สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน จาก cDNA ของอะราบิดอปซิส

T058538

นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ
นางสาวณัฐกานต์ สุโกมล

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58538
วัน,เดือน,ปี 25 ส.ค. 2549
.b.....
.i.....
เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A Study of The Regulatory Gene Cloning Involved in Anthocyanin Biosynthesis from *Arabidopsis* cDNA

Miss Chompoonuth Porncharoennop

Miss Nattakan Sukomon

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาการโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินจาก cDNA ของอะราบิดอปซิส

นักศึกษา นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ

นางสาวณัฐกานต์ สุโกมล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กนกพร สมพรไพลิน

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ดร.กนกพร สมพรไพลิน	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาการโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน จาก cDNA ของอะราบิดอปซิส

นักศึกษา นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ
นางสาวณัฐกานต์ สุโกมล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2546

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กนกพร สมพรไพลิน

บทคัดย่อ

การโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินจาก cDNA ของอะราบิดอบ-ซิสด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และใช้ไพร์เมอร์ร่วมสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน ORF (open reading frame) ของยีน *PAP1* และ *PAP2* ชิ้นส่วนที่ได้จากการทำพีซีอาร์นำมาเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์สำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ หลังจากตรวจสอบโคลน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนโคลนของยีนทั้ง 2 ชนิด และได้นำโคลน *PAP2* ไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์สำหรับแสดงออกใน *Agrobacterium* แต่ไม่สามารถพิสูจน์ทิศทางการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอได้ ได้นำ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 ที่ได้รับการถ่ายโอนเวคเตอร์ pBI121 มาใช้ในการศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ใบยาสูบ เมื่อทำการถ่ายโอนแล้วนำชิ้นส่วนพืชเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดยอดที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลิน และ คานามัยซินเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบต้นที่ต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซินจำนวน 1 ต้น จากเนื้อเยื่อใบยาสูบที่นำมาถ่ายโอนยีนทั้งหมด 36 ชิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A Study of The Gene Cloning Involved in Anthocyanin Biosynthesis from *Arabidopsis* cDNA
Name	Miss Chompoonuth Porncharoennop
	Miss Nattakan Sukomon
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2003
Special Project Advisor	Dr. Kanokporn Sompornpailin

Abstract

The cloning of regulatory genes involved in anthocyanin biosynthesis was carried using PCR technique with the primers for amplifying the open reading frame of both *PAP1* and *PAP2*. The DNA fragments from PCR were ligated into DNA amplifying vector. After the clone detection, both kinds of the gene clones were achieved. *PAP2* clone was ligated into *Agrobacterium* expression vector, however, the orientation of the insert was unclear. *Agrobacterium* LBA4404 transformed with pBI121 was in a study of the gene transformation into tobacco leaves. Two weeks after incubation in shoot inducing medium with carbenicillin and kanamycin, one of kanamycin resistant plantlets was observed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ ดร.กนกพร สมพรไพลิน ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี และอาจารย์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาแนะนำตลอดการดำเนินงาน และช่วยตรวจแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน นอกจากนี้ยังมีบิดา มารดา และผู้มีพระคุณที่กรุณาอบรมสั่งสอนและอุปการะผู้จัดทำให้ศึกษาจนสำเร็จได้ด้วยดี

นางสาวชมพูนุท พรเจริญนพ
นางสาวณัฐกานต์ สุโกมล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 สารฟลาโวนอยด์	4
2.2 ยีนควบคุมและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน	11
2.3 การโคลนยีน	15
2.4 เทคนิคที่ใช้ในการโคลนยีน	22
2.5 วิธีการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์	26
3.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector	28
3.3 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม	29
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 การโคลนยีนโดยใช้พีซีอาร์	30
4.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector	37
4.3 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	47
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลอง	49
ภาคผนวก ค เวคเตอร์	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ	5
2	แนวทางของวิถีชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน	8
3	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในบริเวณ R2 และ R3 โปรตีนกลุ่ม myb บางตัว	13
4	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมน bHLH ของ TT8 กับโปรตีนอื่นๆ ที่มีโดเมนเดียวกัน	14
5	การทำพีซีอาร์	23
6	ผลการทำพีซีอาร์ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส	30
7	โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสกับเวคเตอร์ yT&A บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, IPTG และ X-gal	31
8	ผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ	32
9	ผลการตัดพลาสมิด yT&A ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสแทรกอยู่	33
10	ผลการตัดพลาสมิด yT&A ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ด้วย *Bam*HI และ *Eco*T14I เพื่อตรวจสอบชนิดของชิ้นดีเอ็นเอ	34
11	ผลการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าน่าจะเป็น *PAP2* ออกจากพลาสมิด yT&A	36
12	โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็น *PAP2* กับเวคเตอร์ pHTT202 บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน	37
13	ผลการสกัดพลาสมิด pHTT202 จากโคลนที่สามารถเจริญบนเพลตที่มีอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน	38
14	ผลการตัดพลาสมิด pHTT202 ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่		หน้า
15	ผลการตัดพลาสมิด pHTT202 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็น *PAP2* ด้วย *Hin*dIII และ *Pst*I เพื่อคัดเลือกพลาสมิด ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง	39
16	ต้นยาสูบที่ได้จากการศึกษาการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมที่มี pBI121	41

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นสารสีอยู่ในกลุ่มของเฟลโวนอยด์ (flavonoid) พบได้ในพืชชั้นสูงหลายชนิด แอนโทไซยานินมีบทบาทในกระบวนการต่างๆ เช่น การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) การส่งสัญญาณในการจับกันของพืชและจุลินทรีย์ การป้องกันตัวเองของพืชและการตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ นอกจากนี้ยังมีบทบาทในด้านการล่อแมลงโดยเฉพาะเมื่อเป็นสารสีในกลีบดอก เป็นอาหารเสริมสุขภาพของคนและสัตว์ และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Caboche; et. al. 2000) การสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินประกอบด้วยหลายขั้นตอนซึ่งต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด ยีนที่เกี่ยวข้องในชีวสังเคราะห์นี้แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ยีนโครงสร้าง (structural genes) ที่ถอดและแปลรหัสแล้ว จะให้เอนไซม์ที่ใช้ในชีวสังเคราะห์ และยีนควบคุม (regulatory genes) นั้นจะให้โปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง (กนกพร, 2002) ปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการจำแนกยีนโครงสร้างและยีนควบคุมในชีว-สังเคราะห์นี้จากพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด พิทูเนีย และสแนปดรากอน (snapdragon) พบว่ายีนที่มีหน้าที่อย่างเดียวกัน จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ร่วมกัน (Cornish and Holton, 1995)

มีการศึกษาชีวสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินในอะราบิดอบซิส (*Arabidopsis thaliana*) ซึ่งเป็นพืชต้นแบบ ที่ใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์พืช แอนโทไซยานินสะสมในเปลือกหุ้มเมล็ด ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (hypocotyls) ของต้นอ่อน ลำต้นและใบของอะราบิดอบซิส (Winkel-Shirley, 2001) สำหรับยีนควบคุมจะมีการจัดจำแนกตามลักษณะของบริเวณอนุรักษ์ เช่น bHLH , Myb และ WD40repeat (Blount; et. al. 2000 ; Blundell; et. al. 1999 ; Caboche; et. al. 2000)

ในการทดลองครั้งนี้ ทำการศึกษาการโคลนยีนควบคุมชีวสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินจาก cDNA ของอะราบิดอบซิสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งจะนำไปใช้ในการศึกษาถึงแนวทางในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมและเข้าสู่พืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาการโคลนยีนควบคุมชีวสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินจากcDNA ของอะราบิดอบ-ซิสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การโคลนยีนควบคุมชีวสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินจาก cDNA ของอะราบิดอบซิสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 การโคลนยีนโดยใช้พีซีอาร์

1.4.1.1. ทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนควบคุม โดยใช้ไพรเมอร์ ที่เหมาะสมและทดสอบการทำพีซีอาร์

1.4.1.2. นำชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าน่าจะมียีนที่ต้องการเชื่อม (ligation) เข้ากับเวคเตอร์ และถ่ายโอน(transformation) เข้าสู่ *Escherichia coli.* เพื่อเพิ่มปริมาณ พลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอ

1.4.1.3. คัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่คาดว่าน่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่

1.4.1.4. สกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้และแยกชิ้นดีเอ็นเอออกโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

1.4.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

1.4.2.1. เชื่อม (ligation) ชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector

1.4.2.2. ถ่ายโอน *Agrobacterium* expression vector เข้าสู่ *E. coli* เพื่อคัดลอกและเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่

1.4.2.3. คัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง (sense)

1.4.3 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องชีวสังคราะห์สารแอนโทไซยานินจาก cDNA ของอะราบิดอบซิสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 **สารฟลาโวนอยด์** (Cornish and Holton, 1995; Winkle-Sharley, 2001; อ้อมบุญ, ม.ป.ป.)

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นกลุ่มของสารที่ทำให้เกิดสีสันต่างๆ ของพืชในธรรมชาติ แบ่งออกตามโครงสร้างได้มากกว่า 10 กลุ่ม และในแต่ละกลุ่มยังแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ ได้อีก จากการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ.1962 ทำให้ทราบถึงบทบาทของฟลาโวนอยด์ในแง่ต่างๆ ของพืช และสิ่งแวดล้อมอันรวมถึงมนุษย์และสัตว์ ที่เห็นได้ชัด เช่น การล่อแมลงและนกให้มาช่วยแพร่พันธุ์พืชด้วยการผสมเกสร ฟลาโวนอยด์ยังช่วยป้องกันพืชจากการรุกรานของราและแบคทีเรียอีกด้วย ฟลาโวนอยด์ยังเป็นสารที่มีคุณค่าทางอาหาร

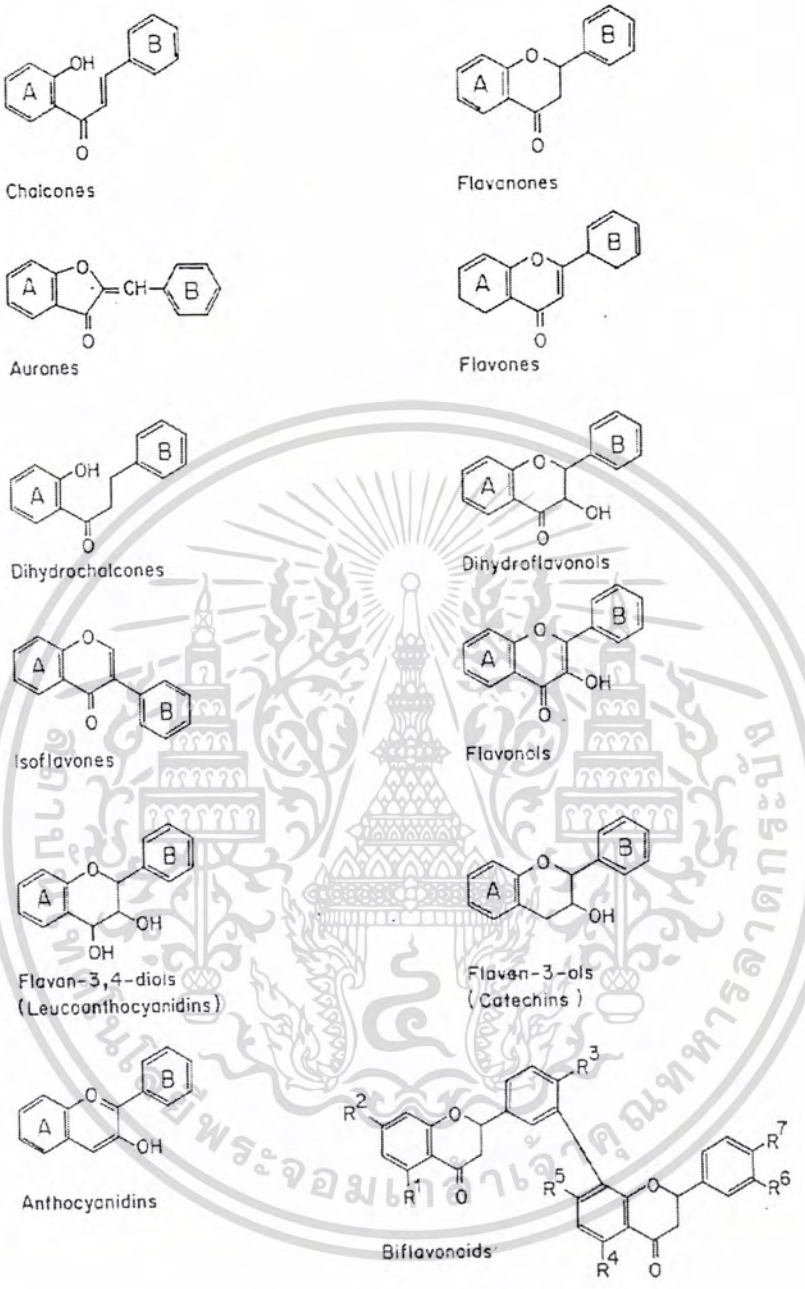
ฟลาโวนอยด์ที่สำคัญทางเภสัชกรรมและการแพทย์แผนปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น รูทิน (rutin) ช่วยเพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดฝอย และสารสกัดจากใบแป๊ะก้วย ซึ่งเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปสมอง และช่วยทำลายอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดความเสื่อมของเนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์

ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่มีคาร์บอน 15 ตัว จัดเรียงตัวในระบบ 3 วง คือ วง A B และ C โดยมี A และ B เป็น วงฟีนิล (phenyl ring) และ C เป็น วงแลคโตน (lactone ring) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ วง C ทำให้แยกฟลาโวนอยด์ออกเป็นชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 1 และ การเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) ที่ วง A และ B ตามตำแหน่งต่างๆ ทำให้เกิดอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้นๆมากมาย

2.1.1 แชลโคน (Chalcone) และออโรน (Aurone)

สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่ วง C ผิดไปจากกลุ่มอื่นๆ เมื่อถูกไอแอมโมเนียเปลี่ยนจากเหลืองเป็นแดงจึงเรียกสารกลุ่มนี้ว่า แอนโทชลอร์ (antochlor) แชลโคนให้สีเหลืองเข้ม ได้แก่ สีของดอกไม้ในวงศ์ Compositae, Oxalidaceae, Scrophulariaceae, Liliaceae และ Acanthaceae เป็นต้น ส่วนออโรนพบได้ในดอก ใบ เปลือก และเนื้อไม้ให้สีเหลืองทอง เช่น Sulfuretin ในดอกรักเร่ (*Dahlia* spp.) และ hispidol glucoside ในถั่วเหลือง *(Glycine* spp.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์กลุ่มต่างๆ

ที่มา : อ้อมบุญ, ม.ป.ป.

