

ผลกระทบของความเครียดจากความเค็มและความแห้งแล้งต่อชีวสังเคราะห์  
ฟลาวोनอยด์ในต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม  
Effect of Salt and Drought stresses on the Flavonoid Biosynthesis in  
Transgenic Tobaccos



T104411



เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน...104411  
วัน,เดือน,ปี... - 2 พ.ย. 2552

421 39580

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Effect of Salt and Drought stresses on the Flavonoid Biosynthesis in  
Transgenic Tobaccos**



**A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIRMENT FOR DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
IN BIOTECHNOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
ACADEMIC YEAR 2008**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ ผลกระทบของความเครียดจากความเค็มและความแห้งแล้งต่อ  
ชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม  
Effect of Salt and Drought stresses on the Flavonoid  
Biosynthesis in Transgenic Tobaccos

ชื่อนักศึกษา สุธินาฏ เค้นวาทัญญู รหัสนักศึกษา 48050173  
เสาวนีย์ สุวรรณเบญจกุล รหัสนักศึกษา 48050175

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต  
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพฑิณ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้  
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชา  
เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2551

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. วรภัทร์ สวงนไชยไพ้วงศ์	วรภัทร์ สวงนไชยไพ้วงศ์
ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพฑิณ	กนกพร สมพรไพฑิณ
ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล

สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม  
(ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	ผลกระทบของความเครียดจากความเค็มและความแห้งแล้งต่อ ชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม	
ชื่อนักศึกษา	สุชินาฏ	เด่นวาทัญญ
	เสาวนีย์	สุวรรณเบญจกุล
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
ปีการศึกษา	2551	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพลิน	

### บทคัดย่อ

ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มสารทุติยภูมิที่ตอบสนองการชักนำต่อความเครียดหลายชนิด ในการทดลองนี้ได้โคลนและถ่ายโอนยีน *TT3* ถอดรหัสเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) ซึ่งเกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในอะราบิดอปซิส เข้าสู่ต้นยาสูบ ทำการเพาะเลี้ยงต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *TT3* ภายใต้สภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน เทียบกับต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *TT7* และ *TT8* ต้นยาสูบทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงกับสภาวะความเครียดทั้งสองได้แสดงให้เห็นถึงความเสื่อมลงของการตรวจสอบปัจจัยทางสรีรวิทยา คือ รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืช (คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีนอยด์) และมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA; ผลิตภัณฑ์ของลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน) ภายใต้เงื่อนไขสภาวะความเครียดทั้งสอง ต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ได้แสดงถึงความคงตัวของปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืช และปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (เฟลวาโนน เฟลวอน เฟลวานอล และแอนโทไซยานิน) ที่ดีกว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ ดังนั้นปริมาณสารที่เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และน้ำตาลแมนนิทอล อาจมีประสิทธิภาพการปกป้องสภาวะเครียดในพืช

<b>Title</b>	Effect of Salt and Drought stresses on the Flavonoid Biosynthesis in Transgenic Tobaccos
<b>Students</b>	Sutinat Denvathanyoo Saowanee Suwanbenjakun
<b>Degree</b>	Bachelor of Science
<b>Major</b>	Biotechnology
<b>Academic Year</b>	2008
<b>Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Kanokporn Sompornpailin

### ABSTRACT

Flavonoids are a group of secondary plant metabolites induced response to various stresses. In this experiment, *TT3* gene encoding dihydroflavonal reductase (DFR) involved in flavonoid biosynthesis from *Arabidopsis thaliana* was cloned and transform into tobacco. The transgenic tobacco containing *TT3* gene were treated with 100 mM NaCl and 100 mM mannitol for 7 days in comparing with wild type and tobacco transformed with *TT7* and *TT8* gene. All tobacco treated with both stresses showed the deteriorations of physiological parameters detected as photosynthetic pigments (chlorophyll A chlorophyll B carotenoid) and malondialdehyde (MDA; product of lipid peroxidation). Under both stress condition, transgenic tobaccos with flavonoid biosynthetic genes showed better in the stabilization of photosynthetic pigments and also higher producing several flavonoid substances (flavanone, flavone, flavonol and anthocyanin) than that of wild type. Thus these substances should have potential in salt and mannitol stress protections in plant.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจากบุคคลหลายฝ่าย ดังนั้นจึงขอแสดงความขอบคุณทุกท่าน ดังมีรายนามต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. กนกพร สมพรไพฑูริย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ให้ทั้งความรู้ ความช่วยเหลือ คำชี้แนะ รวมทั้งให้หลักการและข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อศิษย์

ขอขอบพระคุณ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการและ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาคทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบพระคุณ พี่สุธิ ชูดีไพจิตร พี่อรอุมา เกตุชาติ พี่ชนนิกานต์ ขวัญช่วย และพี่สุภา การถาง ที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัยและให้คำปรึกษา ตลอดจนการทำโครงการนี้

คณะผู้จัดทำโครงการ ขอขอบพระคุณบุคคลดังกล่าวเป็นอย่างยิ่ง ตลอดจนบุคคลที่ให้ความช่วยเหลือ และคำปรึกษาที่มีได้กล่าวมาแล้ว ในที่นี้ด้วย และหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานโครงการฉบับนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับท่านที่ต้องการศึกษาค้นคว้าต่อไป

สุธินาฏ เต็มวาทัญญ

เสาวนีย์ สุวรรณเบญจกุล

เมษายน 2552

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ต้นยาสูบ	4
2.2 เฟลไวโนอยด์	5
2.3 อนุพันธ์ของเฟลไวโนอยด์	5
2.4 ชีวสังเคราะห์ของเฟลไวโนอยด์	7
2.5 การควบคุมชีวสังเคราะห์เฟลไวโนอยด์	8
2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมเฟลไวโนอยด์ในพืช	12
2.7 การโคลนยีน	12
2.8 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส	16
2.9 กลไกการเสียหายจากการที่ลิพิดถูกออกซิไดซ์	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
3.1 อุปกรณ์	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 วิธีการทดลอง	19
3.2.1 การโคลนยีน	19
3.2.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA440	23
3.2.3 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้ อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA440	23
3.2.4 ศึกษาผลของเครียดจากความเค็มและความแห้งแล้งที่มีต่อการแสดง ออกของพืชทดลอง	24
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล</b>	<b>26</b>
4.1 การโคลนยีน	26
4.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ <i>DFR</i>	26
4.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ pBI121 และถ่ายโอนยีนส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ <i>E. coli</i>	27
4.1.3 การตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ใน ในพลาสมิด pBI121	30
4.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	34
4.2.1 การตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย	34
4.3 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย	35
4.3.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย และศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน	35
4.3.2 คัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน	36
4.4 ศึกษาผลความเครียดจากความเค็มและความแห้งแล้งที่มีต่อการแสดงออก ของต้นยาสูบทดลอง	38
4.4.1 การเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง	39
4.4.2 การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในต้นยาสูบ	41
4.4.3 การผลิตสารกลุ่มฟีนอลิกของต้นพืชทดลองที่ตอบสนองต่อความ เครียดทางความเค็มและความแห้งแล้ง	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง	48
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	51
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลอง	53



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ยีนโครงสร้าง <i>Transparent Testa (TT)</i> และ <i>Tannin Deficient Seed (TDS4)</i> ของข้าวสังเคราะห์เพลโนอยด์	13



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	4
2.2	5
2.3	6
2.4	6
2.5	9
2.6	14
2.7	17
3.1	23
4.1	26
4.2	27
4.3	28
4.4	28
4.5	29
4.6	29
4.7	30
4.8	31
4.9	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.10	การสอดแทรกอย่างถูกทิศทาง (sense) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> บนเวกเตอร์ pBI121 (ก) และการแทรกอย่างกลับทิศทาง (antisense) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> บนเวกเตอร์ pBI121 (ข)	33
4.11	ผลการตรวจสอบการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pBI121 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> โคลนที่ 3.5, 3.7, 3.19, 3.29 และ 9.2 มีการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> อย่างถูกทิศทาง โคลนที่ 3.2 เกิดการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> อย่างกลับทิศทาง	34
4.12	การเจริญและพัฒนาของแคลลัสบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	35
4.13	ลักษณะยอดของต้นยาสูบที่เจริญมาจากแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> (ก) และยอดของต้นยาสูบที่เจริญมาจากแคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> (ข)	36
4.14	ผลการสกัดดีเอ็นเอของต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมของยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> โคลนที่ 1 ถึง 28 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)	37
4.15	ผลการทำพีซีอาร์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โครงสร้าง <i>DFR</i> โคลนที่ 1 ถึง 28 และต้นปกติ (N)	38
4.16	ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงที่ได้จากการสกัดของต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมจากยีน ( <i>F3'H</i> , <i>DFR</i> และ <i>TT8</i> ) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	40
4.17	ปริมาณสาร MDA ในสารสกัดจากต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมจากยีน ( <i>F3'H</i> , <i>DFR</i> และ <i>TT8</i> ) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	41
4.18	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตรของสารแนรินเจนิน ที่สกัดได้จากต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมจากยีน ( <i>F3'H</i> , <i>DFR</i> และ <i>TT8</i> ) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียม คลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็น	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
เวลา 7 วัน	42
4.19 ผลการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 336 และ 350 นาโนเมตร ของสารอะพิจินิน (ก) และสารลูทีโอลิน (ข) ที่สกัดได้จากต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจากยีน ( <i>F3'H</i> , <i>DFR</i> และ <i>TT8</i> ) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	43
4.20 ผลการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 368 และ 374 นาโนเมตร ของสารเคเอ็มพี-รอล (ก) และสารเคเวอร์เซติน (ข) ที่สกัดได้จากต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจากยีน ( <i>F3'H</i> , <i>DFR</i> และ <i>TT8</i> ) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	45
4.21 ผลการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 535 นาโนเมตร ของเพลา-โกนินิน(ก) และสารไซยานินิน (ข) ที่สกัดได้จากต้นยาสูบปกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจากยีน ( <i>F3'H</i> , <i>DFR</i> และ <i>TT8</i> ) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน	46

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงการพิเศษ

เฟลโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenol) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) พบทั่วไปในพืช มีความสำคัญในกระบวนการทางชีววิทยา โดยเป็นรงควัตถุในดอกไม้และผลไม้ ดึงดูดการผสมเกสรเพื่อการขยายพันธุ์พืช นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันรังสียูวี และต้านทานโรค (Bovy และคณะ, 2004) เฟลโวนอยด์ยังมีความสำคัญกับมนุษย์ เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถบำบัดโรคที่เกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ แผลในกระเพาะอาหาร มะเร็ง และตับติดเชื้อ เป็นต้น (Gallego และคณะ, 2007)

เฟลโวนอยด์ทำหน้าที่หลายอย่างในพืช ได้แก่ หน้าที่เป็นรงควัตถุ โดยกรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจงที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระออกไป หรือทำหน้าที่เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ (antioxidant) โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นแล้วออกไป Martens และ Mithofer (2007) สามารถจำแนกเฟลโวนอยด์ได้มากกว่า 9,000 ชนิด และยังคงมีรายงานเพิ่มขึ้น

ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของเฟลโวนอยด์แบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ยีนโครงสร้าง (structural gene) ที่ทำหน้าที่ในการถอดรหัสและแปลรหัสให้เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในชีวสังเคราะห์ และยีนควบคุม (regulatory gene) จะให้โปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง (กนกพร, 2545) ยีนควบคุมของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ที่ศึกษากันมากคือกลุ่มของยีน *Transparent Testa* (TT) เช่น *Transparent Testa Glabra 1* (TTG1) TT2 และ TT8 ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง เช่น *Dihydroflavonol -4-reductase* (DFR) และ *BANYULS* (BAN) ยีน DFR เกี่ยวข้องในการสร้างเอนไซม์เพื่อสังเคราะห์สารกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ยีน BAN เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ของโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) และยีนโครงสร้าง TT7 ถอดรหัสและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) (Schoenbohm และคณะ, 2000) ยีน TT8, TTG1 และ TT2 เป็นยีนในกลุ่มโปรตีน basic helix-loop-helix (bHLH), WD-repeat (WDR) และ MYB ตามลำดับ (Caboche และคณะ, 2001) ซึ่ง MYB และ bHLH ทำงานร่วมกันในการถอดรหัสของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น ความเค็ม และความแห้งแล้ง (Ithal และ Reddy, 2004)

