFAQHRVPVVMGMSAPDFTCKKDT-KEAIEAVKQGYRHFDTAAAYG 59
X82366Medicago       MGSVEIPTKVLNTSSQLKMPVVMGMSAPDFTCKKDT-KDAIEAIKQGYRHFDTAAAYG 59
AY382665Hydrangea    -MAFTIPEVPLS--SGGRKMPVLGLGTAADPPVDPEVTRKAVTEALKLGYRHFDTAAALYN 57
D86559Glycyrrhiza    -MAFTIPEVPLS--SGGRKMPVLGLGTAADPPVDPEVTRKAVTEALKLGYRHFDTAAALYN 57
                        :* . . . :* :*: ** * ***** *

SOYBEAN                SEQALGEALKEALDGLVLT-RDDLFTVTSKLVWTDNHPHLVVPALRKSCLKLQLEYLDLYL 92
AF462632Pueraria      SEQALGEALKEAVDLGLVLS-RQDLFVTSKLVWTDNHPHLVVSALRKSCLKLQLEYLDLYL 118
X82366Medicago       SEQALGEALKEAIELGLVT-RDELFTVTSKLVWTDNHPHLVI PALQKSLKTLQLDYLDLYL 118
AY382665Hydrangea    SEQPLGDAIAEALGEGLIKSRDELFTITSLKWCSDAHRENVEPALQKTLKLNKLEYIDMYL 117
D86559Glycyrrhiza    SEQPLGDATAEALGEGLIKSRDELFTITSLKWCSDAHRENVEPALQKTLKLNKLEYIDMYL 117
                        ***.***: ** :* . . . :* :*: ** * ***** *

SOYBEAN                IHWPLSSQPGKFSFPIEVEDLLPFQVGVWEAMEESQKLGTLKAIQVSNFVSKLQNLNLS 152
AF462632Pueraria      IHWPLSSQPGKFSFPIEVEDLLPFQVGVWEAMQECQKLGTLKAIQVSNFVSKLQNLNLS 178
X82366Medicago       IHWPLSSQPGKFTFPIDVADLLPFQVGVWESMEESLKLGLTKAIQVSNFVSKLQNLNLS 178
AY382665Hydrangea    IHWPLSSQPGKFTFPIDVADLLPFQVGVWESMEESLKLGLTKAIQVSNFVSKLQNLNLS 177
D86559Glycyrrhiza    IHWPLSSQPGKFTFPIDVADLLPFQVGVWESMEESLKLGLTKAIQVSNFVSKLQNLNLS 177
                        ****.***: ** :* . . . :* :*: ** * ***** *

SOYBEAN                VATIRPAVNQVEMNLAWQQKLFREFCCKANGIILTAFSPL-RKGASRGPNEVMENDVLKEI 211
AF462632Pueraria      VATIRPVVNQVEMNLAWQQKLFREFCCKANGIILTAFSPL-RKGASRGPNEVMENDVLKEI 237
X82366Medicago       VATVLPVAVNQVEMNLAWQQKLFREFCCKANGIILTAFSPL-RKGASRGPNEVMENDVLKEI 237
AY382665Hydrangea    NAKVPPAVNQVEMNPNPCWQKQLTEFCKSNGLLVVAYALGAVGTFYGTNRVMGSEVLNEI 237
D86559Glycyrrhiza    NAKVPPAVNQVEMNPNPCWQKQLTEFCKSNGLLVVAYALGAVGTFYGTNRVMGSEVLNEI 237
                        * . . . ***** *

SOYBEAN                ADAHGKSIAQVSLRWLYEQGVT----- 233
AF462632Pueraria      ADAHGKSIAQVSLRWLYEQGVTFVPKSYDKERMNQLQIFDWTQEDHHKISQISQSRL 297
X82366Medicago       ADAHGKSVAQISLRWLYEQGVTFVPKSYDKERMNQLRIFDWSLTKEDEHKIDQIKQNR 297
AY382665Hydrangea    ARIRGNTVAQVCLRWAYEQGIGLVKSFNKERMEQNLI FNWTLSDDESCKKISEI PQGRA 297
D86559Glycyrrhiza    ARIRGNTVAQVCLRWAYEQGIGLVKSFNKERMEQNLI FNWTLSDDESCKKISEI PQGRA 297
                        * :* . . . :* :*: ** * ***** *

SOYBEAN                -----DLWDEI 314
AF462632Pueraria      ISGPTKPOLS-----DLWDEI 314
X82366Medicago       IPGPTKPGLN-----DLYDD-- 312
AY382665Hydrangea    CLGTDYTSVHGPFKTI EELWDGEF 321
D86559Glycyrrhiza    CLGTDYTSVHGPFKTI EELWDGEF 321
    