2.1.2 ฟลาวาโนน (Flavanone) และ ไดไฮโดรฟลาโวนอล (Dihydroflavonol)

สารเหล่านี้ให้สีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี พบได้ทั้งในพืชใบเลี่ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ ตัวอย่าง กลัยโคไซด์ เช่น เฮสเพอริดิน (hesperidin) และ นารินจิน (naringin) จากเปลือกส้ม (aglycone : hesperetin และ naringenin) มีรสขม ใช้ในอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันรู้จักเฮสเพอริดินในชื่อว่า ซิตรัสไบโอฟลาโวนอยด์ (Citrus bioflavonoid) ซึ่งมีในเปลือกส้มที่ยังไม่สุก ใช้เสริมความแข็งแรงของหลอดเลือดฝอย ฟลาโวนอยด์ทั้งสองกลุ่มมีความคงทนต่อกรดเกลือ แต่จะสลายตัวให้แซลโคนเมื่ออุ่นกับด่าง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราได้ จึงใช้ในการเก็บรักษาไม้

2.1.3 ฟลาโวนอล (Flavonol)

ฟลาโวนอลเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน (lignification) ในใบและเนื้อไม้ และมักพบในดอกไม้โดยเป็นสารเม็ดสีชนิดหนึ่ง ซึ่งจะช่วยล่อแมลงเพื่อให้เกิดการผสมเกสร จึงมีความสำคัญต่อพืชยืนต้น ส่วนในพืชล้มลุกนั้น จะพบฟลาโวนอลในปริมาณต่ำ และหาได้ยากในพืชชั้นต่ำ สำหรับในจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในแบคทีเรียและสาหร่าย ไม่ปรากฏว่ามีฟลาโวนอลเลย แต่ในรา *Aspergilus candidas* มีคลอร์ฟลาโวนิน (chlorflavonin) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น ฟลาโวนอลกลัยโคไซด์ที่ใช้ในเภสัชกรรม คือ รูทินจากใบอีหรุด (*Ruta graveoleus*) มีคุณสมบัติเสริมความแข็งแรงของหลอดเลือดฝอย

2.1.4 ฟลาโวน (Flavone)

มักพบในเปลือกไม้ แก่นไม้ ผล และราก ให้สีเหลืองอ่อนถึงแก่ ตัวอย่างของ ฟลาโวนที่รู้จักกันดีคือ โมริน (Morin หรือ 5,7,2,4-tetrahydroxy flavonol) จากเปลือกของขนุน (*Artocarpus* spp.)

2.1.5 ไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoid)

มีโครงสร้างต่างจากฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นคือ ตรงส่วนของคาร์บอนที่เชื่อมระหว่างวง A และ B มีโซ่ข้างเป็นกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น โรทีโนน (rotenone) จาก *Derris* spp. มีฤทธิ์เบื่อปลา โคเมสตรอล (Coumestrol) จากพืชตระกูลถั่ว *Trifolium* spp. มีฤทธิ์ oestrogenic จึงทำให้สัตว์ในทุ่งหญ้าเป็นหมันได้ (clover disease) และพิซาทิน (Pisatin) จากถั่วเหลือง เป็นไฟโตอะเลกซิน (phytoalexin) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนผิวของพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

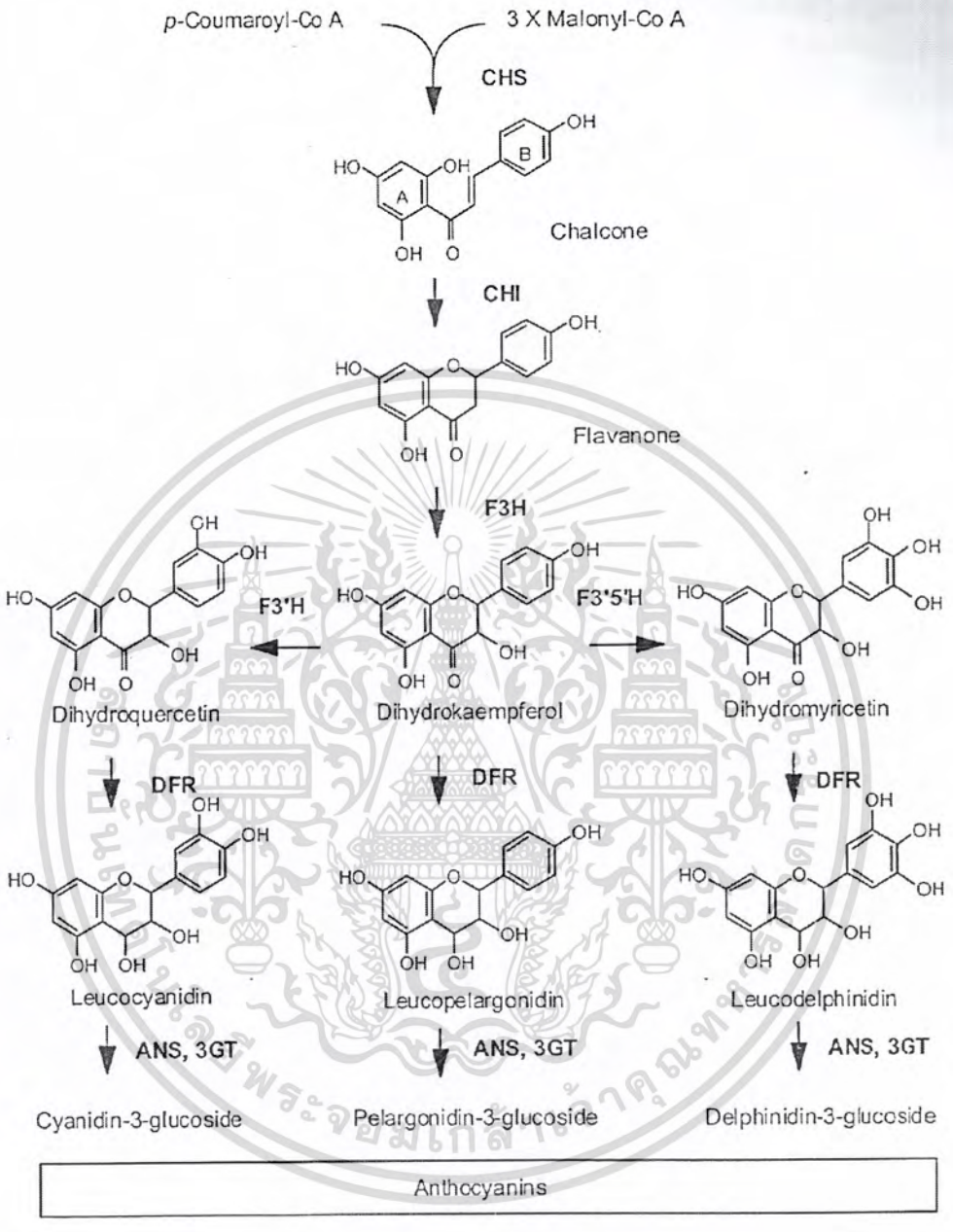
2.1.6 แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) (กนกพร, 2545)

แอนโทไซยานิน เป็นสารกลุ่มเม็ดสีสะสมอยู่ในแวคิวโอล ของเนื้อเยื่อดอกและใบของพืช สารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสารส่งสัญญาณของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อแสง UV-B การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีรายงานถึงการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่าง เมื่อพืชถูกเชื้อโรครบกวน เช่นเดียวกับในข้าวโพด มีรายงานการสะสมของสารกลุ่มนี้เมื่อถูกหนอนรบกวน และยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินกับการเพิ่มความต้านทานหนอนรบกวนในพืชอีกด้วย นอกจากนี้ ยังมีการใช้สารกลุ่มนี้ในทางเภสัชเวชและเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เช่น ให้ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดปริมาณคลอเลสเตอรอล และต่อต้านการเกิดมะเร็ง

ชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินนั้น ให้ผลผลิตเป็นสารมีสีซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย จึงนิยมใช้ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้เป็นต้นแบบสำหรับศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีน และหน้าที่ของยีน โดยเฉพาะการควบคุมการแสดงออกของยีน ได้มีการแยกยีนศึกษาหน้าที่และรูปแบบการแสดงออกของยีน ซึ่งได้จากชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิด เช่น อะราบิดอปซิส *(Arabidopsis)* พิทูเนีย สแนปดรากอน และข้าวโพด ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 2

โดยขั้นตอนแรกที่เข้าสู่ชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เกิดจากการกระตุ้นให้รวมตัวกันของ malonyl CoA 3 โมเลกุล และ *p*-coumaroyl CoA 1 โมเลกุล โดยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ให้ผลผลิตสารแนรินเจนนิน แคลโคน (naringenin chalcone) ซึ่งมีสีเหลือง ขั้นตอนที่สองเป็นการเกิดไอโซเมอร์ (isomerization) ของสารแชลโคน โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้สารแนรินเจนนินฟลาวาโนน (naringenin flavonone) ซึ่งไม่มีสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้สารแนรินเจนนินฟลาวาโนน (naringenin flavonone) ซึ่งไม่มีสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone-3-hydroxylase (F3H) ให้สารกลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอล คือ สารไดไฮโดรเคเอ็มฟีรอล (dihydrokaempferol) สารนี้อาจจะได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งต่างๆ เพิ่มเติม โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) และ flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) และให้สารกลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอลชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แนวทางของวิถีชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ตัวพิมพ์ใหญ่คือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoid 3'5'-hydroxylase, DFR, dihydroflavonol reductase; ANS, anthocyanidin synthase; 3GT, anthocyanin glucosyltransferase

ที่มา : กนกพร, 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไดไฮโดรเควอซีทิน (dihydroquercetin) และ ไดไฮโดรเมอริซีทิน (dihydromyricetin) จำนวนหมู่ไฮดรอกซีบนวง B นี้ มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเม็ดสีที่แตกต่างกัน การเปลี่ยนสารกลุ่มไดไฮโดรฟลาโวนอล เปลี่ยนเป็นสารมีสีกลุ่มแอนโทไซยานินต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด โดยเริ่มจากกระตุ้นการรีดิวซ์สารกลุ่มนี้ด้วยเอนไซม์ dihydrofkavonol reductase (DFR) และให้สารกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานิดิน (leucoanthocyanidin) ได้แก่ ลิวโคไซยานิดิน (leucocyanidin) ลิวโคเพลาโกนิดิน (leucopelargonodin) และ ลิวโคเดลฟินิดิน (leucodelphinidin) ซึ่งจะถูกออกซิเดชั่น (oxidation) ดีไฮเดรชั่น (dehydration) และไกลโคซิลเลชั่น (glycosylation) ให้สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งให้เม็ดสีแตกต่างกัน ได้แก่ ไซยานิดิน เพลาโกนิดิน และ เดลฟินิดิน ซึ่งให้สีแดง ส้ม และม่วง ตามลำดับ นอกจากนี้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดปฏิกิริยาต่างๆเพิ่มเติม เช่น ไกลโคซิลเลชั่น เมทิลเลชั่น และเอซิลเลชั่น ซึ่งทำให้เกิดเม็ดสีแอนโทไซยานินที่จำเพาะในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้ต้องการเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) และทรานสพอร์เตอร์ (transporters) ซึ่งเรียกว่า กลูทาไทโอน พัมพ์ (glutathione pump) สำหรับเคลื่อนย้ายสารจากไซโทพลาสซึมเข้าสู่แวคิวโอล

2.1.7 ปัจจัยซึ่งมีผลเกี่ยวข้องกับการกำหนดสีในพืช

การสะสมของสารกลุ่มเม็ดสีในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ในบริเวณส่วนต่างๆของพืช จะมีผลต่อการให้สีที่แตกต่างกันออกไป สารกลุ่มเม็ดสีได้แก่ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งรวมถึงสารแอนโทไซยานิน แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และเบตาเลน (betalain) สำหรับฟลาโวนอยด์และแคโรทีนอยด์จะพบได้ในพืชทั่วไปส่วนเบตาเลนจะพบเฉพาะใน *Caryphyllales*, *Amaranthus* และบีท และไม่พบเม็ดสีนี้อยู่รวมกับแอนโทไซยานิน แอนโทไซยานินเป็นเม็ดสีกลุ่มหลักที่พบในพืชชั้นสูง แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆ ซึ่งมีผลในการกำหนดเฉดสีของดอกไม้ด้วย เช่น การแสดงออกร่วมกันของกลุ่มเม็ดสีอื่นๆ ค่าพีเอชในแวคิวโอลและรูปร่างของเซลล์ การสร้างและสะสมสารแอนโทไซยานิน