ในโครงการพิเศษนี้ทำการศึกษาผลกระทบของความเค็ม และความแห้งแล้งที่มีต่อการแสดงออกของยีนจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในพืชทดลอง

## 1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพิ่มจำนวนยีน โครงสร้าง *DFR* จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์โดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อสร้างเวกเตอร์สำหรับแสดงออกในต้นยาสูบทดลอง
2. ศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีน โครงสร้าง *DFR* จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เข้าสู่ต้นยาสูบทดลอง
3. ศึกษาผลของความเค็ม และความแห้งแล้งต่อการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในต้นยาสูบทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุม *TT8* ยีนโครงสร้าง *F3'H* และ *DFR* ในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

## 1.3. ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาการสร้างเวกเตอร์ที่มียีน โครงสร้าง *DFR* จากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เข้าสู่ต้นยาสูบทดลอง รวมถึงผลของสภาวะความเครียดจากความเค็ม และความแห้งแล้งที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในต้นยาสูบทดลอง

## 1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถตัดต่อยีน โครงสร้าง *DFR* เข้าสู่เวกเตอร์ pBI121
2. สามารถถ่ายโอนยีน โครงสร้าง *DFR* เข้าสู่ต้นยาสูบทดลองโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404
3. สามารถคัดเลือกต้นยาสูบทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โครงสร้าง *DFR*
4. เปรียบเทียบผลของสภาวะเครียดจากความเค็ม และความแห้งแล้งที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ในต้นยาสูบทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกับต้นยาสูบควบคุม

## 1.5. ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การโคลนยีน โครงสร้าง *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์
  - 1.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมและตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส
  - 1.2 เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ *yT&A* และถ่ายโอนเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่เชื่อมกับชิ้นดีเอ็นเอ
  - 1.3 คัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่คาดว่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่
  - 1.4 สกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือก แยกชิ้นดีเอ็นเอ และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ
2. การเชื่อมต่อและตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ pBI121

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.1 เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* เข้าสู่เวกเตอร์ pBI121 และถ่ายโอนเข้าสู่เชื้อ *E. coli* เพื่อคัดลอกและเพิ่มปริมาณพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่
- 2.2 คัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่อย่างถูกต้องทิศทาง (sense)
3. ขั้นตอนการถ่ายโอนยีนโครงสร้าง *DFR* เข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404
  - 3.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 ในอาหารเหลว
  - 3.2 ถ่ายโอนยีนโครงสร้าง *DFR* ที่มีการแทรกอย่างถูกต้องทิศทางกับเวกเตอร์ pBI 121 เข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404
4. ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบทดลองโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404
  - 4.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ต้องการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบทดลองในอาหารเหลว
  - 4.2 นำต้นยาสูบทดลองมาทำการถ่ายโอนยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404
  - 4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีนโครงสร้าง *DFR* เข้าสู่ต้นยาสูบทดลอง
5. การคัดเลือกต้นยาสูบทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน
6. นำต้นยาสูบทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนมาเลี้ยงในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) หรือน้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์
7. หาความสัมพันธ์ชนิด และปริมาณสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยวิเคราะห์ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) ในต้นยาสูบทดลองเทียบกับต้นยาสูบควบคุม ที่มีผลกระทบของสภาวะความเครียดจากความเค็ม และความแห้งแล้ง โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ( $P \leq 0.05$ ) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16

## บทที่ 2

### หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ต้นยาสูบ



รูปที่ 2.1 ต้นยาสูบ

ที่มา: Derek R., 2006

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Nicotiana tabacum* Linn.

วงศ์: Solanaceae

สกุล: Nicotiana

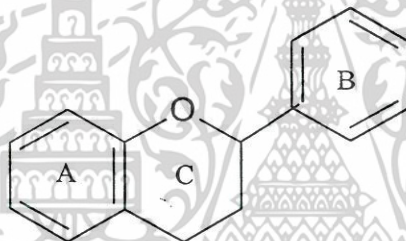
ชนิด: rustica; tabacum

ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) เป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกาใต้ และมีสารนิโคติน (nicotine) ที่มีสูตรทางเคมี  $C_{10}H_{14}N_2$  โดยปกติลำต้นสูงตั้งแต่ 1-2.5 เมตร ใบรียาว ประมาณ 90 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 30 เซนติเมตร ดอกมีหลายสีตาม แต่ชนิด เช่น สีชมพู แดง ขาว และ เหลือง เป็นต้น ส่วนของใบมีสารนิโคติน 0.18-11.00 เปอร์เซ็นต์ นำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์ยาสูบ ทั้งหมด ดอกยาสูบเป็นดอกสมบูรณ์เพศเพราะมีเกสรตัวผู้และตัวเมียในดอกเดียวกัน ดังนั้นจึง สามารถแพร่พันธุ์ได้ด้วยตนเอง โดยไม่ต้องพึ่งพาอาศัยแมลง ต้นยาสูบเจริญเติบโตได้ดีในแทบทุก ภูมิภาคของโลก ปัจจุบันประเทศจีน อเมริกา ตุรกี บราซิล และรัสเซียเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ของโลก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 เฟลโวนอยด์ (flavonoids)

เฟลโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิอยู่ในกลุ่มฟีนอลิก ที่พบได้ในส่วนต่างๆของพืชทั่วไป ซึ่งทำให้เกิดสีต่างๆพบมากในดอก ผล และใบ สารเฟลโวนอยด์เป็นสารให้สีที่ละลายน้ำได้ และเก็บสะสมในแวคิวโอลของพืช (Meer และคณะ, 1993 และ Davies, 2000) เฟลโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน 15 ตัว (Bharti และ Khurana, 2003) จัดเรียงตัวด้วยวงของคาร์บอน 6 อะตอม (วง A และ B) เชื่อมด้วยวงที่มีคาร์บอน 3 อะตอม (วง C) วง A และ B เป็นวงฟีนิล (phenyl ring) วง C เป็นวงแลคโตน (lactone ring) (รูปที่ 2.2) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่วง C ทำให้แยกเฟลโวนอยด์ออกเป็นชนิดต่างๆ เช่น เฟลวาโนน (flavanones) ไอโซเฟลโวน (isoflavones) เฟลโวน (flavones) เฟลโวนอล (flavonols) เฟลวานอล (flavanols) และแอนโทไซยานิน (anthocyanins) โครงสร้างของเฟลโวนอยด์สามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยเอนไซม์ glycosyl transferases เอนไซม์ methyl transferases และเอนไซม์ acyl transferases เป็นต้น (Bovy และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างหลักของเฟลโวนอยด์

ที่มา: Linus Pauling Institute, 2009

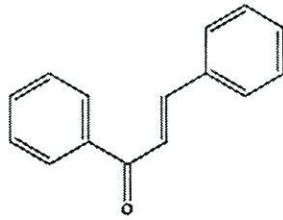
## 2.3 อนุพันธ์ของเฟลโวนอยด์

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่วง C ทำให้มีการแยกเฟลโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มย่อย และการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ที่วง A และ B ทำให้เกิดอนุพันธ์ของเฟลโวนอยด์ชนิดนั้นๆ อนุพันธ์ของเฟลโวนอยด์ที่สำคัญมีดังนี้

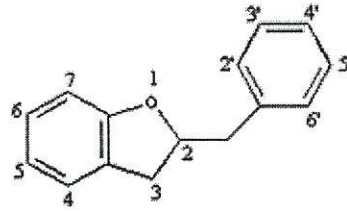
### 2.3.1 แชลโคน (chalcone) และออโรน (aurone) (รูปที่ 2.3)

สารนี้มีโครงสร้างที่วง C แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ เมื่อถูกแอมโมเนียจะเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีแดง จึงเรียกรวมกันว่า แอนโทเชลอร์ (antochlo) แชลโคนให้สีเหลืองเข้ม ได้แก่ สีของดอกโครีออปซิส (Coreopsis) และดอกไม้อื่นๆในวงศ์ Asteraceae (Andersen และ Markham, 2006) ส่วนสารออโรนพบในดอก ใบ เปลือก และเนื้อไม้ให้สีเหลืองทอง เช่น ซัลฟูเรทิน (sulfuretin) ในดอกรักเร่ (*Dahlia spp.*) และฮิสพิดอลกลูโคไซด์ (hispidol glucoside) ในถั่วเหลือง (*Glycine spp.*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(A)



(B)

รูปที่ 2.3 โครงสร้างของแซลโคน (A) และออร์โธน (ตัวเลขแสดงคาร์บอนอะตอม) (B)

ที่มา : Arita Laboratory, 2007

Solvo Biotechnology, 2005

### 2.3.2 เฟลโวน (flavones)

พบเฟลโวนในส่วนของเปลือกต้น แก่น ผล และรากของพืชพวกขนุน (*Artocarpus*) และ หม่อน (*Morus*) พืชที่อยู่ในวงศ์ Moraceae ให้สีเหลืองอ่อนถึงแก่ มีลักษณะเฉพาะคือ มีหมู่ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid unit) ในโมเลกุล พบมากคือ อะพิจินิน (apigenin) และ ลูทีโอลิน (luteolin) รูปที่

2.4

### 2.3.3 เฟลโวนอล (flavonols)

เป็นสารที่ไม่มีสีแต่สามารถดูดกลืนรังสีในช่วงใกล้รังสียูวี ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่แมลงสามารถมองเห็นได้ ดังนั้นเฟลโวนอลจึงมีบทบาทสำคัญในการล่อแมลงเพื่อการผสมเกสร มีความสำคัญต่อพืชยืนต้น ส่วนในพืชล้มลุกนั้นจะพบเฟลโวนอลในปริมาณต่ำ เฟลโวนอลที่พบมากในพืชชั้นสูงได้แก่ เคเอ็มพีรอล (kaempferol) และเคอร์เซทิน (quercetin) และที่พบได้บ้างได้แก่ ไมริเซทิน (myricetin) และไอโซรามาเนติน (isorhamnetin) รูปที่ 2.4



(A)

(B)

รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเฟลโวน (A) เฟลโวนอล (B) อนุพันธ์ทั้งสองเมื่อเปลี่ยนหมู่ R<sub>1</sub> หรือ R<sub>2</sub> จะเปลี่ยนเป็นสารชนิดต่างๆ

ที่มา: Linus Pauling Institute, 2009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.4 แอนโทไซยานิน (anthocyanin) (กนกพร, 2545)

แอนโทไซยานินเป็นสารกลุ่มเม็คสีที่สะสมอยู่ในแวคิลโอลของเนื้อเยื่อดอก และใบของพืช สารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสารส่งสัญญาณของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อแสงยูวีบี การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีรายงานถึงการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่าง เมื่อพืชถูกเชื้อโรครบกวน เช่นเดียวกับในข้าวโพด มีรายงานการสะสมของสารกลุ่มนี้เมื่อถูกหนอนรบกวน และยังมีรายงานว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินกับการเพิ่มความต้านทานหนอนรบกวนในพืชอีกด้วย มีการใช้สารกลุ่มนี้ในทางเภสัชเวชและเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เช่น ให้ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ลดปริมาณคอเลสเตอรอล และต่อต้านการเกิดมะเร็ง