```

ภาพที่ 9 การวิเคราะห์ multiple alignment ระหว่างโปรตีนของยีน *CHR* จากใบถั่วเหลือง กับโปรตีน *CHR* ในพืชชนิดอื่น

สรุป

ผลการแยกอาร์เอ็นเอจากต้นถั่วเหลือง ตามวิธี Perfect RNA TM, Eukaryotic, Mini ได้ผลดี ทั้งด้านปริมาณ และคุณภาพของอาร์เอ็นเอ ในการโคลนยีนจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอด้วย การเพิ่มปริมาณยีน *chalcone reductase* จากถั่วเหลืองเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สาร isoflavonoids พบใน alfalfa และพืชวงศ์ถั่วบางชนิด การสร้างสาร isoflavonoids ขึ้นอยู่กับระยะในการพัฒนาของต้นพืช และมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อพืช พบว่ายีน *chalcone reductase* ที่ถูกสังเคราะห์มีขนาด 701 คู่เบส เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RT-PCR



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กองเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2540. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ. เอกสารเผยแพร่ ฝ่ายวิเคราะห์ข้อมูลการส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ. 2554. ยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก พ.ศ. 2554-2559.
- ครรชิต ธรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- จิตรพรพรรณ พิลึก. 2542. การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมชาย สุคนธสิงห์, เสรี วิริยะวัฒนะ, โอปาร พิทักษ์ และ ชัยณรงค์ ชูจันทร์. 2534. คู่มือการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Akashi, T., N. Saito, H. Hirota and S. Ayabe. 1997. Anthocyanin-producing dandelion callus as a chalcone synthase source in recombinant polyketide reductase assay. *Phytochemistry* 46 : 283-287.
- Bartley, G.E. and P.A. Scolnik. 1995. Plant carotenoid: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7 : 1027-1038.
- Bohm, B.A. 1993. The minor flavonoids and flower colour. *In* J.B. Harborne (ed.). pp. 387-440. *The Flavonoids : Advanced in Research Science*. Chap&Hall, London.
- Carpita, N.C. and D.M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3 : 1-30.
- Cunningham, E.X. and P.A. and E. Gantt. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 : 557-583.
- DellaPenna, D. 2001. Plant metabolic engineering. *Plant Physiol.* 125 : 160-163.
- Dixon, R. A. and N.L. Paiva. 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7 : 1085-1097.
- Doroles, S.C., K.M. Davies, G.B. Spiller and S.J. Bloor. 2000. Modification of chalcone biosynthesis in *Petunia hybrida*. *Acta Hort.* 508 : 29-37.
- Forkmann, G. 1991. Flavonoids as flower pigments : The formation of natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed.* 16 : 1-26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Goormachtig, S., S. Livens, S. Herman, M. Van Montagu and M. Holsters. 1999. Chalcone reductase – homologous transcripts accumulate during development of stem – borne nodules on the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Planta* 209 (1) : 45-52.
- Heller, W. and G. Forkmann. 1988. Biosynthesis of flavonoids. In J.B. Harborne (ed.) , *The Flavonoids : Advanced in Research Science*. Chap&Hall, London pp. 399-425.
- Jones, P., J. Qiu and D. Rickwood. 1994. *RNA Isolation and Analysis*. Bios Scientific, England. 445 p.
- Karvouni, S., I. John, J.E. Taylor, C.F. Watson, A. J. Turner and D. Grierson. 1995. Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Mol. Biol.* 27(6) : 1153-1163.
- Madhuri, G. and A.R. Reddy. 1999. Plant biotechnology of flavonoids. *Plant Biotech.* 16 (3) : 179-199.
- Miles, C.O., and L. Main. 1989. Kinetics and mechanism of the cyclisation of 2,6 – dihydroxychalcone and derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trns. II* 1623-1632.
- Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukai, K. Yonekura-Sakkibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *PNAS* 103 (29) : 11075-11080.
- Sallaud, C., J. El-Turk, L. Bigarre, H. Sevin, R. Welle and R. Esnault. 1995. Nucleotide sequence of three *chalcone reductase* gene from alfalfa. *Plant Physiol.* 108 : 869-870.
- Tanaka, Y., S. Tsuda and T. Kusumi. 1998. Metabolic engineering to modified flower color. *Plant Cell Physiol.* 39 (11) : 1119-1126.
- To, K.Y. and C.K. Wang. 2006. Molecular breeding of flower color. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 1 : 300-310.
- Van Blokland, R., P. de Lange, J.N.M. Mol and J.M. Kooter. 1993. Modulation of gene expression in plants by antisense genes. In S.T. Crooke and B. Lebleu (eds.). pp.125-148. *Antisense Research and Applications*. CRC Press, London
- Wilkins, T.A. and L.B. Smart. 1996. Isolation of RNA from plant tissue, pp. 21-41. In P.A. Krieg (ed.). *A Laboratory Guide to RNA : Isolation, Analysis, and Synthesis*. Wiley-Liss, New York.
- Yu, O., M. Matsuno and S. Subramanian. 2006. Flavonoid compounds in flowers: Genetics and Biochemistry. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* 1 : 285-292.

Yu, O., W. Jung, J. Shi, R.A. Croes, G.M. Fader, B. McGonigle and J.T. Odell. 2000. Production of the isoflavones genistein and Daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124 : 781-793.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้