ปัจจัยแวดล้อมอื่นๆก็ส่งผลต่อการมองเห็นสีของดอกไม้เช่นกัน การรวมไอออนของธาตุโลหะและเม็ดสีร่วม เช่น ฟลาโวนอล (flavonol) และฟลาโวน (flavones) จะมีผลต่อการเปลี่ยนสีของสารแอนโทไซยานิน โดยจะทำให้เกิดการสะสมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร และส่งผลให้เม็ดสีดูดกลืนแสงได้ดีขึ้นจึงเป็นการเพิ่มความเข้มสี ในพืชหลายชนิดพบว่าดอกไม้เมื่ออายุมากขึ้นจะมีค่าในแวคิวโอลสูงขึ้น และจะส่งผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดสีโทนฟ้าเพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณเม็ดสีไม่เปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน จะเห็นได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมค่าพีเอชในแวคิวโอลนั้น มีทั้งปัจจัยทางสภาวะแวดล้อม และทางพันธุกรรม รูปร่างของเซลล์ซึ่งสะสมเม็ดสีแอนโทไซยานินนั้นก็มีผลต่อการมองเห็นสี กลีบดอกของสแนปดรากอนในต้นพืชปกติ พบว่าเซลล์เอพิเดอร์มิสชั้นในมีลักษณะเป็นรูปกรวยซึ่งจะดูดกลืนแสงได้ดีกว่าเซลล์แบนราบในต้นพืชกลายพันธุ์

2.1.8 การควบคุมรูปแบบของการเกิดสี

กลีบดอกไม้จะมีรูปแบบการเกิดสีเกิดจากการสะสมของแอนโทไซยานินที่เซลล์จำเพาะ การควบคุมชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินจะควบคุมที่การถอดรหัสยีนเป็นส่วนใหญ่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของยีนโครงสร้าง (structural gene) ซึ่งทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีทำการสร้างสารแอนโทไซยานิน และกลุ่มของยีนควบคุม (regulatory gene) จะให้โปรตีนซึ่งกำหนดการแสดงออกของยีนโครงสร้างและรูปแบบของการสะสมเม็ดสี โดยการแสดงออกของยีนควบคุมจะมีความจำเพาะต่อรูปแบบของการเกิดสี ถึงแม้ว่าในพืชหลายชนิดจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ก็พบว่ายีนโครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งทำหน้าที่เดียวกันในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินนั้น จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ร่วมกัน และยีนเหล่านี้ยังถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยแสง การศึกษาถึงการควบคุมชีวสังเคราะห์แอน-โทไซยานินโดยเฉพาะเทคนิคการกลายพันธุ์นั้นพบว่า การควบคุมชีวสังเคราะห์นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุม ในการกำหนดรูปแบบการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินอย่างมากมายทั้งในด้านการวิเคราะห์โครงสร้างสารและด้านอณูชีววิทยา แต่กลไกที่แน่นอนยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติม การเกิดเฉดสีของพืชส่วนใหญ่นั้นจะควบคุมที่การถอดรหัสยีน ซึ่งการควบคุมนั้นมีความซับซ้อนเกี่ยวข้องกับโปรตีนควบคุมหลายชนิด ส่งผลให้พืชแสดงรูปแบบการเกิดสีที่แตกต่างกันออกไปอย่างมากมาย การเข้าใจถึงกลไกการทำงานของยีนในการควบคุมการเกิดสีร่วมกับปัจจัยอื่นๆนั้น น่าจะเป็นแนวทางในการนำองค์ความรู้ไปใช้เพิ่มคุณค่าผลผลิตทางการเกษตรทั้งในด้านคุณค่าอาหาร เภสัชเวช และคุณค่าทางเศรษฐกิจอื่นๆ เช่น การผลิตไม้ตัดดอกหรือผลไม้ที่มีสีสันแตกต่างไปจากที่มีในธรรมชาติ การผลิตพืชต้านทานโรคแมลง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ยีนควบคุมและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

มีการจัดจำแนกยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในพืชหลายชนิด ยีนควบคุมแบ่งเป็นประเภทต่างๆได้ตามโดเมนซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ร่วมกัน ในที่นี้จะกล่าวถึงยีนควบคุมที่มีโดเมน myb และ basic helix-loop-helix (bHLH) ซึ่งยีน 2 กลุ่มนี้ ได้มีการโคลนและศึกษาการแสดงออกในพืชหลายชนิด

2.2.1 Myb (Martin, and Paz-Ares, 1997)

โปรตีน myb เป็นทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ (transcription factor) ซึ่งมีบริเวณที่สำคัญอยู่ 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณที่ใช้จับกับดีเอ็นเอ และบริเวณที่จะกระตุ้นให้เกิดการลอกรหัส (activation domain) การจำแนก myb จะใช้บริเวณรีพีท (repeat : R) ซึ่งอยู่ภายในบริเวณที่ใช้จับกับดีเอ็นเอ myb ในสัตว์มักจะมีรีพีท 3 ชนิด คือ R1, R2 และ R3 ส่วนในพืชมักจะมีเพียง R2 และ R3 เท่านั้น แต่ก็มีพืชบางชนิดที่มีเพียงรีพีทชนิดเดียวหรืออาจมีทั้งสามชนิด แต่ละรีพีทประกอบด้วยกรดะมิโนประมาณ 50 ตัว ภายในรีพีทเดียวกัน จะมีบริเวณอนุรักษ์ร่วมกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งมีทริปโตเฟนจำนวน 3 ตัวที่อยู่ห่างกันภายในรีพีท จับกันด้วยพันธะทางเคมี ทำให้สายพอลิเพปไทด์เกิดโครงสร้างสามมิติเป็นลักษณะ helix-turn-helix สำหรับในพืช ทริปโตเฟนตัวแรกภายใน R3 อาจถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก (aromatic amino acid) ชนิดอื่น

การทำงานของโปรตีน myb จะเกิดขึ้นโดยการจับกับดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ (sequence-specific) ซึ่งเกิดจากกรดอะมิโน 8 ตัวภายในแต่ละรีพีท โดยกรดอะมิโน 6 ใน 8 ตัว จะเหมือนกันในพืชแต่ละชนิด ส่วนอีก 2 ตัวจะแตกต่างกันไป แต่ยังคงมีความคล้ายกันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการจับกับดีเอ็นเอนี้ ส่งผลต่อบริเวณที่ myb จะเข้าไปจับ และความสามารถในการจับ

2.2.1.1 การควบคุมการทำงานของ myb ในพืช แบ่งเป็น 2 ระดับ ได้แก่

2.2.1.1.1 การควบคุมในระดับก่อนการแปลรหัส (Pre-translational control)

ได้แก่ การควบคุมการสร้าง mRNA ซึ่งมีความจำเพาะในแต่ละอวัยวะ เวลา และการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสง ความเครียดต่างๆ เป็นต้น นอกจากนี้ การดัดแปลง mRNA และการส่ง mRNA ออกนอกนิวเคลียส ก็เป็นการควบคุมในระดับนี้เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.1.2 การควบคุมในระดับหลังการแปลรหัส (Post - translational control)

ได้แก่ ค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล (redox potential) ภายในเซลล์การทำงานของ myb ที่มีบริเวณที่ใช้จับกับดีเอ็นเอ เหมือนกันหรือคล้ายกันมาก ซึ่งทำให้เกิดการแย่งจับกับดีเอ็นเอ ในกรณีนี้ กิจกรรมของ myb จะขึ้นอยู่กับปริมาณ ความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอ และความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการลอกรหัส

การทำงานร่วมกับทรานส์คริปชันแฟคเตอร์อื่น ก็เป็นปัจจัยสำคัญเช่นกัน การควบคุมการแสดงออกของยีนบางยีน ไม่ได้เกิดจากการทำงานของ myb เพียงอย่างเดียว เช่น โปรตีน C1 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม myb จะจับกับโปรตีน R ซึ่งมีโดเมน bHLH เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนโครงสร้าง ในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวโพด

2.2.2 bHLH (Caboche; et. al. 2000)

ทรานส์คริปชันแฟคเตอร์กลุ่มนี้ ทางปลายคาร์บอกซิลจะประกอบด้วย α-helix 2 บริเวณ ได้แก่ helix I และ helix II แต่ละ helix จะมีกรดอะมิโนประมาณ 15-20 ตัว และมี loop สั้นๆเป็นตัวเชื่อมระหว่าง helix เกิดเป็นโครงสร้างตติยภูมิแบบ helix-turn-helix (HLH) ส่วนทางปลายอะมิโนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นเบสจำนวนมาก

โปรตีนที่มีโดเมน bHLH นี้ จะจับกับโปรตีนที่มีโดเมนเดียวกันที่บริเวณ HLH เกิดเป็น ไดเมอร์ (dimer) หากโปรตีนที่มีโดเมนนี้เป็นโปรตีนที่เหมือนกันมาจับกัน จะเรียกว่า โฮโมไดเมอร์(homodimer) แต่ถ้าเป็นโปรตีนต่างกัน จะเกิดเป็นเฮเทอโรไดเมอร์ (heterodimer) ส่วนด้านปลายอะมิโนจะเป็นบริเวณที่เข้าจับกับดีเอ็นเอ โดยบริเวณที่จะเข้าไปจับและประสิทธิภาพในการจับ ขึ้นอยู่กับโปรตีนที่มาจับกันเป็นไดเมอร์

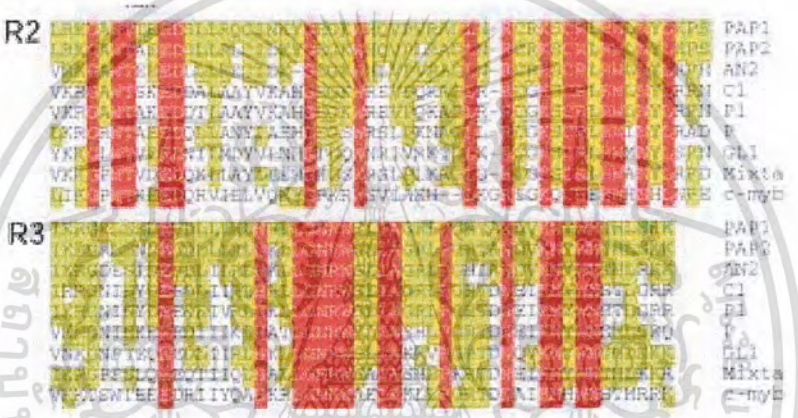
2.2.3 ยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในอะราบิดอบซิส

อะราบิดอบซิสเป็นพืชชนิดหนึ่ง ที่ได้มีการจัดจำแนกและศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น เป็นพืชที่มีจีโนมขนาดเล็ก มีวงจรชีวิตสั้น และมีการหาลำดับเบสทั้งหมดในจีโนมแล้ว เป็นต้น ตัวอย่างของยีนควบคุมที่ได้มีการศึกษาแล้ว ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.1 *PAP1* (*Production of Anthocyanin Pigment 1*) และ *PAP2* (Blount; et. al. 2000)

PAP1 และ *PAP2* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของยีน *myb* ซึ่งภายในโดเมนนี้จะให้ลำดับกรดอะมิโน R2และ R3 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *PAP1* และ *PAP2* มีบริเวณอนุรักษ์ร่วมกับ myb อื่นๆ เช่น โปรตีน An2 จากพิทูเนีย, C1, PI และ P จากข้าวโพด ดังแสดงในรูปที่ 3 นอกจากนี้ ยังมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน GL1 จากอะราบิดอบซิส และ Mixta จากสแนปดรากอน ซึ่งควบคุมการพัฒนาของขนอ่อน (trichome) อีกด้วย



รูปที่ 3 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในบริเวณ R2 และ R3 โปรตีนกลุ่ม myb บางตัว (บริเวณสีแดง และบริเวณสีเหลือง หมายถึง conserved residue และ matching residue ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ PAP1)

ที่มา : Blount; et. al. 2000

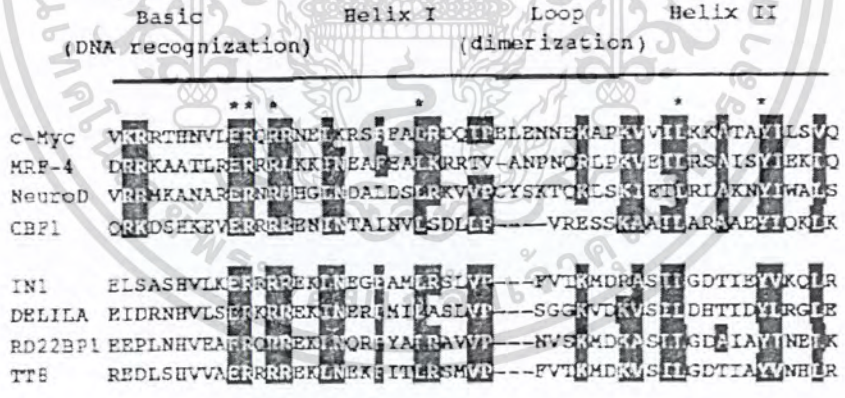
ลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมน myb ของ PAP1 และ PAP2 เหมือนกันเท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 77 เปอร์เซ็นต์ ภายในโปรตีนทั้งหมด การทำให้ยีน *PAP1* หรือ *PAP2* แสดงออกมากกว่าปกติ (over expression) ในอะราบิดอบซิส ส่งผลให้มีการสร้างแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นในทุกส่วนของต้นพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ กิ่ง กลีบดอก และเกสร เป็นต้น นอกจากนี้ ยังส่งผลให้มีการสะสมของฟลาโวนอลและไฮดรอกซีซินนาเมทมากขึ้น เมื่อเทียบกับต้นควบคุมที่มีการแสดงออกของยีนเหล่านั้นในระดับปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีน *PAP1* หรือ *PAP2* สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชชนิดอื่นได้ จากการศึกษาโดยถ่ายโอนยีน *PAP1* หรือ *PAP2* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV 35S และเทอร์มิเนเตอร์จากยีนที่กำหนดรหัสของ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxidase เข้าสู่ยาสูบ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน มีการผลิตแอนโทไซยานินที่ดอกมากขึ้น เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนนี้ แต่ต้นที่ได้รับ *PAP2* มีแนวโน้มที่จะผลิตแอนโทไซยานินมากกว่าต้นที่ได้รับ *PAP1*