ชีวสังเคราะห์ของแอนโทไซยานินนั้นให้ผลผลิตเป็นสารสีซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย นิยมใช้ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้เป็นต้นแบบสำหรับศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีนและหน้าที่ของยีน โดยเฉพาะการควบคุมการแสดงออกของยีน มีการแยกยีนศึกษาหน้าที่และรูปแบบการแสดงออกของยีนซึ่งได้จากชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในหลายชนิด เช่น อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*) พิทูเนีย (*Petunia*) สแนปดรากรอน (*Snapdragon*)

### 2.4 ชีวสังเคราะห์ของฟลาโวนอยด์ (กนกพร, 2545)

สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์คือ 4-คูมาริล โคอเอ (4-coumaroyl) และ มาโลนิล-โคเอ (malonyl-CoA) (รูปที่ 2.5) โดย 4-คูมาริล โคอเอ ถูกสร้างมาจากฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ในวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) ซึ่งถูกสร้างจากวิถีชีวสังเคราะห์ชิคิเมท (shikimate pathway) ถูกเปลี่ยนให้เป็น 4-คูมาริล โคอเอ 3 ขั้นตอน โดยเอนไซม์ฟีนิลอะลานีน แอมโมเนียไลส (phenylalanine ammonia-lyase) และ ซินนามเมท ไฮดรอกซีเลส (cinnamate-4-hydroxylase) และ 4-คูมาริล โคอเอ ไลเกส (4-coumaroyl ligase) ส่วนมาโลนิล โคอเอถูกสังเคราะห์มาจากการทำปฏิกิริยาระหว่างอะเซทิล โคอเอ (acetyl CoA) กับคาร์บอน ไดออกไซด์ การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์เริ่มด้วยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) เป็นตัวกระตุ้นให้ 4-คูมาริล โคอเอ 1 โมเลกุล รวมกับมาโลนิล โคอเอ 3 โมเลกุล ให้ผลผลิตเป็นสารเนรินเจนิน แคลโคน (2',4',6',4'-tetrahydroxylate naringenin chalcone) มีสีเหลือง ขั้นตอนที่สองเป็นการเกิดไอโซเมอร์ (isomerization) ของสารแคลโคน โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้สารเนรินเจนินฟลาโวนอน (naringenin flavonone) ไม่มีสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone-3-hydroxylase (*F3H*) ให้สารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอล คือ สารไดไฮโดรเคเอ็มพีรอล (dihydrokaempferol) (สารนี้อาจจะได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งต่างๆ โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) และ flavonoid 3', 5'-hydroxylase (*F3'5'H*) และให้สาร กลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอลชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ ไดไฮโดรเคเวอซีทิน (dihydroquercetin) และไดไฮโดรเมอริซีทิน (dihydromyricetin)) ในการเปลี่ยนสารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอลเป็นสารที่มีกลุ่มแอนโทไซยานินนั้นต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด เริ่มจากกระบวนการรีดิวซ์สารกลุ่มนี้ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (*DFR*) และสารกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanidin) ได้แก่ ลิวโคยานิน (leucocyanidin) ลิวโคเพลาโกนิน (leucopelargonidin) และลิวโคเดลฟินิน (leucodelphinidin) ถูกออกซิเดชัน (oxidation) ดีไฮเดรชัน (dehydration) และไกลโคซิลเลชัน (glycosylation) ให้สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งให้เม็ดสีแตกต่างกัน ได้แก่ ไซยานิน (cyanidin) เพลาโกนิน (pelargonidin) และเดลฟินิน (delphinidin) ซึ่งให้สีแดง ส้ม และม่วง ตามลำดับ

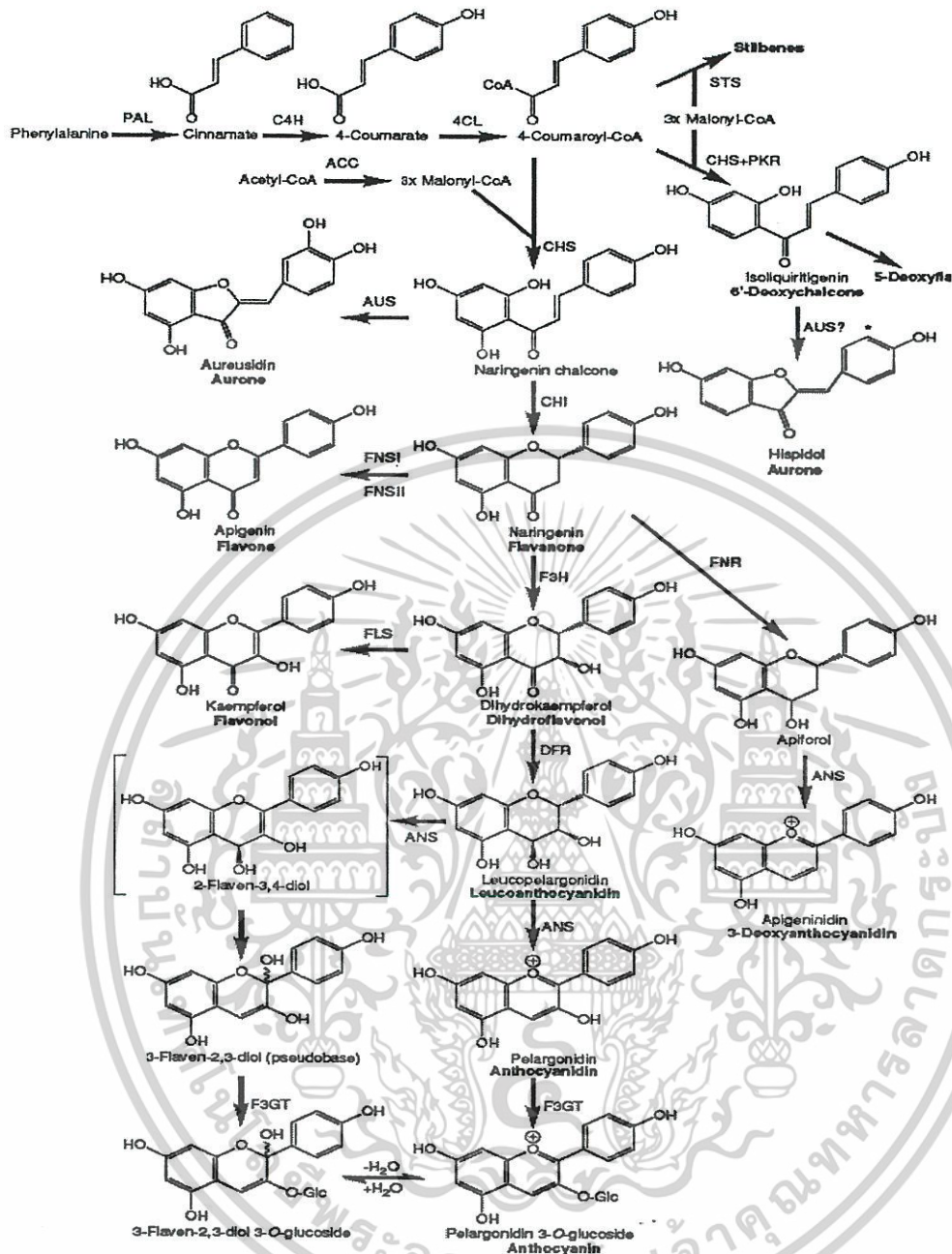
## 2.5 การควบคุมชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

การสังเคราะห์สารกลุ่มเฟลโวนอยด์พืช ประกอบไปด้วการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้อง 2 กลุ่ม คือ ยีนควบคุม (regulatory gene) และ ยีน โครงสร้าง (structural gene)

### 2.5.1 ยีนควบคุม

ยีนควบคุม คือยีนซึ่งจะอยู่ห่างไปบนสาย DNA เดียวกัน มีหน้าที่ควบคุมยีนโครงสร้าง โดยสร้างโปรตีนกดคั้น (repressor protein) ซึ่งสามารถจับกับยีนดำเนินการ (operator gene) สามารถขัดขวางหรือส่งเสริมการทำงานของอาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) เพื่อสร้าง mRNA ซึ่งยีนควบคุมในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่นิยมศึกษาซึ่งให้โปรตีนควบคุม 3 กลุ่ม ได้แก่ MYB, basic helix-loop-helix (bHLH) และ WD40-repeats (WDR) โปรตีนทั้ง 3 กลุ่มนี้เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) ที่มีหน้าที่สำคัญคือ เป็นโปรตีนที่มีบริเวณจับกับดีเอ็นเอหรือโปรตีน (DNA or protein binding domain) เพื่อกระตุ้นหรือยับยั้งให้เกิดการถอดรหัส (DNA activation domain) ในอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*) พิวเนีย (*Petunia*) และ ข้าวโพด (*Maize*) (Koes และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 2.5** ชีวสังเคราะห์ของสารฟลาโวนอยด์ สารแอนโทไซยานินจากลิวโคแอนโทไซยานิดิน แสดง สองทางคือ แอนโทไซยานิดิน (เพลาโกนินิดิน) และ pseudobase ชื่อเอนไซม์ aurone synthase (ANS), cinnamate-4-hydroxylase (C4H), chalcone isomerase (CHI), chalcone synthase (CHS), 4-coumaroyl: CoA-ligase (4CL), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), flavanone 3- hydroxylase (F3H), flavone synthase (FNSI and FNSII), flavonoid 3' hydroxylase (F3'H), flavonol synthase (FLS), Pheammonia-lyase (PAL), stilbene synthase (STS), flavonoid glucosyl transferase (UFGT)

ที่มา: Andersen และ Markham, 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5.2 ยีนโครงสร้าง

ยีนโครงสร้างจะถอดรหัสและแปลรหัสให้ได้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ เช่น อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*) (Winkel-Shirley, 2001) (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ยีนโครงสร้าง *Transparent Testa (TT)* และ *Tannin Deficient Seed (TDS4)* ของชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ที่พบในอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*)

ยีน/ชื่อเอนไซม์	ตำแหน่งยีน (locus)*
chalcone synthase (CHS)	TT4
chalcone isomerase (CHI)	TT5
flavanone 3-hydrolyase(F3H)	TT6
flavonoid 3'-hydrolyase(F3'H)	TT7
dihydroflavonol 4-reductase (DFR)	TT3
anthocyanidin synthase (ANS) และ Leucoanthocyanidin deoxygenase (LDOX)	TT18, TDS4
anthocyanin reductase	BANYULS

\* จาก ATTED-II

ที่มา: Winkel-Shirley, 2001

### 2.5.2.1 Chalcone syntase (CHS)

ยีน *CHS* ถอดรหัสและแปลรหัสที่ตำแหน่งยีน *TT4* แยกครั้งแรกจาก ผักชีฝรั่ง (parsley) (Kreuzaler และคณะ, 1983) ซึ่งโคลนดังกล่าวสามารถใช้เป็นตัวติดตาม (probe) ในการแยกยีนที่แตกต่างกันสองยีนจาก พิทูเนีย (*Petunia*) (Reif และคณะ, 1985)

### 2.5.2.2 Chalcone isomerase (CHI)

ยีน *CHI* ถอดรหัสและแปลรหัสที่ตำแหน่งยีน *TT5* ทำให้เซลล์โคลนเกิดไอโซเมอร์เป็นเนรินเจนิน (naringenin) การสะสมของเซลล์โคนในเนื้อเยื่อพืชที่พบได้น้อย แม้ว่าขาดเอนไซม์นี้เซลล์โคลนยังสามารถเกิดไอโซเมอร์เป็นเนรินเจนินได้ การสะสมเซลล์โคลนพบในสายพันธุ์กลายของ *Callistephus chinensis* (China aster) ทำให้ดอกมีสีเหลือง (Kuhn และคณะ, 1978; Forkmann และ Dangelmayr, 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.5.2.3 Flavanone 3-hydrolyase (F3H)