2.2.3.2 *TT8 (Transparent testa 8)* (Caboche; et. al. 2000)

เป็นยีนควบคุมที่กำหนดรหัสของทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ในกลุ่มของ bHLH ซึ่งแยกได้จากอะราบิดอบซิส จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมนนี้ พบว่า TT8 มีบริเวณอนุรักษ์ร่วมกับ c-Myc ซึ่งมีในสัตว์ และโปรตีนอื่นๆ ที่มีโดเมน bHLH จากพืช ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมน bHLH ของ TT8 กับโปรตีนอื่นๆ ที่มีโดเมนเดียวกัน (แถบสีดำ หมายถึง กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์)

ที่มา : Caboche; et. al. 2000

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่างๆ ของชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ในอะราบิดอบซิสที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *TT8* พบว่า ยีน *TT8*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเป็นสำหรับการแสดงออกของยีน *DFR* ซึ่งควบคุมขั้นตอนแรกในการเปลี่ยนสารตัวกลางในวิถี (intermediate) ให้เข้าสู่การสร้างแอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิดิน นอกจากนี้ *TT8* ยังจำเป็นสำหรับการแสดงออกของยีน *BAN* (*BANYULS*) ซึ่งกำหนดรหัสเอนไซม์ที่นำสารตัวกลางเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์คาทีชิน และโปรแอนโทไซยานิดิน อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนเหล่านี้ ยังขึ้นอยู่กับยีนซึ่งให้โปรตีนควบคุม *TT2 (Transparent 2)* และ *TTG1* (*Transparent testa glabra 2*) ซึ่งกำหนดรหัสของทรานส์คริปชันแฟคเตอร์ในกลุ่ม myb และ WD 40 repeat อีกด้วย ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า *TT8*, *TT2* และ *TTG1* มีการทำงานร่วมกันเพื่อที่จะกระตุ้นให้เกิดการลอกรหัสของยีนในชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

2.3 การโคลนยีน (สุรินทร์, 2545; http://www.geocities.com/sriboon2001/juntima/ch2.htm)

การโคลนยีนหรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้น ในขั้นตอนแรกต้องเตรียมดีเอ็นเอก่อน เมื่อได้ดีเอ็นเอจากแหล่งที่ต้องการแล้ว จึงนำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ (vector) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) แล้วจึงนำไปถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ (host) ขั้นตอนในการโคลนยีนมีดังนี้

2.3.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับโคลน

ดีเอ็นเอที่ใช้ในการโคลนยีนมี 3 แหล่ง คือ ดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์ หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ซึ่งเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น เรียกว่า จีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจาก mRNA เรียกว่า คอมพลิเมนทารีดีเอ็นเอ (complementary DNA หรือ cDNA) เป็นดีเอ็นเอที่มาจากยีนที่มีการแสดงออก โดยสร้างอาร์เอ็นเอในอวัยวะหนึ่งในช่วงหนึ่งของชีวิต และสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี หรือใช้เอนไซม์ หรือใช้ร่วมกันทั้งวิธีทางเคมี และใช้เอนไซม์

2.3.2 เวคเตอร์ (vector)

ชิ้นดีเอ็นเอที่เราต้องการโคลนนั้นมักจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาต่อเข้ากับดีเอ็นเออื่นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ คือ ดีเอ็นเอที่เป็นพาหะ หรือเวคเตอร์ (vector) นั่นเอง เวคเตอร์ คือ ดีเอ็นเอใดๆ ที่มีลักษณะเป็นหน่วยที่สามารถจำลองตัวเองได้ (replicon) หรือจะสามารถแทรกตัวเข้าไปในส่วนของดีเอ็นเอของเซลล์ผู้รับได้โดยวิธีคอมบิเนชั่น ทั้งนี้เนื่องจากยีนหรือส่วนของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอที่ต้องการถ่ายให้กับเซลล์ผู้รับนั้นมักจะไม่สามารถจำลองตนเองได้ จึงไม่สามารถคงอยู่ได้ เวคเตอร์จะทำหน้าที่ 2 อย่าง คือ ป้องกันไม่ให้ยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจถูกย่อยทำลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ผู้รับ และช่วยให้มีการจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มปริมาณและถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นต่อไปได้ ช่วยให้ยีนที่ใส่เข้าไปนั้นแสดงออก (express) ในเซลล์ผู้รับ เวคเตอร์ที่จะใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ผู้รับ เวคเตอร์ชนิดหนึ่งอาจเพิ่มปริมาณหรือจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับชนิดหนึ่งหรือสองชนิดเท่านั้น จึงต้องเลือกเวคเตอร์ที่เหมาะสมกับเซลล์ผู้รับที่ใช้ โมเลกุลของเวคเตอร์จะประกอบด้วยส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัว (origin of replication) ซึ่งทำงานได้ในเซลล์ผู้รับ ดังนั้นเวคเตอร์จะเป็นดีเอ็นเอใดๆ ก็ได้ที่สามารถจำลองตัวเองได้ในเซลล์ผู้รับนั้น คือ มีลักษณะเป็นหน่วยหนึ่งในการจำลองตัว (replicon) เวคเตอร์ที่นิยมใช้มีดังนี้

2.3.2.1 พลาสมิด (plasmid)

พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรียหลายชนิด มีโครงสร้างได้หลายแบบ เช่น เป็นวงแหวนเกลียวคู่ เส้นสาย หรือวงแหวนเปิด มีขนาดตั้งแต่ 1,000 คู่เบส จนถึงมากกว่า 200,000 คู่เบส หรือประมาณ 0.2 - 4 เปอร์เซ็นต์ ของโครโมโซม พลาสมิดมักจะมียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ หรือสารที่มีประโยชน์กับแบคทีเรียในบางสภาวะ จึงทำให้แบคทีเรียที่เป็นเจ้าของพลาสมิดมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น ทำให้เกิดความต้านทานยาปฏิชีวนะได้ ย่อยทำลายโมเลกุลบางชนิด และต้านทานต่อโลหะหนัก เป็นต้น อย่างไรก็ตามพลาสมิดไม่ใช่สิ่งจำเป็นในแบคทีเรีย ยกเว้นในบางสภาวะเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจพบหรือไม่พบพลาสมิดในเซลล์ของแบคทีเรียก็ได้ พลาสมิดมีคุณสมบัติเป็นหน่วยที่จำลองตัวเองได้เมื่อนำมาตัดต่อกับยีนที่สนใจ แล้วกลับใส่เข้าไปในแบคทีเรียผู้รับ จะสามารถเพิ่มจำนวนและทำให้ยีนที่สอดแทรกอยู่เพิ่มขึ้นตามด้วย

พลาสมิดที่พบในธรรมชาติมีข้อด้อยหลายอย่าง ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นเวคเตอร์โดยตรง จึงมีการดัดแปลงหรือนำเฉพาะบางส่วนมาสร้างเป็นพลาสมิดใหม่เพื่อให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ตัวอย่าง พลาสมิดที่ใช้ในการโคลนยีนในปัจจุบัน เช่น pUC 18, pUC19 และpGEM-3Zf (+/-) พลาสมิด pGEM-3Zf (+/-) เป็นดีเอ็นเอวงแหวนเกลียวคู่ขนาด 3,199 คู่เบส มีส่วนของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Amp^r) จุดเริ่มต้นในการจำลองโมเลกุล และมียีนเบตากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase หรือ *lac Z*) บางส่วน ซึ่งเมื่อถ่ายพลาสมิดนี้เข้าสู่ *E. coli* ที่มีส่วนของยีนเบตากาแลคโตซิเดสบริเวณดังกล่าวขาดหายไป (deletion) ส่วนของยีนจากพลาสมิดจะถูกถอดรหัสและแปลรหัสได้โพลีเพปไทด์ซึ่งไปเสริมกับส่วนของโพลีเพปไทด์ที่ได้จากเซลล์ทำให้ได้เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสที่สามารถทำงานได้ในยีน *lac Z* ของ พลาสมิดมีการดัดแปลงให้มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดโดยไม่มีผลต่อคุณสมบัติของโพลีเพปไทด์ที่ได้หากไม่มีการแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณนี้เรียกว่า multiple cloning site (MCS) ใช้เป็นที่ตัดพลาสมิดเพื่อสอดแทรกดีเอ็นเอที่ต้องการลงไป แต่เมื่อสอดแทรกดีเอ็นเออื่นลงไปแล้วพอลีเพปไทด์ที่ได้จากพลาสมิดจะไม่สามารถทำงานได้ ทำให้เซลล์ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดส เทคนิคนี้เรียกว่า อินเซิร์ทชันนอล อินแอคติเวชัน (insertional inactivation) ใช้สำหรับคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด เซลล์ *E . coli* ที่ยังไม่มีพลาสมิดนั้นจะไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดส เมื่อถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ จะสามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาและมีกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ถ้ามีการสอดแทรกชิ้นดีเอ็นเออื่นเข้าไปที่บริเวณ MSC เซลล์จะเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ แต่ยังคงไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดส เมื่อใส่สาร IPTG (isopropyl b-D-thiogalactoside) ซึ่งเป็นสารที่ใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดส และสาร X-gal (5-bromo-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) ซึ่งเป็นสับสเตรตของเอนไซม์นี้ลงในอาหาร เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดแต่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดส ซึ่งจะย่อยสาร X-gal เกิดเป็นสารสีฟ้า ทำให้โคโลนีมีสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมที่มีดีเอ็นเออื่นแทรกอยู่ด้วยจะไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไม่สามารถย่อยสาร X-gal ได้ โคโลนีจึงไม่เกิดสี ทั้งนี้เซลล์ *E .coli* ที่ใช้เป็นผู้รับต้องเป็นสายพันธุ์ที่มีส่วนของยีนบางส่วนหายไปไม่สามารถเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ได้โดยตัวเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

58538

2.3.2.1 ฝาจแลมบ์ดา (lambda phage)

ฝาจแลมบ์ดาเป็นไวรัสที่บุกรุกแบคทีเรีย *E. coli* มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ขนาดประมาณ 48,500 คู่เบส เมื่อเข้าไปอยู่ในเซลล์ของ *E . coli* แล้วจะมีการดำรงชีวิตได้ 2 แบบ ได้แก่

2.3.2.2.1 ไลติกพาทเวย์ (lytic pathway) จะเกิดการจำลองตัวเองและถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอเพื่อสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบต่างของไวรัส แล้วจึงบรรจุดีเอ็นเอที่จำลองตัวขึ้นใหม่นี้ ลงในโปรตีนห่อหุ้มกลายเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ ออกจากเซลล์แบคทีเรียโดยทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (lysis) เกิดเป็นพลาค (plaque)

2.3.2.2.2 ไลโซเจนิกพาทเวย์ (lysogenic pathway) ดีเอ็นเอของไวรัสที่จับตัวกันเป็นวงแหวนจะแทรกตัวเข้าไปอยู่ในโครโมโซมของแบคทีเรีย มีการจำลองโมเลกุลพร้อมๆ กับโครโมโซม เรียกว่า โปรฝาจ(prophage) ซึ่งจะไม่ทำให้แบคทีเรียตาย

การใช้ฝาจแลมบ์ดาเป็นเวคเตอร์ทำโดยตัดเอาส่วนของจีโนมที่ไม่จำเป็นออกไป แล้วสอดใส่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนเข้าไปแทนที่ นำมาบรรจุลงในโปรตีนห่อหุ้มของฝาจในหลอดทดลอง ให้บุกรุกเข้าเซลล์ของ *E. coli* จะมีการสร้างอนุภาคขึ้นใหม่จำนวนมาก และชิ้นดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่ก็จะทวีจำนวนขึ้นมากมายในสภาพของอนุภาคไวรัส ซึ่งสามารถสกัดแยกให้บริสุทธิ์ได้

2.3.2.3 คอสมิด (cosmid)

ภายในคอสมิดมีจุดเริ่มต้นการจำลองตัวเองในแบคทีเรีย และมีส่วนที่ทำให้กลายเป็นสายเดี่ยว เพื่อให้สามารถบรรจุลงในอนุภาคฝาจได้ นอกจากนี้ก็ยังมีส่วนที่ทำให้เกิดการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับคอสมิดซึ่งมีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ได้

2.3.3 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์

เมื่อเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ที่จะใช้ การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์มี 3 วิธี คือ

2.3.3.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (cohesive end ligation)

2.3.3.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ (blunt end ligation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสคู่สม ซึ่งเกิดจากการต่อเบสชนิดเดียวกันเข้าไปที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่ง โดยเอนไซม์เทอร์มินอลดีออกซีไรโบไดนิวคลีโอทิดิล ทรานส์เฟอเรส (terminal deoxyribodinucleotidyl transferase) ซึ่งจะเติมโฮโมพอลิเมอร์ที่เป็นคู่สมกันที่ปลายสองข้างของดีเอ็นเอ การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเออาจจะไม่ได้ใช้วิธีหนึ่งวิธีใดเพียงวิธีเดียว แต่ใช้หลายวิธีหรือต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน

2.3.4 การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์

การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ ทำได้หลายวิธีขึ้นกับชนิดของเวคเตอร์ที่ใช้ ถ้าเป็นพลาสมิด จะใช้วิธีใส่ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยตรง เรียกว่า ทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) โดยทำให้เซลล์ผู้รับ (*E. coli*) ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอภายนอกก่อน (competent cell) โดยใช้สารบางชนิด เช่น แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) หรือไอออนบวกอื่นๆ เช่น Mg^{2+}, K^{+} และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide หรือ DMSO) เป็นต้น นำเซลล์ที่อยู่ในสภาพที่พร้อมนี้มาใส่รวมกับพลาสมิดที่ตัดต่อกับดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจากพลาสมิดจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อเอนไซม์ดีเอ็นเอสที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* แล้วจึงทำให้ส่วนผสมของเซลล์และพลาสมิดนี้เปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอนั้นจะแทรกเข้าสู่เซลล์ได้ ประสิทธิภาพของการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธีทรานส์ฟอร์มเมชันนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น รูปร่างและขนาดของพลาสมิด ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ และวิธีที่ทำให้เซลล์เป็นคอมพีเทนท์ เป็นต้น พลาสมิดที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนปลายปิดและพันเป็นเกลียวซ้อน (supercoil) จะเข้าเซลล์ได้ดีกว่าพลาสมิดแบบเส้นตรงหรือวงแหวนปลายเปิด พลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่าพลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ ถ้า พลาสมิดขนาดใหญ่กว่า 15 กิโลเบส จะมีประสิทธิภาพต่ำมาก ระยะของเซลล์ที่ดีที่สุดในการทำเป็นคอมพีเทนท์ คือ เซลล์ที่เจริญถึงระยะ log phase

2.3.5 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ

วิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการนั้น ทำได้หลายวิธีขึ้นกับเวคเตอร์ที่ใช้และที่มาของโคลน โดยมีวิธีในการตรวจหาโคลนที่ต้องการได้หลายวิธี ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5.1 การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection)

2.3.5.2 การตรวจหาโดยวิธีทางอิมมูโนเคมี

2.3.5.3 การตรวจหาโดยวิธีนิวคลีอิคแอซิดไฮบริดไดเซชัน (Nucleic acid hybridization)

2.3.6 เอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีน

2.3.6.1 Restriction enzyme หรือ restriction endonuclease

เอนไซม์ในระบบนี้แบ่งเป็น 3 แบบตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์ โคแฟคเตอร์(cofactor) ที่ใช้ และวิธีการตัดดีเอ็นเอ ได้แก่

- แบบที่ 1

เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอ (nuclease) และเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิลเข้าไปที่เบสบางเบส (methylase) ได้ในขณะเดียวกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำ (recognition site) ที่จำเพาะแต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงห่างออกไป 400-7000 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}), ATP และ S-adenosylmethionine (SAM) ขณะที่เกิดการตัดสายดีเอ็นเอให้ขาด จะมีการสลาย ATPควบคู่ไปด้วย หลังจากนั้นเอนไซม์จะหมดคุณสมบัติที่จะตัดดีเอ็นเอ แต่ยังคงมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สลาย ATP (ATPase) ต่อไปได้อีก

- แบบที่ 2

เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 ใช้มากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์เพียงชนิดเดียว ตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำ หรือที่จุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน และในปฏิกิริยาต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียว การเติมหมู่เมธิลให้กับเบสอาศัยเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง

เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบนี้แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ปัจจุบันพบแล้วกว่า 400 ชนิด เอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย ให้ปลายที่เป็น 5'-phosphate สายหนึ่ง และ 3'-hydroxy ในอีกสายหนึ่ง บริเวณจดจำของเอนไซม์ประกอบด้วยเบส 4 คู่ 6 คู่ หรือมากกว่านี้ โดยที่ลำดับเบสที่บริเวณจดจำมักจะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเรียงตัวของเบสเหมือนกันอยู่ตรงกันข้ามของ 2 สาย และมีแกนสมมาตรอยู่กึ่งกลาง (axis of symmetry) เรียกว่า พาลินโดรม (palindrome) เมื่อตัดดีเอ็นเอให้ขาดจากกันแล้ว ชิ้นดีเอ็นเอทั้งสองจะมีปลายที่ยาวไม่เท่ากัน โดยเบสที่ปลายดังกล่าวอาจกลับมาจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนได้อีกเพราะมีเบสที่เป็นคู่สมกัน เรียกว่า ปลายเหนียว (cohesive end หรือ sticky end) ถ้าดีเอ็นเอที่ตัดได้มีปลาย 5' ที่ยาวกว่าปลาย 3' เรียกว่า 5' protruding end ถ้าตัดแล้วได้ปลาย 3' ที่ยาวกว่าปลาย 5' ก็เรียกว่า 3' protruding end เอนไซม์บางชนิดจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกันทั้ง 2 สาย ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปลายทั้งสองยาวเท่ากัน เรียกว่า ปลายทู่ (blunt end หรือ flush end) เอนไซม์บางชนิดมีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันได้บ้าง บางชนิดก็มีบริเวณจดจำที่ไม่เป็นพาลินโดรม และจะตัดดีเอ็นเอที่จุดห่างจากบริเวณจดจำ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่พบประมาณ 400 ชนิดนั้น มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกันประมาณ 90 แบบ ดังนั้นจึงมีเอนไซม์บางชนิดที่มีบริเวณจดจำเหมือนกัน เรียกว่า ไอโซชิโซเมอร์ (isoschizomer) แม้ว่าจะมีบริเวณจดจำเหมือนกัน แต่ไม่จำเป็นจะต้องตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน

- แบบที่ 3

ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25-27 คู่เบส ในปฏิกิริยาต้องมีแมกนีเซียมไอออน และ ATP โดยไม่จำเป็นต้องมี S-adenosylmethionine แต่ถ้ามี S-adenosylmethionine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และเอนไซม์จะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้ พบว่ายีนที่กำหนดการสร้างโพลีเพปไทด์ทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์นี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้ๆกัน ในส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของ *E. coli* บางสายพันธุ์ การสร้าง mRNA แยกกันเป็น 2 หน่วย ยีนหนึ่งทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอ และอีกยีนหนึ่งทำหน้าที่เติมหมู่เมธิล

เอนไซม์แบบที่ 1 และแบบที่3 จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอน และปฏิกิริยามีการแข่งขันกันว่าจะเกิดการตัดดีเอ็นเอหรือเติมหมู่เมธิล จึงไม่นิยมใช้ในการโคลนยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6.2 ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase)

เอนไซม์ไลเกสนี้อาจแยกมาจาก *E. coli* (*E. coli* ligase) หรือแยกจาก *E. coli* ที่ถูกบุกรุกด้วยฝาจทีโฟร์ (T4 DNA ligase) มีหน้าที่สร้างพันธะฟอสโฟ-ไดเอสเทอร์ระหว่างปลาย 5' ฟอสเฟตและ 3' ไฮดรอกซิลของดีเอ็นเอ ใช้เชื่อมรอยขาดในโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือเชื่อมต่อดีเอ็นเอ 2 โมเลกุลที่มีปลายเหนียวโดยเอนไซม์ *E. coli* ligase จะใช้ NAD เป็นตัวช่วย ส่วน T4 ligase จะใช้ ATP แทน นอกจากนี้ T4 ligase ยังสามารถเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายทู่ได้ด้วย

2.4 เทคนิคที่ใช้ในการโคลนยีน (http://www.geocities.com/sriboon2001/juntima/ch2.htm)

2.4.1 อิเล็กโทรโฟรีซิส

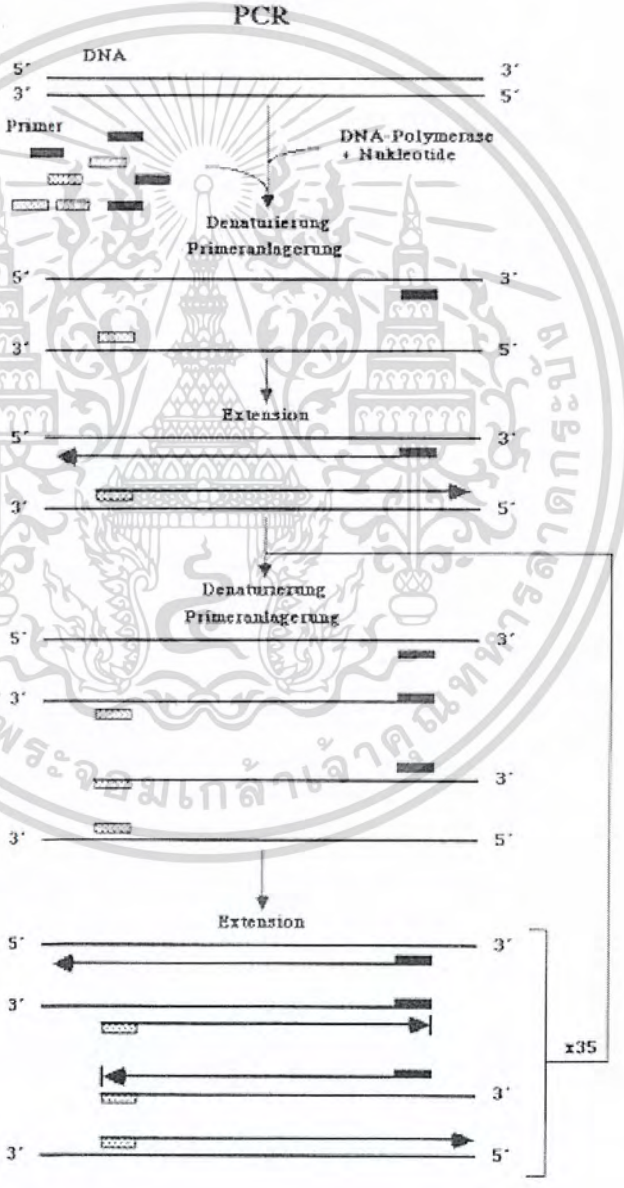
เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วยโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายดีเอ็นเอ จึงมีประจุเป็นลบที่พีเอชเป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอได้แก่ ขนาดของโมเลกุล รูปแบบของดี-เอ็นเอ เปอร์เซ็นต์และชนิดของเจล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และบัฟเฟอร์ที่ใช้

2.4.2 เทคนิคการทำพีซีอาร์ (PCR)

พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นสั้นๆ ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่นหลายชนิด โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน หลักการทำพีซีอาร์ คือ ขั้นแรกเราต้องรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจก่อน อาจจะรู้เฉพาะช่วงปลายของยีนนั้นก็ได้ แล้วจึงสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ 2 ชนิด แต่ละชนิดมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลาย 3' ของเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการ เพื่อใช้เป็นไพร์เมอร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไพร์เมอร์โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 20-35 เบส นำไพร์เมอร์ทั้งสองชนิดใส่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมกับดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์ทั้งหมด (genomic DNA) โดยใส่ในปริมาณที่มากเกินพอ หลังจากนั้นทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน แล้วจึงลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพร์เมอร์เข้ามาจับคู่ (anneal) กับเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการอย่างถูกต้อง เปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส พร้อมทั้งเอนไซม์ลงในปฏิกิริยา ก็จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น ทำเช่นนี้ 30-40 รอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการก็จะเพิ่มขึ้นเป็นล้านๆ เท่า ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 การทำพีซีอาร์

ที่มา : http://www.mgz-muenchen.de/ glossar.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* สามารถทนความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสได้ จึงนิยมใช้ในการทำพีซีอาร์ ทำให้ไม่จำเป็นต้องเติมเอนไซม์ในการสังเคราะห์แต่ละรอบเติมเพียงครั้งเดียวแล้วค่อยเปลี่ยนอุณหภูมิเท่านั้น เช่น ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ แล้วลดลงมาที่ 60 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้ไพร์เมอร์ไปเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ ตั้งเครื่องควบคุมอุณหภูมิไว้ 30-40 รอบ ก็จะได้ยีนที่ต้องการปริมาณมาก

2.5 วิธีการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

(http://rice.kps.ku.ac.th/lesson/Molecular/Chapter8.html)

วิธีการถ่ายโอนยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม เป็นวิธีการถ่ายโอนยีนโดยใช้พาหะเป็นตัวกลางในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช และเกิดกระบวนการเชื่อมต่อระหว่างสารพันธุกรรมที่ทำการส่งถ่ายกับจีโนมของพืช จากการค้นพบกลไกการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินที่เข้าบุกรุกทำลายพืชทางบาดแผลเป็นเชื้อสาเหตุของอาการปุ่มปม (crown gall) บริเวณลำต้นของพืชใบเลี้ยงคู่อีกหลายชนิด ภายในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีดีเอ็นเอพิเศษมีลักษณะเป็นวงแหวนขนาดเล็กอยู่ในส่วนไซโทพลาสซึมซึ่งถูกเรียกว่า พลาสมิด Ti (Tumour inducing plasmid) บนพลาสมิด Ti มีส่วนของดีเอ็นเอที่เรียกว่า T-DNA ซึ่งมียีนที่ก่อให้เกิดอาการปุ่มปม ในเซลล์พืชประกอบด้วยยีนรหัสในการผลิตฮอร์โมนพืชพวกออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งมีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และยีนสร้างสารประกอบพวกโอปีนที่เชื้อนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน เชื้ออะโกรแบคทีเรียมมีความสามารถในการส่งถ่ายส่วนของ T-DNA บนพลาสมิด Ti เข้าสู่เซลล์พืช บริเวณบาดแผลที่เชื้อเข้าบุกรุก T-DNA จะเข้าเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมพืช ทำให้เซลล์พืชเกิดการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ แสดงอาการปุ่มปมจากผลของฮอร์โมน ทำการสร้างสารประกอบพวกโอปีนซึ่งจะถูกเชื้ออะโกรแบคทีเรียมนำไปใช้ และสารมารถส่งถ่ายพลาสมิด Ti ไปยังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิดเพื่อให้นำสารประกอบโอปีนไปใช้ประโยชน์ได้ การใช้พลาสมิด Ti ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชทำโดยการแทนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอร์โมนพืช และยีนสร้างโอปีนด้วยยีนควบคุมลักษณะที่ต้องการบนส่วนของ T-DNA แล้วให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมทำการส่งถ่ายนำเข้าเชื่อมต่อกับโครโมโซมพืช เพื่อให้เกิดการแสดงออกในลักษณะที่ต้องการ การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืชประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงคู่ แต่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและธัญพืชยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ปัญหาสำคัญของการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวคือ อะโกรแบคทีเรียมจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชที่จะเข้าบุกรุก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งส่วนมากเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจไม่ได้เป็นพืชอาศัยของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพต่ำมีสาเหตุสำคัญคือ ลักษณะทางกายภาพของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่มีความแตกต่างกันทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีน เชื้ออะโกรแบคทีเรียมจะตอบสนองต่อสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อพืชเกิดบาดแผล ซึ่งจะกระตุ้นให้เชื้ออะโกร-แบคทีเรียม ในดินเคลื่อนที่เข้าบุกรุกพืชทางบาดแผล แต่บาดแผลที่เกิดในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะไม่มีการสร้างสารฟีนอลิกขึ้น หรือมีแต่มีการสร้างในปริมาณน้อย ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการบุกรุกของเชื้อต่ำลง รวมทั้งเซลล์ที่เกิดบาดแผลไม่แสดงการแบ่งตัวเหมือนในพืชใบเลี้ยงคู่ จึงมีการพัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในหลายๆ ปัจจัยของการถ่ายยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