ยีน *F3H* ถอดรหัสและแปลรหัสที่ตำแหน่งยีน *TT6* ได้เป็น dihydrokaempferol ในสแนป-ดากอน (*Snapdragon*) และพิทูเนีย สามารถแยกยีนนี้ได้จากตำแหน่ง *Incolorata* และ *An3* ตามลำดับ (Martin และคณะ, 1991; Froemel และคณะ, 1985)

### 2.5.2.4 Flavonoid 3'-hydrolyase (F3'H)

ยีน *F3'H* ถอดรหัสและแปลรหัสที่ตำแหน่งยีน *TT7* เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ของแนรินเจนิน และไดไฮโดรเคเอ็มพีรอลที่ตำแหน่ง 3' (Stotz และคณะ, 1985)

### 2.5.2.5 Dihydroflavonol-4-reductase (DFR)

ยีน *DFR* ถอดรหัสและแปลรหัสที่ตำแหน่งยีน *TT3* โดยใช้ NADPH ได้ flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidins) ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) (Caboche และคณะ, 2001) การแสดงออกของยีน *DFR* นี้เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมหลายชนิด เช่น ยีน *TT8* *TT2* และ *TTG1* ในอะราบิดอปซิส

### 2.5.2.6 Anthocyanidin synthase (ANS) และ Leucoanthocyanidin deoxygenase (LDOX)

ยีน *ANS* และ *LDOX* ถอดรหัสและแปลรหัสที่ตำแหน่งยีน *TT18*, *TDS4* เอนไซม์ anthocyanidin synthase เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนลิโคแอนโทไซยานิดิน (leucoanthocyanidins) ไปเป็นเมิดสีแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) (Heller และ Forkmann, 1988) ส่วนเอนไซม์ leucoanthocyanidin deoxygenases หรือเอนไซม์ glucosyltransferases (พบในอะราบิดอปซิสกว่า 99 สกุล) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) ให้แอนโทไซยานิดินไปเป็นแอนโทไซยานิน ปฏิกิริยาเติมหมู่น้ำตาลกลูโคสจะเกิดที่ตำแหน่งที่สามและห้าของโครงสร้างแอนโทไซยานินโดยเอนไซม์ UDP-glucose:flavonoid 3-glucosyltransferase (3GT) และ UDP-glucose:anthocyanin 5-glucosyltransferase (5GT) พบได้ในเพอร์ริล่า (*Perilla*) ยีน *GT* นั้นมีหน้าที่และลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกันในพืชที่ต่างชนิดกัน จึงสามารถโคลนยีน *GT* ของพิทูเนียจากเพอร์ริล่าได้ (Nakamura และคณะ, 2003)

## 2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมสารฟลโวนอยด์ในพืช

### 2.6.1 การชักนำด้วยแสง (photo induction)

เนื่องจากแสงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตสารฟลโวนอยด์ ดังนั้นการวิจัยส่วนใหญ่จึงมุ่งศึกษาถึงการชักนำด้วยแสง (Lois และ Buchanan, 1994) โดยศึกษาแสงที่ความยาวคลื่นในช่วงยูวี-บี หรือช่วงที่มองเห็นได้ (280-320 นาโนเมตร) และช่วง far-red

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.6.2 การชักนำด้านออสโมติก (osmotic induction)

เนื่องผลผลิตจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์นั้น เป็นสารสีซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย โดยเฉพาะสารกลุ่มแอนโทไซยานินซึ่งให้สีที่แตกต่างกัน โดยบริเวณที่สามารถพบว่ามีสารสะสมของแอนโทไซยานินมากอยู่ในบริเวณแควิวโอลของเซลล์ที่เนื้อเยื่อชั้นนอก (Li และคณะ, 1993; Lois และ Buchanan และคณะ, 1994) จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหลายๆชนิดพบว่า การสะสมของแอนโทไซยานินเกิดเนื่องมาจากภาวะเครียดทางออสโมติก (osmotic pressure) โดยการชักนำของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส (Tholakalabavi และคณะ, 1994) ซูโครส (Cormier และคณะ, 1989) และ แมนิทอล (Tholakalabavi และคณะ, 1997) ในใบของอะราบิโดปซิส (Mita และคณะ, 1997) จะสะสมแอนโทไซยานินเมื่อเลี้ยงในอาหารที่น้ำตาลชนิดต่างๆ นอกจากนี้การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะแวดล้อมภายนอกก็ให้ผลที่คล้ายกัน โดยพบว่าการสะสมแอนโทไซยานินมักจะถูกชักนำให้เกิดขึ้นในสภาวะที่มีเกลือ เช่น พบในรากข้าวโพดที่ขึ้นบริเวณดินที่มีความเค็มสูง (Raliemoorthy และ Rao, 1994) การสะสมของแอนโทไซยานินในใบของต้น *Monis alba* (Ramanjulu และคณะ, 1993) เมื่อเจริญในสภาพที่มีดินเค็ม

### 2.7 การโคลนยีน (gene cloning) (หัตถยา, 2548)

การโคลนยีนเป็นเทคนิคของการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต รวมถึงการยับยั้ง การกระตุ้นการแสดงออกของยีน และการใส่สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดเข้าไปในเซลล์ เทคนิคดังกล่าวอาจเรียกว่า เทคโนโลยีการทำ DNA สายผสม (recombinant DNA technology) สิ่งมีชีวิตที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปเรียกว่า transgenic organism หรือ genetically modified organisms (GMOs) โดยขั้นตอนในการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต มีขั้นตอนทั่วไปดังนี้

#### 2.7.1 การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (preparing DNA)

การเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการเป็นขั้นตอนแรกของการโคลนยีนซึ่งสามารถเตรียมได้จากเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) โดยมีหลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสายดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (DNA polymerase) เทคนิคพีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกริยา พีซีอาร์ มี 3 ขั้นตอน ใช้เวลาประมาณ 4-5 นาที ได้ผลลัพธ์เป็นดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นหนึ่งเท่า เริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยาที่สองและดำเนินต่อไปจนได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามต้องการ ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นถูกจำกัดด้วยปริมาณของไพรเมอร์และนิวคลีโอไทด์ที่ใส่ลงไป เทคนิคพีซีอาร์ 1 รอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้ (รูปที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

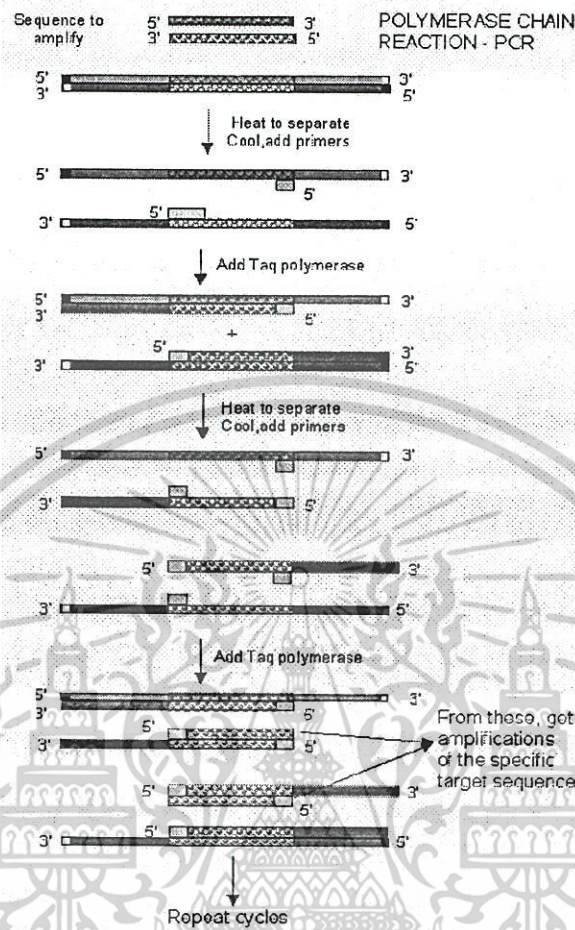
1. Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที

2. Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงเหลือประมาณ 50-70 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์จับคู่กับไพรเมอร์สายคู่สมสั้นๆ (ยาวประมาณ 15-30 นิวคลีโอไทด์) ที่สังเคราะห์ขึ้นมา ไพรเมอร์ที่เข้าจับจะมีปลาย 3'OH สำหรับเป็นจุดตั้งต้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นสายคู่สมกับดีเอ็นเอสายแม่พิมพ์

3. Extension เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่อยู่ในรูปที่ทนความร้อน (Taq polymerase) เข้าเกาะกับไพรเมอร์ที่ปลาย 3'OH และเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นสายคู่สมกับแม่พิมพ์ ในทิศทาง 5' → 3' ได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ 2 อัน

#### 2.7.2 การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการโคลนยีน (restriction enzyme for gene cloning)

การโคลนยีนต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการตัดสายดีเอ็นเอที่ต้องการ จึงนำไปเชื่อมต่อกับพาหะ (vector) แล้วจึงพาหะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) นิยมใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 (Type II) เมื่อเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอออกจากกันแล้ว ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีปลายทั้งสองยาวเท่ากัน เรียกว่าปลายทู่ (blunt end หรือ flush end) หรือชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีปลายทั้งสองยาวไม่เท่ากัน เรียกว่าปลายเหนียว (sticky end หรือ cohesive end)



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการเพื่อปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยเทคนิคพีซีอาร์

ที่มา : Henry J., 2008

### 2.7.3 การเลือกใช้พาหะหรือเวกเตอร์ (vector)

พาหะ คือ ดีเอ็นเอที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้ปริมาณมากๆ โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการดังกล่าวมาเชื่อมต่อเข้าไปกับดีเอ็นเอเวกเตอร์ (DNA vector) ได้ดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) จากนั้นจึงถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็นพาหะต้องมีคุณสมบัติพิเศษบางประการคือ

1. สามารถจำลองตัวเองได้อิสระรวมถึงการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ด้วย
2. มีช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเป็นตำแหน่งตัดจำเพาะ (restriction site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งตำแหน่งจำเพาะนี้แต่ละแบบจะปรากฏเพียงแห่งเดียวในแต่ละเวกเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. มีมาร์คเกอร์ยีนเด่นสำหรับการคัดเลือก (dominant selectable marker gene) ซึ่งโดยปกติเป็นยีนที่ต้านยาปฏิชีวนะ

พลาสมิดเวกเตอร์ (plasmid vectors) เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่เป็นวงกลมอยู่นอกโครโมโซม พบในแบคทีเรีย มีขนาดผันแปรจาก 1 กิโลเบส ถึงมากกว่า 200 กิโลเบส สามารถจำลองตัวเองได้อย่างอิสระ พลาสมิดที่นิยมใช้ในระยะเวลาแรกคือ pBR 322 ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิดและมียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin) และเตตราไซคลิน (tetracyclin)

#### 2.7.4 การถ่ายโอนพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation) แบ่งได้ดังนี้

##### 1. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียว

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ากับเวกเตอร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน บ่อยครั้งที่พบว่าดีเอ็นเอปลายเหนียวของเวกเตอร์ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นเกิดการจับกันเอง (self ligation) ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้โดยใช้ alkaline phosphatase เปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตที่ปลายหัวให้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล ดังนั้น เอนไซม์ไลเอส จึงไม่สามารถสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ได้

##### 2. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ากับเวกเตอร์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ซึ่งทำได้ยากกว่าการเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียว ดังนั้นจึงอาจนำดีเอ็นเอปลายทู่มาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอลิงก์เกอร์ (DNA linker) ประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งจะตัดได้ปลายเหนียว หรืออาจแก้ปัญหาปลายทู่โดยใช้โมเลกุลติดตาม (adapter molecule) ที่เป็นปลายเหนียวมาเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอที่ต้องการ

#### 2.7.5 การตรวจสอบโคลนที่ต้องการ (screening hybrid vector)

โดยการคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection) ซึ่งเหมาะสำหรับยีนที่ใส่เข้าไปในเวกเตอร์นั้นเป็นยีนที่สามารถแสดงออกได้ในเซลล์เจ้าบ้านได้และเซลล์เจ้าบ้านจะต้องไม่มียีนนั้นอยู่

#### 2.7.6 การประยุกต์ใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรม (application)

อะโกรแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อยู่ในดิน สามารถบุกรุก (infect) เข้าสู่ต้นพืชได้บริเวณที่มีบาดแผล ทำให้พืชเกิดปุ่มปม (tumor) ที่เรียกว่า crown gall disease เนื่องจากการสร้าง opine (เช่น octopine และ nopaline) ขึ้น โดยยีนที่อยู่บน Ti plasmid (tumor inducing plasmid) ที่มีขนาดประมาณ 140-235 kb ซึ่งในส่วนของ Ti plasmid จะมีส่วนของ T-DNA (Transfer DNA) ขนาด 20 kb ที่สามารถถ่ายถอดหรือแทรกเข้าไปในจีโนมดีเอ็นเอของพืชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA)

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการแยกสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ที่มีขนาดและประจุต่างกันออกจากกัน ดีเอ็นเอมีประจุเหมือนกันตลอดสาย ดังนั้นจึงใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) หรืออะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) แยกบนปัจจัยพื้นฐานที่แตกต่างกัน เช่น ขนาดของโมเลกุล รูปแบบของดีเอ็นเอ (configuration) เพอร์เซ็นต์ของชนิดเจล แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) และบัฟเฟอร์ อะกาโรสเจลเหมาะสำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ (หลายร้อยนิวคลีโอไทด์) ส่วนอะคริลาไมด์เหมาะสำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดเล็ก

## 2.9 กลไกการเสียหายจากการที่ลิพิดถูกออกซิไดซ์

กรดไขมันไม่เพียงแต่จะทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำคัญแก่ร่างกายเท่านั้น แต่ยังเป็นองค์ประกอบในเมมเบรน เช่น ฟอสโฟลิพิด และทำหน้าที่ควบคุมของเหลวในเมมเบรน ในสิ่งมีชีวิต การที่ลิพิดถูกออกซิไดซ์ด้วยอนุมูลเรียกว่า ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งเป็นกระบวนการที่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว และฟอสโฟลิพิดเกิดการเสื่อมสภาพหรือเสียหายจากการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดลิพิดไฮเปอร์ออกไซด์ขึ้นที่เซลล์เมมเบรน หรือ ลิพิดในเลือด และในของเหลวในร่างกายอื่นๆ เป็นต้น

ดังนั้นความเสียหายไม่เพียงเกิดขึ้นกับเซลล์เมมเบรนเท่านั้น แต่จะขยายวงกว้างไปยังองค์ประกอบอื่นๆภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ อาจเกิดการเสื่อมสลายได้สารประกอบจำนวนมาก ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอนต่างๆ เช่นอีเทน อีทีน และ เพนเทน เป็นต้น รวมถึง คีโตน และอัลดีไฮด์ อัลดีไฮด์ที่เป็นผลผลิตจากการเสื่อมสลายที่เกิดขึ้นที่มีความสำคัญ คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) ปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้นนำมาใช้เป็นดัชนีวัดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน MDA สามารถเกิดปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลต่างๆในร่างกายได้ ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดสารประกอบที่เชื่อมต่อกันภายในเซลล์เมมเบรน เช่น ลิพิด-ลิพิด และ ลิพิด-โปรตีน เป็นต้น

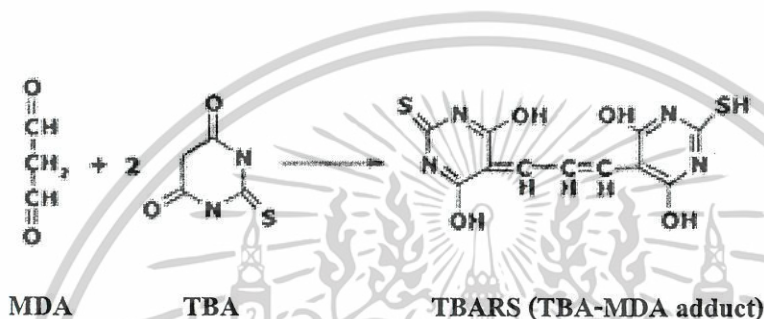
### 2.9.1 ดัชนีวัดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

จากการศึกษาวิจัยจำนวนมากจนเป็นที่ยืนยันว่าลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน และภาวะถูกออกซิไดซ์มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรค และพัฒนาการของโรค ฉะนั้นจึงมีการใช้ปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเป็นดัชนีที่เหมาะสมเพราะลิพิดจะเป็นชีวโมเลกุลที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ไวต่อการเกิดออกซิเดชัน โดยอนุมูลแล้วเมื่อลิพิดในเมมเบรนถูกออกซิไดซ์ทำให้เมมเบรนมีคุณสมบัติเปลี่ยนไป และมีส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ และรีเซพเตอร์ที่ฝังตัวอยู่ในเมมเบรนทำให้การทำงานของเอนไซม์และรีเซพเตอร์มีเสียไปเป็นสาเหตุในการเกิดโรค ดังนั้นผลผลิตหรือสารที่ได้จากการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันจึงเป็นดัชนีที่แสดงถึงภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์และการบาดเจ็บของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 มัลลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA)

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณลิวคิโนลีนมีหลายวิธี เริ่มตั้งแต่การหาปริมาณมัลลอนไดอัลดีไฮด์ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิดลิวคิโนลีนระดับ MDA เป็นดัชนีชี้วัดที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง เพราะการหาปริมาณเป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน การหาปริมาณ MDA ที่เกิดขึ้น ทำโดยการเติมกรดไทโอบาร์บิทูริกในสภาวะกรด MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริกได้เป็นสารมีสีเรียกว่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ดังแสดง



รูปที่ 2.7 แสดงปฏิกิริยาการรวมตัวของ MDA และ TBA

ที่มา: โอภา และคณะ (2550)

ข้อด้อยของการหาปริมาณลิวคิโนลีนโดยใช้ปริมาณ MDA เป็นดัชนีชี้วัด คือ ความไม่เฉพาะเจาะจง โดย MDA ไม่เป็นสารเฉพาะที่ได้จากการเกิดลิวคิโนลีน โดยอนุมูล นอกจากนี้สาร TBARS ที่เกิดจากกรดไทโอบาร์บิทูริกเป็นปฏิกิริยาไม่เฉพาะเจาะจงกับ MDA เพราะสารหลายชนิด เช่น น้ำตาล สามารถทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริกเกิดเป็นสารมีสีได้เช่นเดียวกัน ดังนั้น MDA จึงเป็นวิธีที่ไม่เฉพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามเนื่องจากวิธีนี้ทำได้ง่าย สะดวก และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาสูง MDA จึงยังคงเป็นที่นิยมใช้เป็นดัชนีชี้วัดภาวะออกซิเดชันของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต

# บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ต้นยาสูบ *Nicotina tobaccum*

3.1.2 เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404

3.1.3 เชื้อ *E. coil*

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนเชื่อมต่อระหว่างเวกเตอร์และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

3.1.4.2 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.1.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำคอมพลีเทนต์เซลล์ (competent cell)

3.1.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายโอนยีน

3.1.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.1.4.6 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้

3.1.5.1 ประเภทเครื่องแก้ว

- บีกเกอร์
- ปีเปต
- ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- จาน Petri dishes
- แท่งแก้วคน
- ขวดวัดปริมาตร
- กระจกตวง

3.1.5.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ไมโครปีเปตและทิปขนาดต่างๆ
- ซ้อนตักสาร
- กระดาษซั่งสาร
- ปากคีบ
- มีดผ่าตัดขนาดต่างๆ
- เครื่องซั่งสารไฟฟ้าแบบหยาบและแบบละเอียด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เตอบไมโครเวฟ
- ตู้เย็น
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- เตอบความร้อน (hot air oven)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vertex mixer)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- ตู้บ่ม (incubator)
- เครื่องพีซีอาร์
- อุปกรณ์ทำอิเล็กโตรโฟรีซิส
- อุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล
- ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### 3.2 วิธีการทดลอง

#### 3.2.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

##### 3.2.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR*

ทำการโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *DFR* โดยใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ 5'- CGG GAT CCA TGG TTA GTC AGA AAG AGA -3' และ รีเวอร์สไพรเมอร์ 5'- CGG GAT CCC TAG GCA CAC ATC TGT TGT -3' สำหรับการเพิ่มชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ใช้เงื่อนไขของการทำงานดังนี้

ดีเอ็นเอแม่แบบ	0.50	ไมโครลิตร
10X บัฟเฟอร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์	5.00	ไมโครลิตร
dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	1.00	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1.00	ไมโครลิตร
รีเวอร์สไพรเมอร์	1.00	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.30	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	41.20	ไมโครลิตร
<b>ปริมาตรรวมทั้งหมด</b>	<b>50.00</b>	<b>ไมโครลิตร</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีสถานะในการทำพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5.00 นาที การทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 นาที และการต่อเติมสายดีเอ็นเอ (extension) จากไพรเมอร์โดยการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 นาที โดยทำทั้งหมด 40 รอบและตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.2.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* กับเวกเตอร์ *yT&A* และถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli*

ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เพิ่มจำนวนแล้วกับเวกเตอร์ *yT&A* และถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli* โดยมีปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ ประกอบด้วย

ชิ้นดีเอ็นเอ <i>DFR</i>	6.00	ไมโครลิตร
T4 A โคลนนิ่งเวกเตอร์ <i>yT&amp;A</i>	1.00	ไมโครลิตร
ligation buffer A	1.00	ไมโครลิตร
ligation buffer B	1.00	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1.00	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.00	ไมโครลิตร

บ่ม 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำมาเก็บที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 4 ชั่วโมงจนกระทั่งนำมาทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้อ *E. coli* ที่ผ่านการทำคอมพิเทนต์แล้ว จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร IPTG 25 ไมโครลิตรต่อเพลท และ X-gal 2 เปอร์เซ็นต์ 50 ไมโครลิตรต่อเพลท เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน คัดเลือกโคโลนีสีขาวของเชื้อ *E. coli* แบบสุ่ม และทำการสกัดพลาสมิด ตรวจสอบผลโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์

จากนั้นนำเวกเตอร์ที่มียีนโครงสร้าง *DFR* แทรกอยู่ ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เพื่อแยกยีนโครงสร้าง *DFR* ออกจากเวกเตอร์ *yT&A* มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่คัดเลือกได้	2.00	ไมโครลิตร
10X buffer E	1.00	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.10	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6.75	ไมโครลิตร

ปริมาตรรวมทั้งหมด 10.00 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารของศูนย์บริการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ตรวจสอบผล โดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *yT&A* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่คัดเลือกได้	2.00	ไมโครลิตร
10X buffer H	1.00	ไมโครลิตร
<i>EcoRI</i> (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.20	ไมโครลิตร
BSA	0.10	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6.70	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.00	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ *GFX™ PCR DNA* และ *Gel Band Purification Kit* ของ *Amersham Pharmacia Biotech* ตรวจสอบผลของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการ ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.2.1.3 การเชื่อมต่อและตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ *pBI121*

หลังจากแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการออกจากเจลแล้ว ทำการเชื่อมต่อ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ *pBI121* โดยมีปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ ประกอบด้วย