3.1.1 ทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนควบคุม ได้แก่ *PAP* โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ ดังนี้

cDNA จาก *Arabidopsis*	2	ไมโครลิตร
10x Extaq buffer	5	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์	3	ไมโครลิตร
dNTP	1	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
รีเวอร์สไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Taq DNA polymerase)	0.3	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	36.7	ไมโครลิตร

มีสภาวะในการทำพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที การให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และการต่อเติมสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์โดยการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (extension) ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ *PAP* มีลำดับเบส เป็นดังนี้

ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5'-CGGGATCC ATG GAG GGT TCG TCC AAA-3'

รีเวอร์สไพรเมอร์ 5'-CGGGATCC CTA ATC AAR TTY MAC AGT-3'

โดย R หมายถึง A และ G, Y หมายถึง C และ T, M หมายถึง A และ C

และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.1.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จาการการทำพีซีอาร์ที่มีขนาดตามต้องการกับเวคเตอร์ yT&A (Yeastern Biotech, Co.,Ltd.) โดยเทคนิค T-A cloning โดยปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ ประกอบด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นดีเอ็นเอที่แยกมาจากการทำพีซีอาร์	4	ไมโครลิตร
yT&A	1.5	ไมโครลิตร
buffer A	1	ไมโครลิตร
buffer B	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอไลเกส (ligase) ชนิด T4	1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	1.5	ไมโครลิตร

บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวคเตอร์ เข้าสู่ *E. coli* และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, IPTG และ X-gal (ภาคผนวก ข) และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ คัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีปฏิกิริยา ดังนี้

10X buffer E	1	ไมโครลิตร
*Bam*HI (10 unit/µl)	0.3	ไมโครลิตร
พลาสมิดจากโคลนที่คาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่	2	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	6.6	ไมโครลิตร

3.1.3 ตรวจสอบชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*T14I มีปฏิกิริยาดังนี้

10X buffer E	1	ไมโครลิตร
*Bam*HI (10 unit/µl)	0.3	ไมโครลิตร
*Eco*T14I (8 unit/µl)	0.38	ไมโครลิตร
พลาสมิดจากโคลนที่คาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่	5	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	1.22	ไมโครลิตร

แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากพลาสมิด และทำให้ชิ้นดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

3.2.1 นำชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้วเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pHTT202 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ ประกอบด้วย

ชิ้นดีเอ็นเอที่แยกมาจากเจล	5	ไมโครลิตร
pHTT202	0.5	ไมโครลิตร
10x ligation buffer	2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอไลเกส	0.5	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	12	ไมโครลิตร

บ่มที่ 16 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อเข้าสู่ *E. coli* และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ภาคผนวก ข) และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ คัดเลือก พลาสมิด pHTT202 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีปฏิกิริยาดังนี้

10X buffer E	1	ไมโครลิตร
*Bam*HI (10 unit/µl)	0.3	ไมโครลิตร
พลาสมิดจากโคลนที่คาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่	1	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	7.6	ไมโครลิตร

3.2.2 คัดเลือกพลาสมิด pHTT202 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง (sense) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Pst*I มีปฏิกิริยา ดังนี้

10X buffer M	1.5	ไมโครลิตร
*Hin*dIII	0.3	ไมโครลิตร
*Pst*I	0.3	ไมโครลิตร
พลาสมิดจากโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่	5	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	7.9	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

ถ่ายโอนพลาสมิด pBI121 ที่มียีน *NPT II* ซึ่งให้เอนไซม์นีโอไมซิน ฟอสโฟทรานส์เฟอเรส และยีน *GUS* อยู่ในบริเวณ T-DNA เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 และนำอะโกร-แบคทีเรียมดังกล่าวมาถ่ายโอนเข้าสู่ใบยาสูบ (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

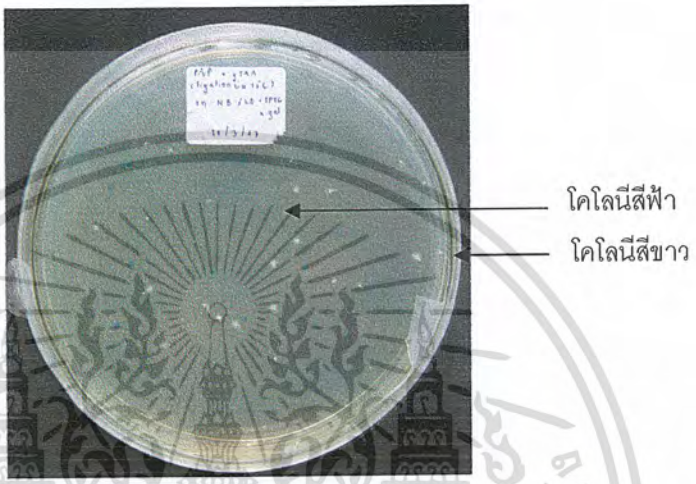
4.1 การโคลนยีนโดยใช้พีซีอาร์

4.1.1 การทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนควบคุม ได้แก่ *PAP* ซึ่งตรวจผลการทำพีซีอาร์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 6 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้คาดว่าน่าจะเป็น *PAP* เนื่องจากมีขนาดใกล้เคียงกับข้อมูลใน GenBank

รูปที่ 6 ผลการทำพีซีอาร์ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส
(1, 2 และ 3 คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์กับเวคเตอร์ yT&A เข้าสู่ *E. coli* และการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน , IPTG และ X-gal ได้ผลดังรูปที่ 7



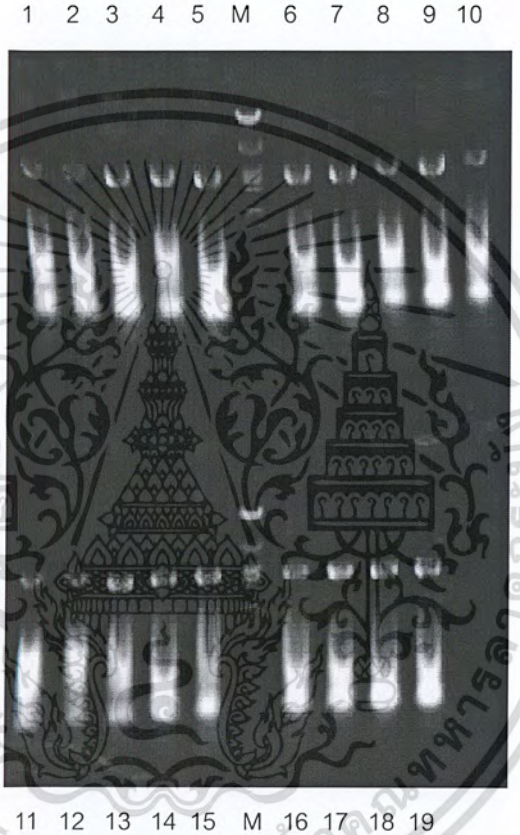
รูปที่ 7 โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสกับเวคเตอร์ yT&A บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, IPTG และ X-gal

เซลล์ที่ได้รับพลาสมิด yT&A จะสามารถเจริญได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เนื่องจากภายในพลาสมิดมียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิดนี้อยู่ ทำให้เจริญเป็นโคโลนีได้ ซึ่งโคโลนีที่ได้จะมี 2 ลักษณะ ได้แก่ โคโลนีสีขาว ซึ่งคาดว่ามีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ การแทรกของชิ้นดีเอ็นเอนี้จะเกิดในยีน *lacZ* ทำให้เอนไซม์เบต้ากาแลคโทซิเดสไม่สามารถทำงานได้ จึงไม่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (X-gal) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าได้ และโคโลนีสีฟ้า ซึ่งคาดว่าไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ ทำให้เอนไซม์เบต้ากาแลคโทซิเดสสามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น X-gal ให้ผลผลิตที่มีสีฟ้า จึงเห็นโคโลนีเป็นสีฟ้า

คัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่คาดว่าน่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ ตรวจผลการสกัดพลาสมิดโดยการทำอะกาโรสเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ
(1-19 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

การคัดเลือกพลาสมิด yT&A ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 9 จากการตัดพลาสมิด yT&A ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

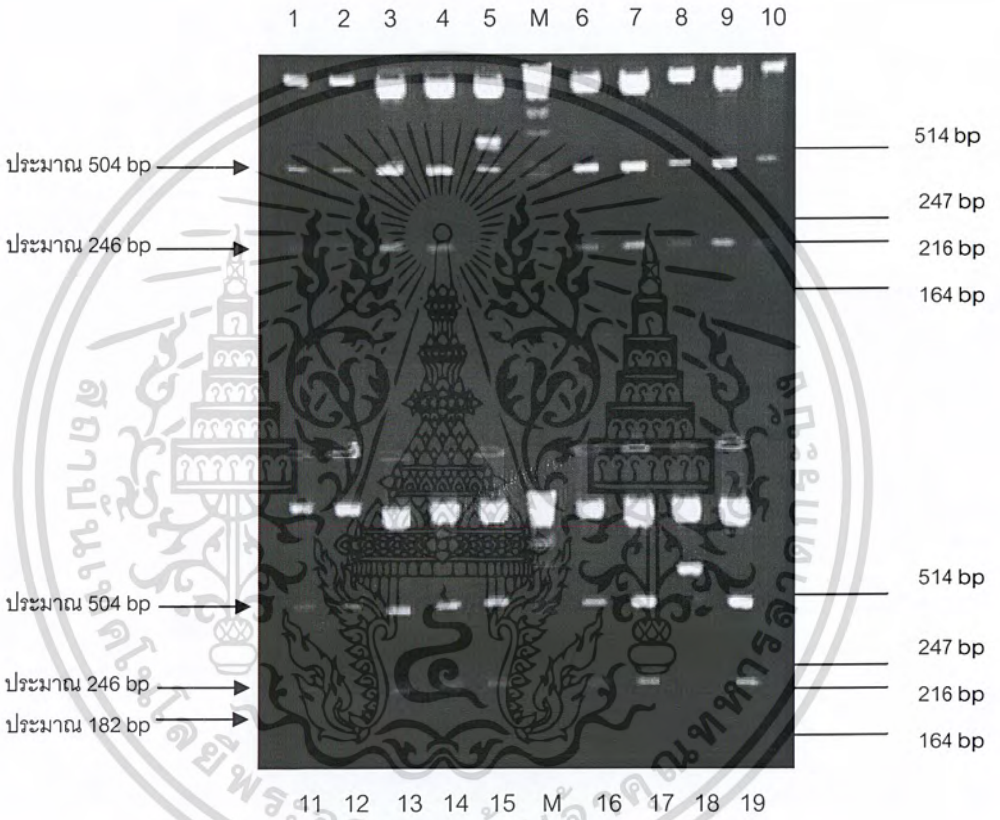
ขนาดประมาณ 750 คู่เบสแทรกอยู่ พบว่าโคลนหมายเลข 1 ถึง 19 มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ *PAP* ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank รวมถึงชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์

รูปที่ 9 ผลการตัดพลาสมิด yT&A ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบส แทรกอยู่

(1-19 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ซึ่งเป็นหมายเลขเดิมกับรูปที่ 8 และตัดด้วย *Bam*HI M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด yT&A โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*T14I ตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 2 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 ผลการตัดพลาสมิด yT&A ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ด้วย *Bam*HI และ *Eco*T14I เพื่อตรวจสอบชนิดของชิ้นดีเอ็นเอ

(1-19 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดซึ่งเป็นหมายเลขเดิมกับรูปที่ 9 ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

จากข้อมูลของ GenBank *PAP1* และ *PAP2* ไม่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bam*HI แต่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Eco*T14I โดยเมื่อตัด *PAP1* ซึ่งมีขนาด 747 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย *Eco*T14I จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้น ซึ่งมีขนาด 501, 182 และ 64 คู่เบส สำหรับ *PAP2* มีขนาด 750 คู่เบส เมื่อตัดด้วย *Eco*T14I จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 504 และ 246 คู่เบส ส่วนพลาสมิด yT&A ไม่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bam*HI และ*Eco*T14I

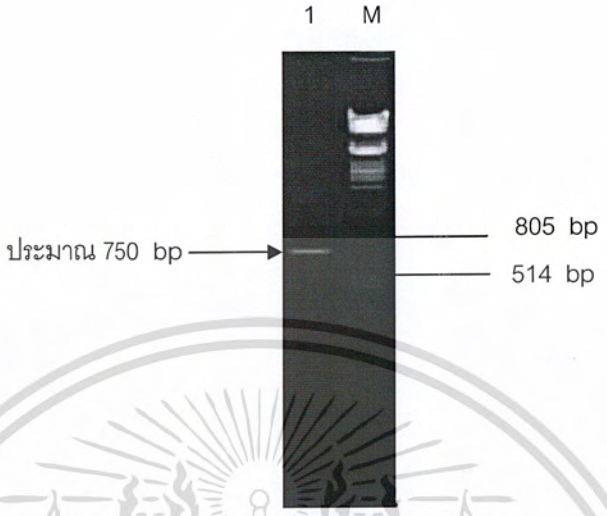
หลังจากการตัดพลาสมิดด้วย *Bam*HI และ *Eco*T14I ในเบื้องต้นคาดว่าโคลนหมายเลข 1, 2, 10 และ 11 น่าจะเป็น *PAP2* เนื่องจากพบแถบของดีเอ็นเอจำนวน 3 ชิ้น ได้แก่ แถบของเวคเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 2800 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด *PAP2* ด้วย *Eco*T14I