ชิ้นดีเอ็นเอ <i>DFR</i>	5.00	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ <i>pBI121</i>	1.00	ไมโครลิตร
ligation buffer A	1.00	ไมโครลิตร
ligation buffer B	1.00	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1.00	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	1.00	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.00	ไมโครลิตร

บ่ม 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และนำไปเก็บที่ 22 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์มาทำการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ *E. coli* ที่ผ่านการทำคอมพีเทนต์ (competent) แล้วเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ คานามัยซิน (kanamycin) เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คืน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว เพื่อนำมาทำการสกัดพลาสมิดและตรวจสอบการถ่ายโอนยีนด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์

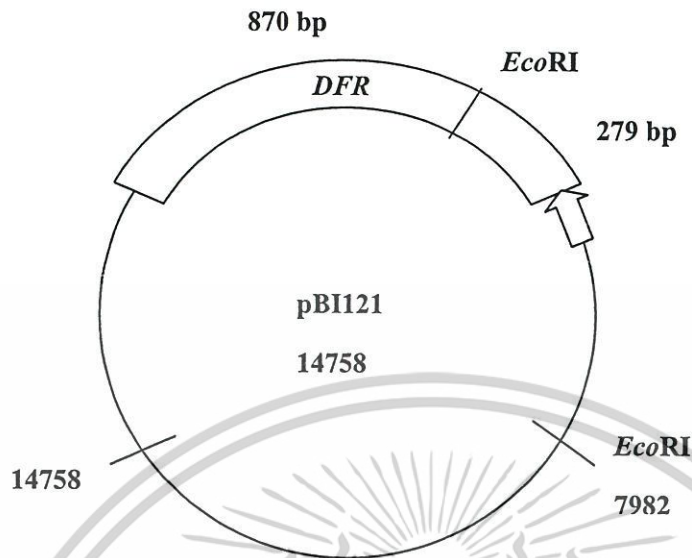
ทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่แทรกอยู่ใน พลาสมิดเวกเตอร์ pBI121 โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดของโคลนที่คัดเลือก มาตรวจสอบพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่คัดเลือกได้	2.00	ไมโครลิตร
10X buffer E	1.00	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.10	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6.75	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.00	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ตรวจสอบผลโดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอจากการสกัดพลาสมิดของโคลนที่คัดเลือกได้ทำการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อระหว่างดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* และพลาสมิดเวกเตอร์ pBI121 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอจากพลาสมิดที่คัดเลือกได้	3.00	ไมโครลิตร
10X buffer H	1.00	ไมโครลิตร
<i>Eco</i> RI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.20	ไมโครลิตร
BSA	0.10	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.70	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	10.00	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากข้อมูลของ GenBank ยีนโครงสร้าง *DFR* มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI และพลาสมิดเวกเตอร์ pBI121 มีจุดตัดจำเพาะของทั้ง *Eco*RI ซึ่งการตัดจำเพาะของเอนไซม์แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ DFR และ พลาสมิด pBI121

### 3.2.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404

#### 3.2.2.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดเวกเตอร์ pBI121 ที่มียีน *DFR* แทรกอยู่อย่างถูกต้องทางเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด pBI121 ที่มียีน *DFR* แทรกอยู่จะสามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินได้

### 3.2.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ

#### 3.2.3.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย และศึกษา

##### ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ LBA4404 ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโครงสร้าง *DFR* แล้วมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนของใบยาสูบขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ลงในสารละลายเชื้อจำนวน 50 ชิ้น เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS สูตรชักนำแคลลัส ที่ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 500 ลักซ์ (lux) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS สูตรชักนำแคลลัสที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และคาเบนนิซิลิน (carbenicillin) เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.2.3.2 คัดเลือกต้นยาสูบทดลองที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน

ทำการคัดเลือกยอดจากแคลสต์ที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ มีลักษณะใบแผ่เหมือนต้นปกติและมีสีเขียวเข้ม ตัดยอดเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ยอดเจริญเป็นต้น คัดเลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้น ใบมีสีเขียว และมีราก เลี้ยงบนอาหาร MS และตรวจสอบยีนที่ถูกถ่ายโอนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่คัดเลือกได้และตรวจสอบหา ยีนที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอของพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *DFR* ซึ่งปฏิกิริยาดังนี้

สารละลายดีเอ็นเอจากต้นยาสูบ	1.00	ไมโครลิตร
dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	0.50	ไมโครลิตร
10X buffer และแมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์)	2.50	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.15	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	0.50	ไมโครลิตร
รีเวอร์สไพรเมอร์	0.50	ไมโครลิตร
น้ำปราศจากประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	19.85	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	25.00	ไมโครลิตร

มีสภาวะในการทำพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5.00 นาที การทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 นาที และการต่อเติมสายดีเอ็นเอ (extension) จากไพรเมอร์โดยการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.50 นาที โดยทำทั้งหมด 40 รอบและตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

### 3.2.4 ศึกษาผลของความเครียดจากความเค็มและความแห้งแล้งที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

นำต้นยาสูบทดลอง (ต้นยาสูบปกติและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุม *TT8* ยีนโครงสร้าง *F3'H* และ *DFR*) ที่มีลักษณะสมบูรณ์และอายุใกล้เคียงกัน มาเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเครียดจากความเค็มของโซเดียมคลอไรด์ หรือความแห้งแล้งจากน้ำตาลแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ทั้งสองการทดลอง จากนั้นตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและการสะสมสารกลุ่มฟีนอลของพืชทดลองโดยเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

#### 3.2.4.1 ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของต้นพืชทดลองที่ตอบสนองต่อความเครียดทางความเค็มและความแห้งแล้ง

ทำการสกัดคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์จากพืชทดลองด้วยอะซีโตน (Lichtenthaler, 1987; Shabala และคณะ, 1998) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเอ็กสารนี้เป็นเอ็กสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำเอ็กสารไปใช้ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอ็กสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 662 644 และ 470 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และศึกษาการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน(Hodges และ คณะ, 1999)ในต้นพืชทดลอง โดยวิเคราะห์ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde MDA) ด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) และกรดไทโอบาบิฟูริก (thiobarbituric acid) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 532 และ 600 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ MDA ในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิกรัม

#### 3.2.4.2 ศึกษาการผลิตสารกลุ่มฟีนอลของต้นพืชทดลองที่ตอบสนองต่อความเครียดทางความเค็มและความแห้งแล้ง

ทำการสกัดสารกลุ่มฟีนอลโดยบดใบพืชสดและสกัดด้วยเมทานอลที่มีกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (Harborne, 1998) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสารฟีนอลแต่ละกลุ่มด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นประมาณ 300-560 นาโนเมตร

#### 3.2.4.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 ( $P \leq 0.05$ ) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16

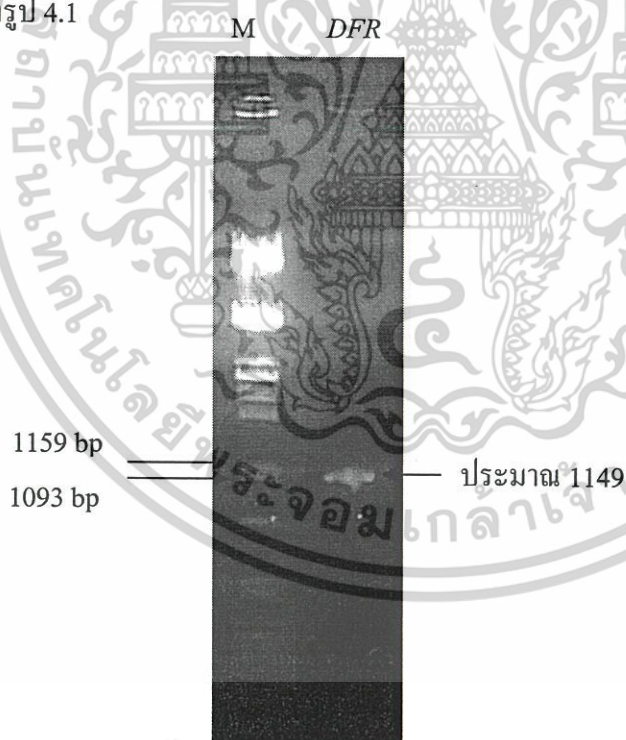
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและอภิปรายผล

#### 4.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

##### 4.1.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ *DFR*

ทำการเพิ่มปริมาณยีนโครงสร้าง *DFR* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ สามารถตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นจึงทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย  $GFX^{TM}$  PCR DNA และ Gel Band Purification Kit และทำการตรวจสอบผลการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์อีกครั้ง เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้นั้นมีขนาดอยู่ระหว่าง 1093 และ 1159 คู่เบส ซึ่งจากข้อมูลของ GenBank ชิ้นส่วนยีนโครงสร้าง *DFR* นั้นมีขนาดประมาณ 1149 คู่เบส จึงคาดว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้นั้นเป็นชิ้นส่วนของยีนโครงสร้าง *DFR* ดังรูป 4.1



รูปที่ 4.1 ผลการตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับและถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ *E. coli*

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้แล้ว มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *yT&A* โดยใช้ เอนไซม์ไลเกส จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ทำการเชื่อมต่อกันส่วนของดีเอ็นเอแล้ว มาทำการ ถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้อ *E. coli* เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร IPTG 25 ไมโครลิตรต่อเพลท และ X-gal 2 เปอร์เซ็นต์ 50 ไมโครลิตรต่อเพลท เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ได้ผลดัง รูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 โคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนของสารละลายดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *yT&A* บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร IPTG และ X-gal ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โคโลนีสีขาวคือ โคโลนีที่ได้รับการสอดแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โคโลนีสีฟ้าคือ โคโลนีที่ไม่ได้รับการสอดแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

เซลล์ของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิด *yT&A* สามารถเจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินได้ และจะปรากฏโคโลนีเป็น 2 ลักษณะคือ โคโลนีสีขาว และสีฟ้า โคโลนีสีขาวคือ โคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่คาดว่าน่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *yT&A* การสอดแทรกของดีเอ็นเอทำให้บริเวณยีน *lac Z* ของเชื้อ *E. coli* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสมาย่อย X-gal ได้ จึงเห็นโคโลนีเป็นสีขาว ในขณะที่โคโลนีสีฟ้าเกิดจากการทำงานของยีน *lac Z* ซึ่งสามารถย่อย X-gal ให้ผลผลิตที่เป็นสีฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

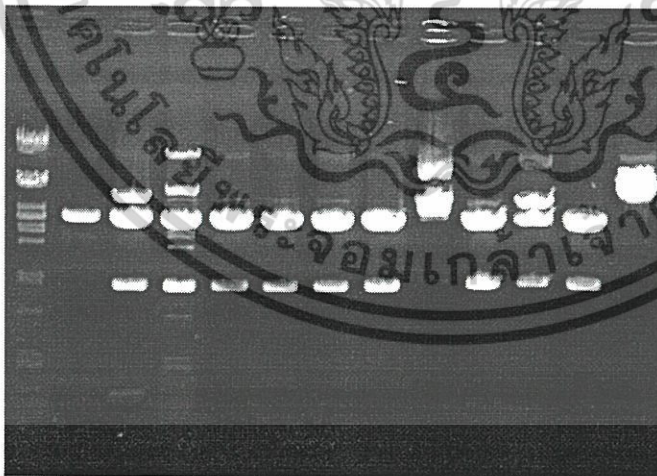
คัดเลือกโคโลนีสีขาวของเชื้อ *E. coli* แบบสุ่ม และทำการสกัดพลาสมิด ตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.3) ต่อมาทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิด โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจผลโดยใช้อะกาโรสเจล พบว่าโคลนที่ 2-11 ไม่พบการสอดแทรกดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* (รูปที่ 4.4)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



รูปที่ 4.3 ผลการสกัดพลาสมิด (ช่องที่ 1-12) ของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

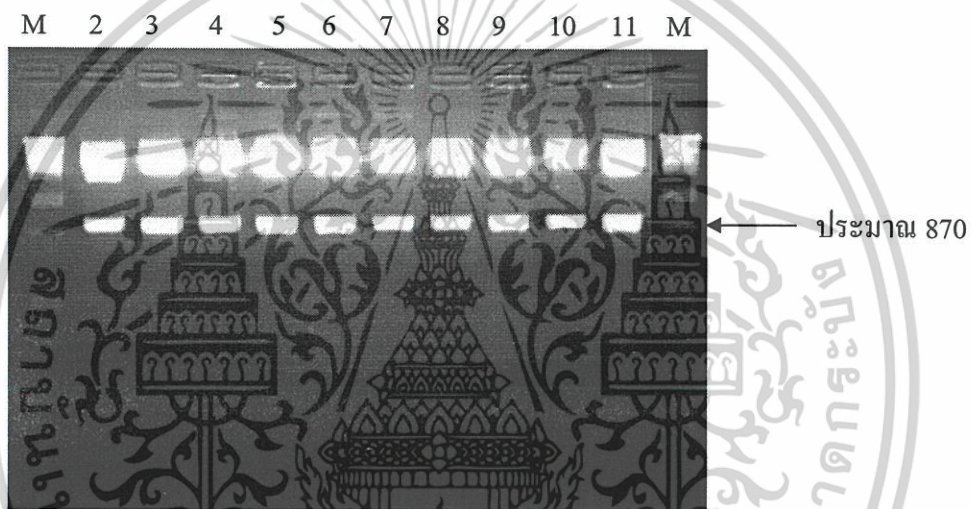


← ปริมาณ  
1149 bp

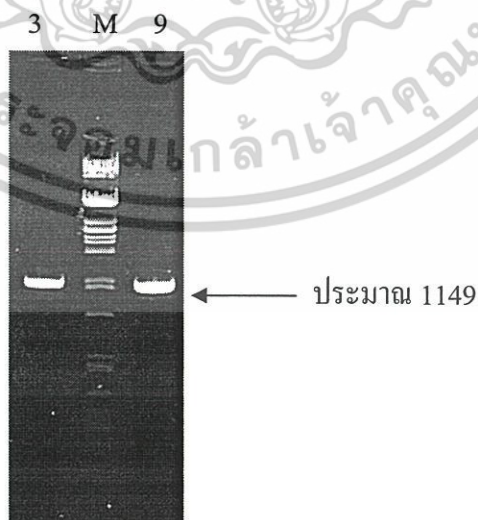
รูปที่ 4.4 ผลการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *yT&A* ที่ได้จากการสกัดพลาสมิดของเชื้อ *E. coli* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (ช่องที่ 1-12) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นทำการตรวจสอบการสอดแทรกอย่างถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *yT&A* ของโคลนที่ 2 ถึง 11 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่าถ้าเป็นโคลน *DFR* ที่ถูกต้อง เมื่อทำการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจะได้ขนาดของดีเอ็นเอประมาณ 870 และ 3007 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ (รูปที่ 4.5) และได้เลือกโคลนที่ 3 และ 9 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบผลโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.6) เพื่อนำไปใช้ในการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *pBI 121* ต่อไป



รูปที่ 4.5 ผลการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *yT&A* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ช่องที่ 2-11) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)



รูปที่ 4.6 ผลการทำให้บริสุทธิ์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *yT&A* ของโคลนที่ 3 และ 9 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.3 การตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pBI121

นำสารละลายดีเอ็นเอโคลนที่ 3 และ 9 ของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่แยกได้ ทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pBI121 จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณโดยการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้อ *E. coli* นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (รูปที่ 4.7) จากนั้นจึงสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่ได้ และตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.8)



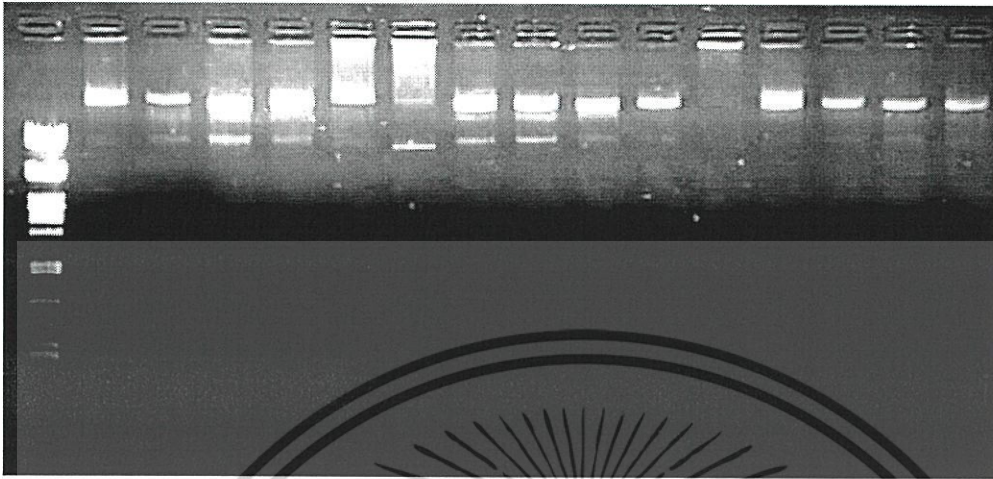
รูปที่ 4.7 โคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนของสารละลายดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pBI121 บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

จากนั้นตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pBI121 ในพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI พบว่าโคลนที่ 3.2, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.19, 3.23, 3.29 และ 9.2 มีการสอดแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ดังรูป 4.9

ทำการตรวจทิศทางการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเออย่างถูกต้องทิศทางหรือกลับทิศทางของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pBI121 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จากข้อมูลของ GenBank พบว่ายีนโครงสร้าง *DFR* มีจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam*HI 1 ตำแหน่ง และมีจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI 1 ตำแหน่ง ส่วนเวกเตอร์ pBI121 มีจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI 1 ตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

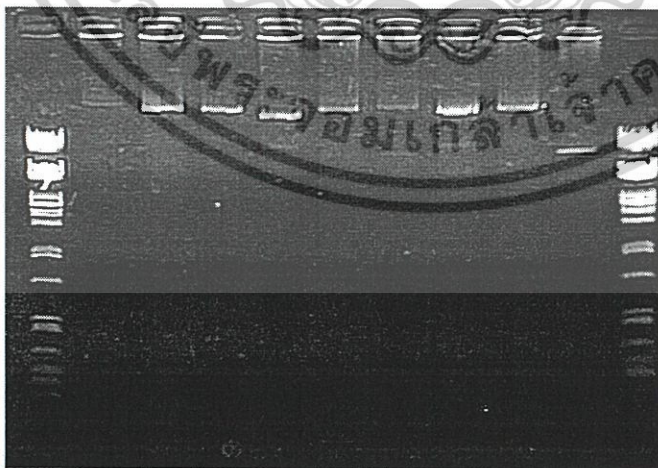
M 3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6 3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.13 3.14 3.15



M 3.16 3.17 3.18 3.19 3.20 3.21 3.22 3.23 3.24 3.25 3.26 3.27 3.28 3.29 3.30 M



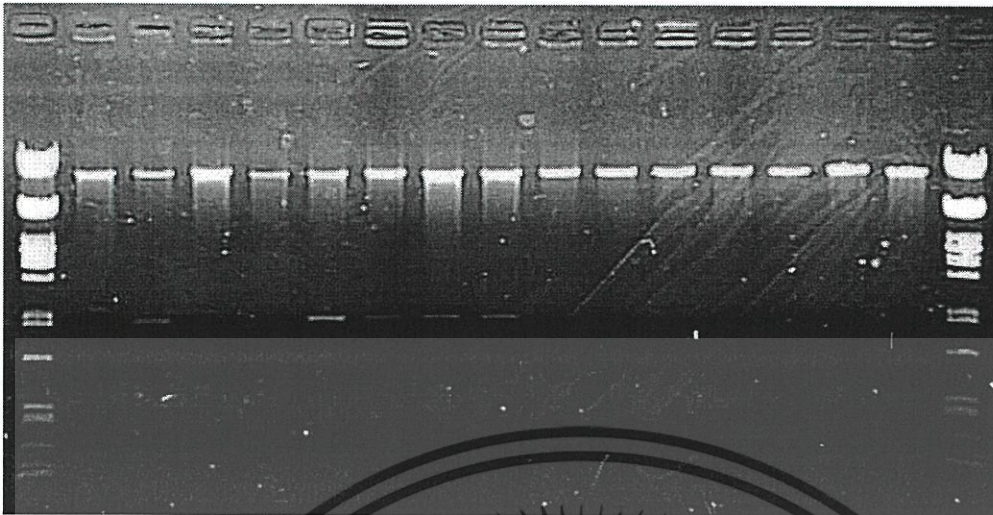
M 9.1 9.2 9.3 9.4 9.5 9.6 9.7 9.8 9.9 M



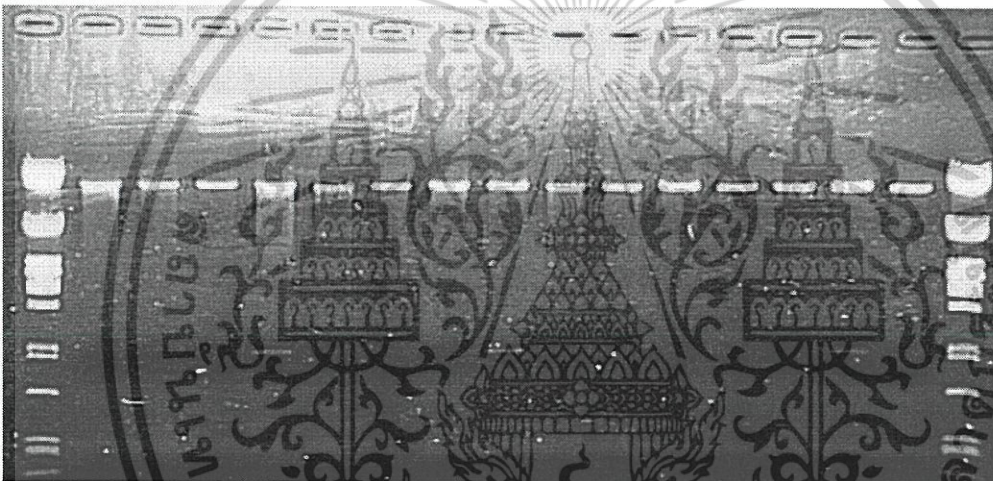
รูปที่ 4.8 ผลการสกัดพลาสมิดของเชื้อ *E. coli* โคลนที่ 3 (3.1-3.30) และ โคลนที่ 9 (9.1- 9.9) ที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pBI121 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

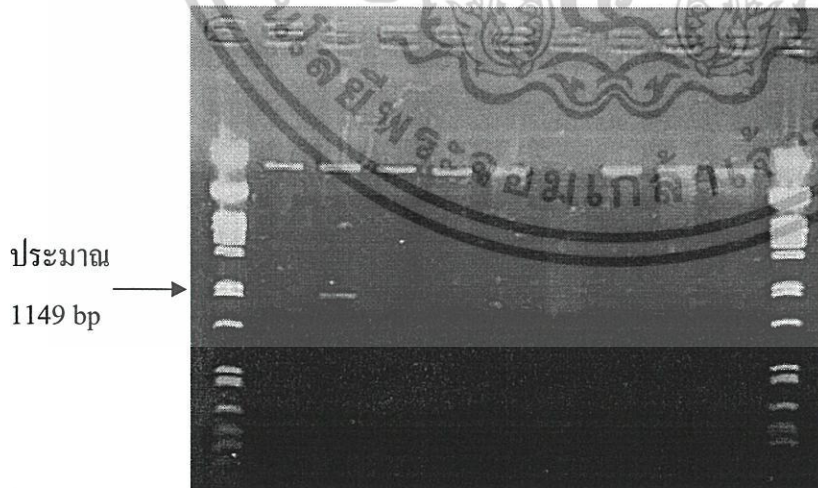
M 3.1 3.2 3.3 3.4 3.5 3.6 3.7 3.8 3.9 3.10 3.11 3.12 3.13 3.14 3.15 M