โคลนหมายเลข 12 น่าจะเป็น *PAP1* เนื่องจากพบแถบของดีเอ็นเอจำนวน 4 ชิ้น ได้แก่ แถบของเวคเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 2800 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด *PAP1* ด้วย *Eco*T14I

อย่างไรก็ตามได้คัดเลือกโคลนหมายเลข 1 ซึ่งคาดว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่น่าจะเป็น *PAP2* นำไปทดลองในขั้นตอนต่อไปได้ จากการศึกษาโดยถ่ายโอนยีน *PAP1* หรือ *PAP2* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CaMV 35S และเทอร์มิเนเตอร์จากยีนที่กำหนดรหัสของ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxidase เข้าสู่ยาสูบ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* มีการผลิตแอนโทไซยานินมากกว่า ต้นที่ได้รับยีน *PAP1* (Blount; et. al. 2000)

แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากพลาสมิด yT&A หมายเลข 1 ซึ่งคาดว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่น่าจะเป็น *PAP2* และทำให้ชิ้นดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์ ตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

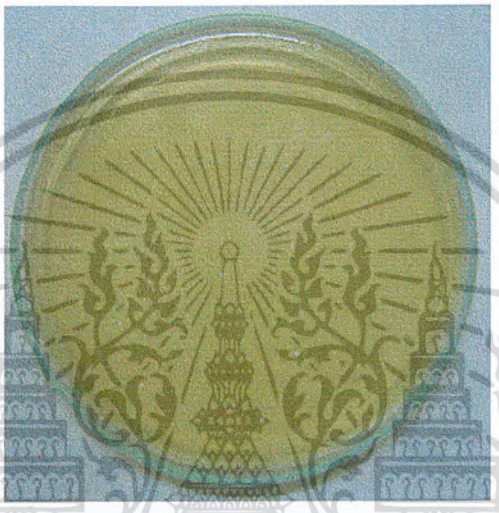


รูปที่ 11 ผลการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าน่าจะเป็น *PAP2* ออกจากพลาสมิด yT&A
(1 คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าน่าจะเป็น *PAP2* ซึ่งได้จากโคลนของพลาสมิดหมายเลข 1
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

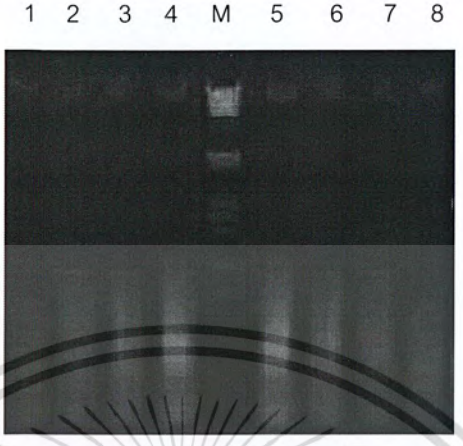
4.2.1 ผลการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็น *PAP2* กับเวคเตอร์ pHTT202 เข้าสู่ *E. coli* และการคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าน่าจะได้รับ พลาสมิด pHTT202 โดยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เนื่องจากในพลาสมิดมียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิดนี้อยู่ ได้ผลดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 โคโลนีของ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็น *PAP2* กับเวคเตอร์ pHTT202 บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน

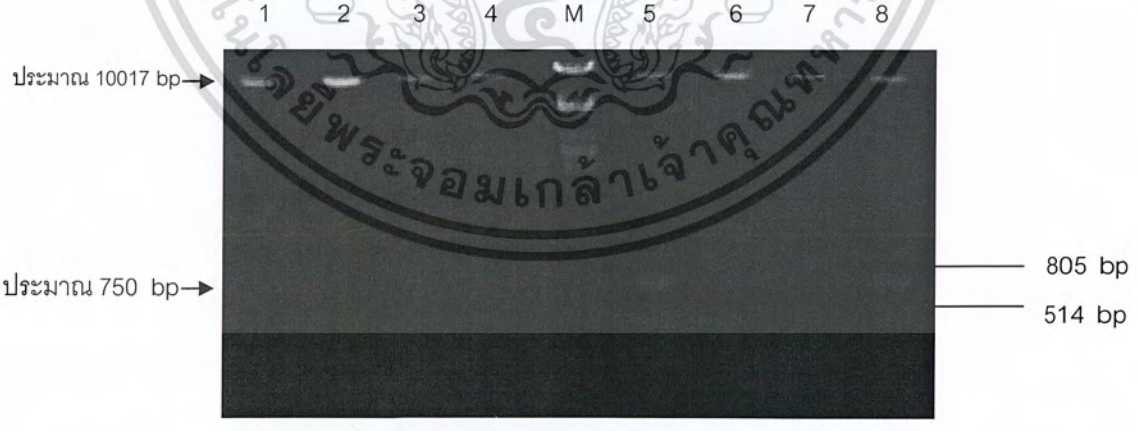
คัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่คาดว่าน่าจะมีพลาสมิด pHTT202 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ ตรวจผลการสกัดพลาสมิดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 ผลการสกัดพลาสมิด pHTT202 จากโคลนที่สามารถเจริญบนเพลตที่มีอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน
(1-8 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

การคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 14

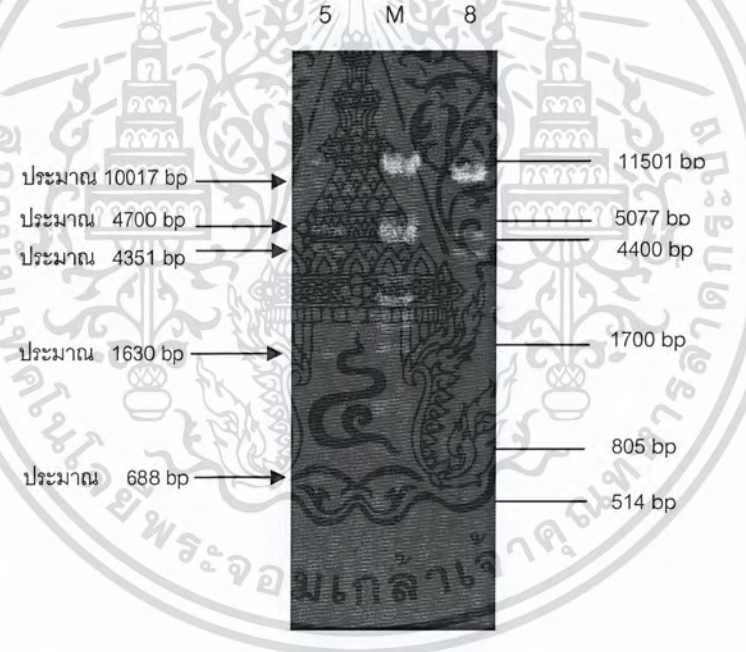


รูปที่ 14 ผลการตัดพลาสมิด pHTT202 ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่
(1-8 คือ โคลนของพลาสมิด pHTT202 ซึ่งเป็นหมายเลขเดิมกับรูปที่ 17 ที่ตัดด้วย *Bam*HI
M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการตัดพลาสมิดด้วย *Bam*HI พบว่าโคลนหมายเลข 5 และ 8 มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ *PAP* ที่มีข้อมูลอยู่ใน GenBank รวมถึงชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 4.1.7 ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้คาดว่าเป็น *PAP2* ดังนั้นโคลนหมายเลข 5 และ 8 จึงน่าจะเป็นพลาสมิด pHTT202 ที่มี *PAP2* แทรกอยู่

4.2.2 คัดเลือกพลาสมิด pHTT202 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง (sense) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Pst*I ตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 ผลการตัดพลาสมิด pHTT202 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็น *PAP2* ด้วย *Hin*dIII และ *Pst*I เพื่อคัดเลือกพลาสมิด ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง
(5 และ 8 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิด pHTT202 ที่น่าจะมี *PAP2* แทรกอยู่ ซึ่งเป็นหมายเลขเดิมกับรูปที่ 14 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลของ GenBank *PAP2* ไม่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Pst*I แต่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Hin*dIII ที่เบสลำดับที่ 235 ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ซึ่งมีขนาด 235 และ 515 คู่เบส เมื่อ *PAP2* แทรกอยู่ในพลาสมิด pHTT202 ถ้าตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ จะสามารถคัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง หรือไม่ถูกต้องได้ โดย pHTT202 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่อย่างถูกต้อง เมื่อตัดด้วย *Hin*dIII และ *Pst*I จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 506, 688, 1204, 1630, 2388 และ 4351 คู่เบส แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่มีทิศทางไม่ถูกต้องเมื่อตัดแล้วจะได้ 506, 688, 1484, 1630, 2108 และ 4351 คู่เบส

จากการตัดโคลนหมายเลข 5 และ 8 ปรากฏว่าไม่ได้ชิ้นดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุ 2 ประการ คือ

- เอนไซม์ *Hin*dIII และ *Pst*I ที่ใช้อาจเสียสภาพทำให้เกิดการตัดที่ไม่สมบูรณ์
- ชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ในขั้นตอนก่อนหน้านี้ไม่ใช่ *PAP2* ตามที่คาดไว้

ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pHTT202 ได้

4.2.3 สร้างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุม เนื่องจากไม่สามารถตรวจสอบทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pHTT202 จึงไม่ได้ถ่ายโอนพลาสมิดนี้เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม แต่ได้ทำการศึกษาการสร้างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมโดยใช้เวคเตอร์ pBI121 ที่มียีน *NPT II* ซึ่งให้เอนไซม์นีโอไมซิน ฟอสโฟทรานส์เฟอเรส และยีน *GUS* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์พืชที่รุนแรง (35S) เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมดิสอาร์มสายพันธุ์ LBA4404

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

จากการทดลองใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมที่ได้สร้างขึ้นในข้อ 4.2.3 เมื่อจุ่มใบยาสูบที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ลงในสารละลายแขวนลอยของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เป็นเวลา 60 วินาที โดยทำการทดลองทั้งหมด 36 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ใบ

ต้นพืชที่เจริญได้จากชิ้นส่วนของใบ เมื่ออยู่ในอาหารชักนำให้เกิดยอดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งอาหารนี้มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลินเพื่อฆ่าอะโกรแบคทีเรียม และยาปฏิชีวนะคานามัยซิน เพื่อคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน สามารถแบ่งต้นพืชได้ 2 ลักษณะ ได้แก่ ต้นพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้นและใบมีสีเขียวเมื่อเทียบกับต้นควบคุมที่เลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่มียาปฏิชีวนะและมีอายุเท่ากัน ต้นที่มีความสมบูรณ์นี้ คาดว่าเป็นต้นที่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของ T-DNA ซึ่งมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะคานามัยซิน และต้นพืชที่มีส่วนของลำต้นและใบเป็นสีเหลือง เมื่อเทียบกับต้นควบคุม ซึ่งคาดว่าเป็นต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของ T-DNA จากทั้งหมด 36 ซ้ำ มีเพียง 1 ซ้ำที่ต้นพืชซึ่งเจริญจากใบ มีทั้งต้นที่สมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ ส่วนอีก 35 ซ้ำ ต้นพืชที่เจริญไม่มีความสมบูรณ์ทุกต้น ดังรูปที่ 16

รูปที่ 16 ต้นยาสูบที่ได้จากการศึกษาการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียมที่มี pBI121 (ต้นควบคุม (1) ต้นที่คาดว่าไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน (2) และต้นที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน (3))

อย่างไรก็ตามต้นที่มีลักษณะต้นสมบูรณ์ อาจจะไม่ได้เกิดจากการได้รับยีนต้านทานยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แต่อาจเกิดจากการที่ต้นพืชไม่ได้สัมผัสกับอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินโดยตรง แต่ได้รับอาหารจากต้นพืชที่อยู่ข้างเคียง ดังนั้นควรทำการตรวจสอบโดยการตัดชิ้นส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของต้นพืชไปจุ่มในสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-gluc) หากต้นพืชได้รับ T-DNA ซึ่งมีทั้งยีนต้านทานยาปฏิชีวนะคานามัยซิน และยีน *GUS* อยู่ จะสามารถผลิตเอนไซม์ GUS ซึ่งจะย่อยพันธะของ X-gluc ทำให้โมเลกุล X หลุดออกมาเกิดเป็นสีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

จากการโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินจาก cDNA ของอะราบิดอบซิสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ร่วมที่สามารถทำให้ชิ้นดีเอ็นที่ได้จากการทำพีซีอาร์ครอบคลุมบริเวณ ORF ของยีน *PAP1* และ *PAP2* แล้วเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับเวคเตอร์ yT&A เพื่อเพิ่มจำนวน และตรวจสอบโคลน พบว่าได้โคลนที่คาดว่าเป็น *PAP1* จำนวน 1 โคลน และ *PAP2* จำนวน 4 โคลน จากโคลนทั้งหมด 19 โคลน

5.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

ได้โคลนของเวคเตอร์ pHTT202 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ 2 โคลน แต่ไม่สามารถตรวจสอบทิศทางการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอได้ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุ 2 ประการ คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ได้แก่ *Hin*dIII และ *Pst*I อาจเสียสภาพ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้ไม่ใช่ *PAP2*

5.3 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม

จากการศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมดิสอาร์มสายพันธุ์ LBA4404/pBI121 ที่ภายใน T-DNA มียีนต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซิน และยีน *GUS* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์พืชที่รุนแรง (CaMV 35S) ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้ใบพืชทั้งหมด 36 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 1 ตัวอย่าง ที่ต้นพืชบางต้นซึ่งเจริญจากตัวอย่างนั้น มีความสมบูรณ์เมื่อเทียบกับต้นพืชที่ได้จากคอนโทรลซึ่งเจริญมาจากใบที่ไม่ได้ทำการทดลอง และเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกันแต่ไม่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินและคาร์เบนิซิลิน การคัดเลือกโดยใช้ยาปฏิชีวนะคานามัยซินเป็นการคัดเลือกเบื้องต้น ซึ่งต้นพืชที่มีความสมบูรณ์ อาจเกิดจากการที่ได้รับ T-DNA เข้าไปอยู่ในจีโนมแล้วมีการแสดงออกของยีนต้านยาปฏิชีวนะคานามัยซิน หรืออาจเกิดจากไม่ได้สัมผัสกับอาหารซึ่งมียาปฏิชีวนะดังกล่าวโดยตรง แต่อาศัยอาหารจากต้นพืชข้างเคียงในการเจริญ ควรมีการทดสอบโดยอาศัยคุณสมบัติของยีน *GUS* อย่างไรก็ตามควรทำการทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชิ้นส่วนของพืชได้รับการถ่ายโอนยีนมากที่สุด เช่น ความเข้มข้นของเชื้อ และเวลาที่เชื้อสัมผัสกับชิ้นส่วนพืช เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Blount, J., Borevitz, J., Dixon, R., Lamb, C. and Xia, Y.2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. The plant cell.12.2383-2393.

Blundell,T., Bolognesi-Winfield, A., Davison, P., Esch, J., Gray, J., James, C., Marks, M., Srinivasan, N. and walker, A.1999. The Transparent Testa Glabra 1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis, encodes a WD40 protein. The plant cell.11.1337-1349

Caboche, M., Debeuejon, I., Jond, C., Lepiniec, L. and Nesi, N.2000. The *TT8* gene encodes a basic-helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in Arabidopsis siliques. The plant cell.12.1863-1878.

Cornish, E. and Holton, T.1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin Biosynthesis. The plant cell.7.1071-1083.

Martin, C. and Paz-Ares, J. 1997. MYB transcription factors in plants. Trends in Genetics. 13(2). 67-73.

Winkle-Sharley, B.2001.Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics , Biochemistry and biotechnology. Plant physiology.126.485-493.

กนกพร สมพรไพลิน.2545. ผลของซีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมสีในพืช. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 10(1). 23-27

กนกพร สมพรไพลิน. 2545. บทปฏิบัติการวิชาพันธุวิศวกรรม. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กนกพร สมพรไพลิน. 2546. บทปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช เรื่อง การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ของต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. [ม.ป.ป.] การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ The Determination of Flavonoid. [ม.ป.ท.]

http://rice.kps.ku.ac.th/lesson/Molecular/Chapter8.html

http://www.geocities.com/sriboon2001/juntima/ch2.htm

http://www.mgz-muenchen.de/ glossar.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	5	กรัม/ลิตร
NaCl	10	กรัม/ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YEB

Bacto beef extract	5	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	1	กรัม/ลิตร
Bacto peptone	5	กรัม/ลิตร
Sucrose	5	กรัม/ลิตร
$MgSO_4$	2	มิลลิโมลาร์

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2XYT

Bacto tryptone	16	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	10	กรัม/ลิตร
NaCl	10	กรัม/ลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto tryptone	2	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	0.5	กรัม/ลิตร
NaCl	0.0585	กรัม/ลิตร
KCl	0.0186	กรัม/ลิตร
$MgCl_2$	10	มิลลิโมลาร์
$MgSO_4$	10	มิลลิโมลาร์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1	ลิตร
กลูโคส เข้มข้น 2 โมลาร์	10	มิลลิลิตร

6. อาหารชักนำให้เกิดแคลลัสของยาสูบ (กนกพร, 2546)

อาหารสูตร MS เติม	Adenine	40	มิลลิกรัมต่อลิตร
	MES	0.5	กรัมต่อลิตร
	ซูโครส	20	กรัมต่อลิตร
	BAP	1	มิลลิกรัมต่อลิตร
	IAA	0.1	มิลลิกรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 5.7

7. อาหารชักนำให้เกิดยอดของยาสูบ (กนกพร, 2546)

อาหารชักนำให้เกิดแคลลัสแต่ปราศจาก IAA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ขั้นตอนการทดลอง

1. **การแยกดีเอ็นเอจากเจล** (Amersham Biosciences Corp.)
   1.1. ทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟริซิสเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วตัดเจลส่วนที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้นใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟ
   1.2. เติม capture buffer ลงในหลอดจากข้อ 1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตร ต่อเจล หนัก 10 มิลลิกรัม
   1.3. บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด
   1.4. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบต่ำที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ของเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน
   1.5. ย้ายของเหลวในหลอดเอพเพนดรอฟไปใส่ในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ (GFX column) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
   1.6. นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์
   1.7. เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
   1.8. ย้ายจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟหลอดใหม่ แล้วเติมน้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตรประมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดกับคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
   1.9. นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ที่ใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
   1.10. นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอดเอพเพนดรอฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. **การทำคอมพีเทนท์เซลล์** (กนกพร, 2545)

2.1. ถ่ายเชื้อ *E. coli* 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 rpm

2.2. ถ่ายเชื้อ จากข้อ 1 ลงในอาหาร 2XYT ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เชื้อปริมาตรเท่ากับ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.4-0.5

2.3. นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.4. เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.5. วางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.6. เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอดบนน้ำแข็ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

2.7. เติม DMSO 30 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันดี

2.8. แบ่งเซลล์แขวนลอยลงในหลอดเอพเพนดรอฟ หลอดละ 200 ไมโครลิตร

2.9. เก็บเซลล์ที่ -70 องศาเซลเซียส

3. **การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์โดยวิธี** heat-shock **และการคัดเลือกโคลน** (Promega, Co., Ltd.)

3.1. การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์

3.1.1. นำคอมพีเทนท์เซลล์ซึ่งเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส มาละลายโดยการวางบนน้ำแข็ง

3.1.2. ดูดคอมพีเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเอพเพนดรอฟซึ่งแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม ligation solution และผสมให้เข้ากันโดยการปิเปตขึ้นลง วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3. นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

3.1.4. เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2. การคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิด yT&A ที่มีซิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่

3.2.1. เตรียมเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วสเปรดด้วย IPTG และ X-gal ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายปริมาตร 2.5 และ 1000 ไมโครกรัม ตามลำดับ สเปรดเซลล์แขวนลอยที่เหลือบนเพลตที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

4. **การสกัดพลาสมิด** (Promega, Co., Ltd.) มีขั้นตอนดังนี้

4.1. ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวบนเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และสเปรดด้วย IPTG และ X-gal ลงในอาหารเหลว LB ที่เติมแอมพิซิลิน ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm

4.2. นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ใส่หลอดเอพเพนดรอฟ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเซลล์

4.3. เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้ง โดยใช้ TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นวางหลอดบนน้ำแข็ง

4.4. เติม solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที

4.5. เติม solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที

4.6. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.7. ย้ายของเหลวส่วนบนไปใส่หลอดเอพเพนดรอฟใหม่ แล้วเติมเอทานอลเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

4.8. นำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที

4.9. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง

4.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

4.11 นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.12 เทเอทานอลออก แล้วทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูหรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้เดซิเคเตอร์

4.13 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งมี RNase เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.14 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมเชื้อและถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมโดยวิธี Freeze thaw (กนกพร, 2546)

5.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในอาหารเหลวสูตร YEB หรือ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งมียาปฏิชีวนะ โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

5.2 นำสารละลายเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาวางบนน้ำแข็ง 10 นาที

5.3 นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3500 rpm 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.4 เทอาหารส่วนบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาละลายในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง

5.5 นำเซลล์แขวนลอยในแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่และผสมพลาสมิดซึ่งมียีนที่สนใจประมาณ 2 ไมโครกรัมโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง บนน้ำแข็ง

5.6 นำสารละลายนี้แช่ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นน้ำแข็ง แล้วนำมาไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นเติมอาหาร YEB 1 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm นาน 4 ชั่วโมง

5.7 นำสารละลายดังกล่าวไปปั่นด้วยความเร็ว 3500 rpm 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.8 เทอาหารส่วนบนทิ้งไป ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยอาหารสูตร YEB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

5.9 สเปรดเซลล์บนอาหารแข็งสูตร YEB ที่มียาปฏิชีวนะ

6. การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียม (กนกพร, 2546)

6.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียมดิสอาร์มสายพันธุ์ LBA4404/pBI121 ที่มียีน *NPT II* ซึ่งให้เอนไซม์นีโอไมซินฟอสโฟทรานส์เฟอเรส และยีน *GUS* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์พืชที่รุนแรง (35S) ในอาหารเหลวสูตร YEB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน นาน ข้ามคืน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ในอาหารเหลวสูตร YEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรประมาณ 0.8

6.3 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

6.4 เทส่วนอาหารทิ้งไป แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลายซึ่งมีซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ และ Tween-80 0.5 เปอร์เซ็นต์

6.5 นำใบของต้นยาสูบที่ปราศจากเชื้อมาทำให้เกิดบาดแผลโดยตัดให้เป็นชิ้น และจุ่มในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.3.4 เป็นเวลา 60 วินาที

6.6 นำชิ้นส่วนของพืชดังกล่าววางบนเพลตที่มีกระดาษทิชชูซึ่งปราศจากเชื้อเพื่อกำจัดอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินออก

6.7 วางชิ้นส่วนของพืชบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส (ภาคผนวก ก)

6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากบ่มเนื้อเยื่อไว้ประมาณ 2-3 วัน อะโกรแบคทีเรียมจะย้ายส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ตรงบริเวณรอยตัดของพืช และ T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพืช

6.9 ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสที่สามารถฆ่าอะโกรแบคทีเรียมได้

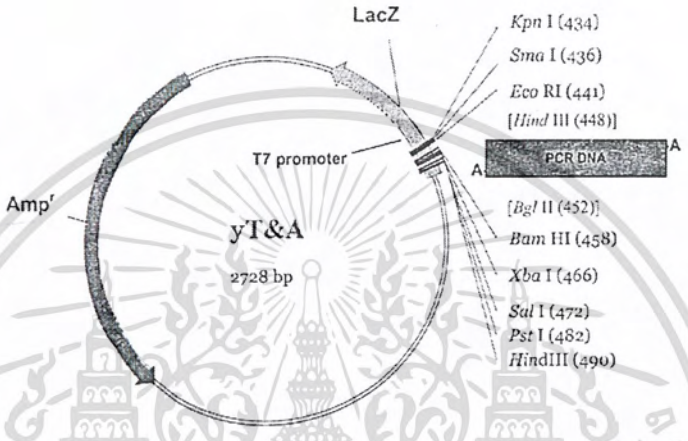
6.10 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมงและมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์

6.11 ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารชักนำให้เกิดยอดที่สามารถฆ่าอะโกรแบคทีเรียมและคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

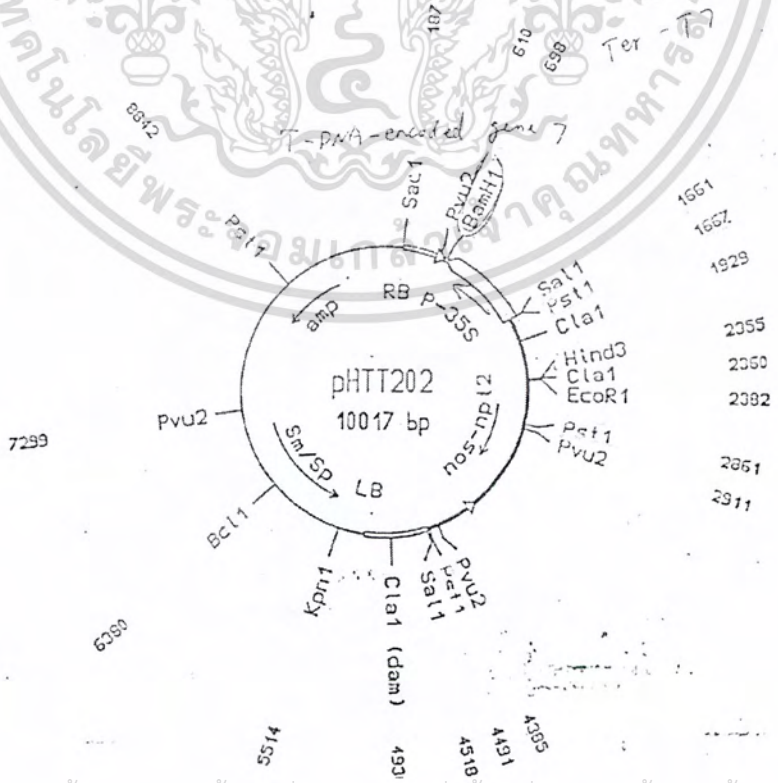
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
เวคเตอร์

1. yT&A (Yeastern Biotech, Co.,Ltd.)

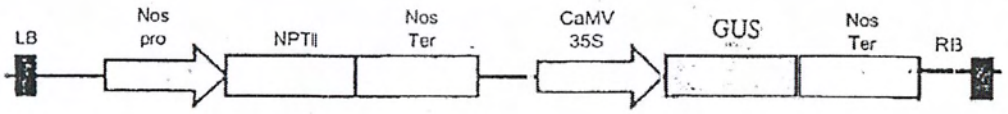


2. pHTT202



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ส่วน T-DNA ของพลาสมิด pBI121



RB : right border, nos-pro : nopaline synthase gene promoter, NPTII : neomycin phosphotransferase coding gene, nos-ter : nopaline synthase gene, CaMV35S : cauliflower mosaic virus 35S promoter, GUS : β-Glucurondase coding gene, LB: left border

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้