M 3.16 3.17 3.18 3.19 3.20 3.21 3.22 3.23 3.24 3.25 3.26 3.27 3.28 3.29 3.30 M



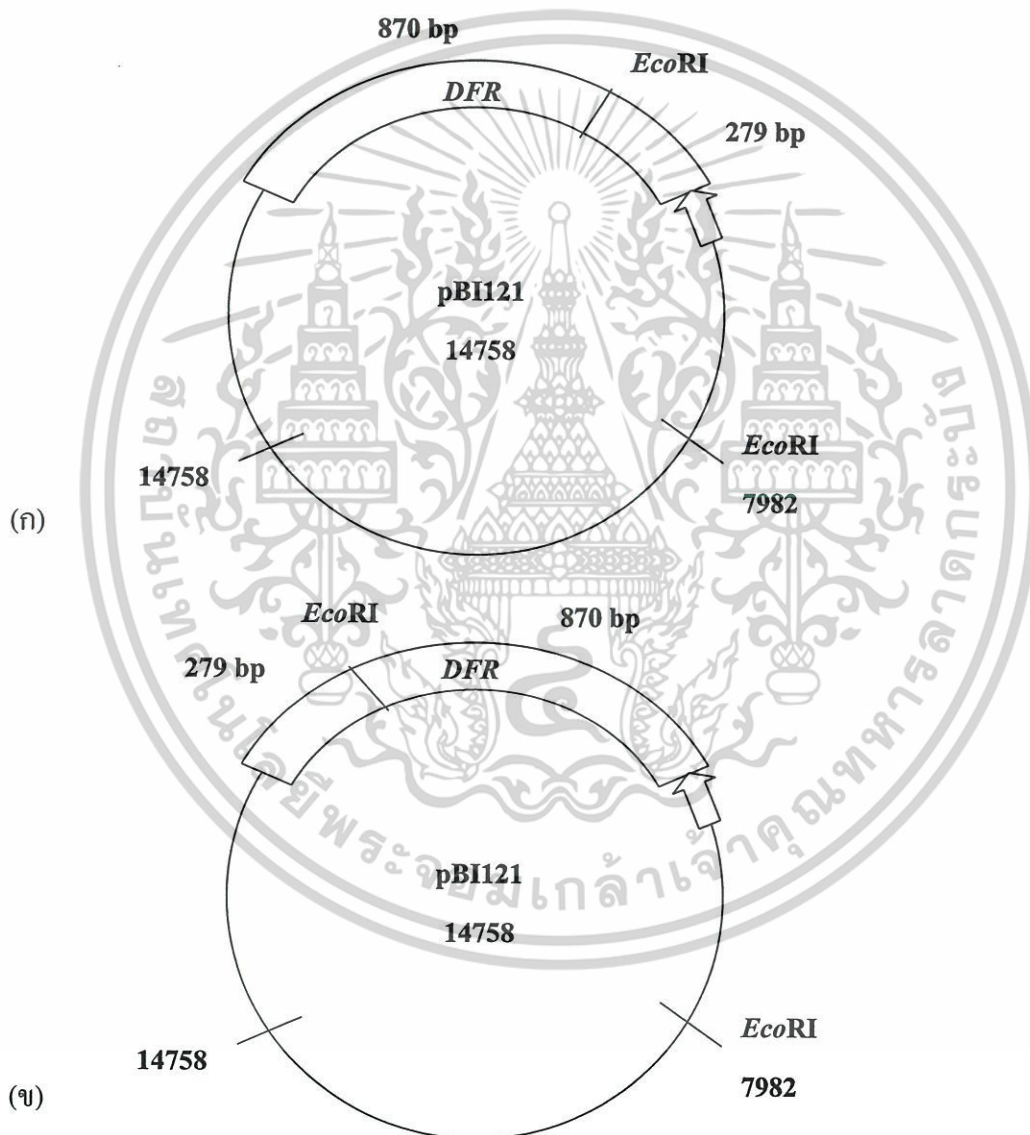
M 9.1 9.2 9.3 9.4 9.5 9.6 9.7 9.8 9.9 M



รูปที่ 4.9 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมกับ  
เวกเตอร์ pBI121 ในพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ของโคลนที่ 3 และ 9

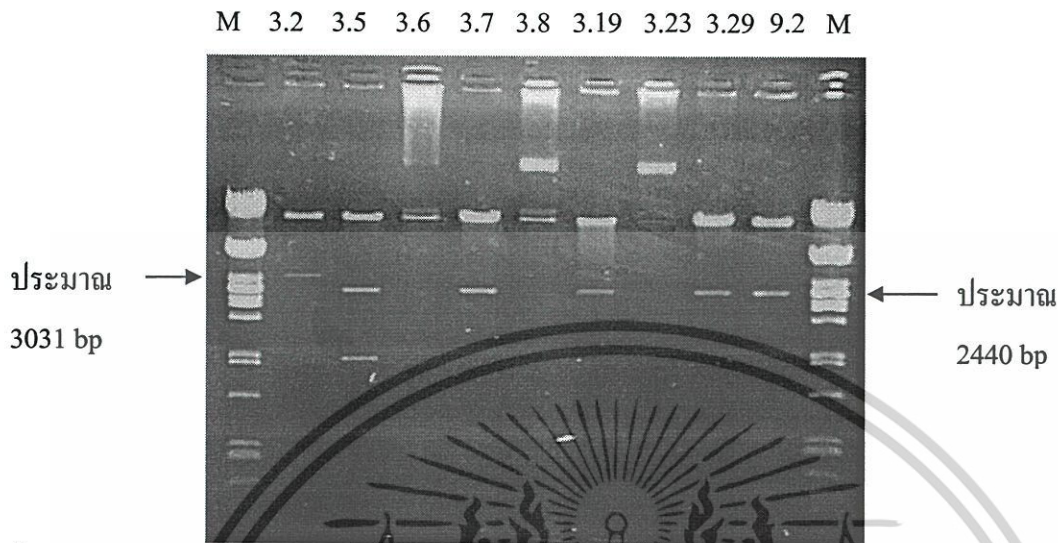
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นเมื่อทำการตรวจสอบทิศทางการสอดแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่าเมื่อเกิดการสอดแทรกอย่างถูกทิศทาง (sense) ระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* กับเวกเตอร์ pBI121 จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 2440 และ 13467 คู่เบส และเมื่อเกิดการสอดแทรกอย่างกลับทิศทาง (antisense) จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 3031 และ 12876 คู่เบส ตามลำดับ ดังรูป 4.10 และสามารถตรวจสอบผลการสอดแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (รูปที่ 4.11)



**รูปที่ 4.10** การสอดแทรกอย่างถูกทิศทาง (sense) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอยีน โครงสร้าง *DFR* บนเวกเตอร์ pBI121 (ก) และการแทรกอย่างกลับทิศทาง (antisense) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอยีน โครงสร้าง *DFR* บนเวกเตอร์ pBI121 (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.11** ผลการตรวจสอบการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมกับ  
 เวกเตอร์ pBI121 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โคลนที่ 3.5, 3.7, 3.19, 3.29 และ 9.2 มี  
 การสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* อย่างถูกต้องทิศทาง โคลนที่ 3.2 เกิด  
 การสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* อย่างกลับทิศทาง

พบว่าโคลนที่ 3.5, 3.7, 3.19, 3.29 และ 9.2 มีการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน  
 โครงสร้าง *DFR* อย่างถูกต้องทิศทาง เนื่องจากพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2440 คู่เบส ส่วน  
 โคลนที่ 3.2 เกิดการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* แบบกลับทิศทาง เนื่องจาก  
 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3031 คู่เบส โคลนที่ 3.5 พบแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ  
 1149 คู่เบส ซึ่งแตกต่างจากโคลนอื่นๆ คาดว่าเกิดการสอดแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน  
 โครงสร้าง *DFR* สองชิ้น เลือกโคลนที่ 9.2 มาทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

## 4.2 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

### 4.2.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย

นำสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* ที่เชื่อมกับเวกเตอร์ pBI121  
 โคลนที่ 9.2 มาทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 โดยเลี้ยงบน  
 อาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร. ที่อุณหภูมิ 28 องศา  
 เซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งอะโกรแบคทีเรียที่ได้รับ พลาสมิด pBI121 ที่มียีน *DFR* แทรกอยู่จะ  
 สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ

#### 4.3.1 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย และศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโครงสร้าง *DFR* แล้ว มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำเป็นสารแขวนลอยเชื้อด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครส จากนั้นจุ่มชิ้นส่วนของใบยาสูบขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตรลงในสารละลายเชื้อจำนวน 50 ชิ้น เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช MS สูตรชั่งน้ำหนักแคลต์ส ที่อุณหภูมิ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS สูตรชั่งน้ำหนักแคลต์สที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และคาเบนนิซิลินเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ การเจริญและพัฒนาของแคลต์สดังรูปที่ 4.12

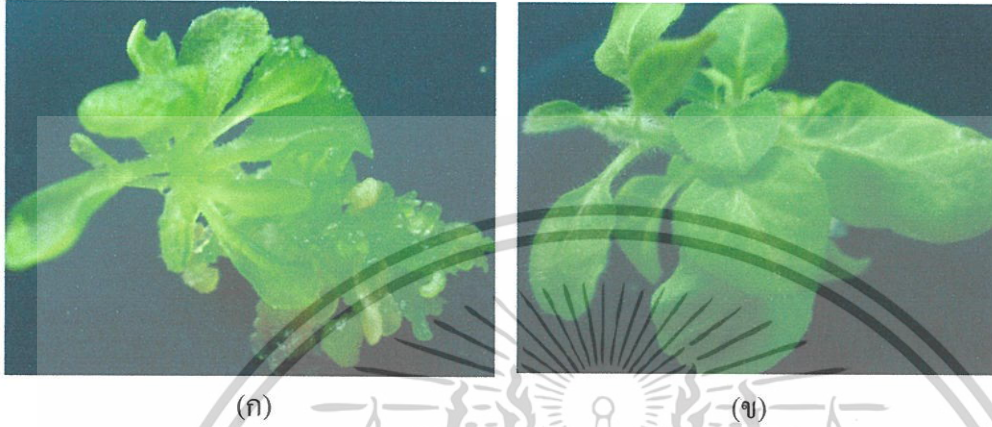


รูปที่ 4.12 การเจริญและพัฒนาของแคลต์สบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ก) การเจริญและพัฒนาของแคลต์สวันที่ 0 (ข) การเจริญและพัฒนาของแคลต์สเมื่อครบ 2 สัปดาห์ และ (ค) การเจริญและพัฒนาของแคลต์สเมื่อครบ 4 สัปดาห์

ชิ้นส่วนของยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีน จะสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลต์สได้ พบว่าจากจำนวนชิ้นยาสูบที่ทำการถ่ายโอนยีน สามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นแคลต์สได้ทั้งหมด 48 ใบ จากจำนวนใบทั้งหมด 50 ใบ คิดเป็นประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน 96 เปอร์เซ็นต์ ทำการคัดเลือกยอดที่เกิดจากแคลต์ส โดยทำการคัดเลือกยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ มีใบสีเขียวเข้มและใบแผ่ ดังรูปที่ 4.13(ก) ซึ่งคาดว่าเป็นยอดที่พัฒนามาจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

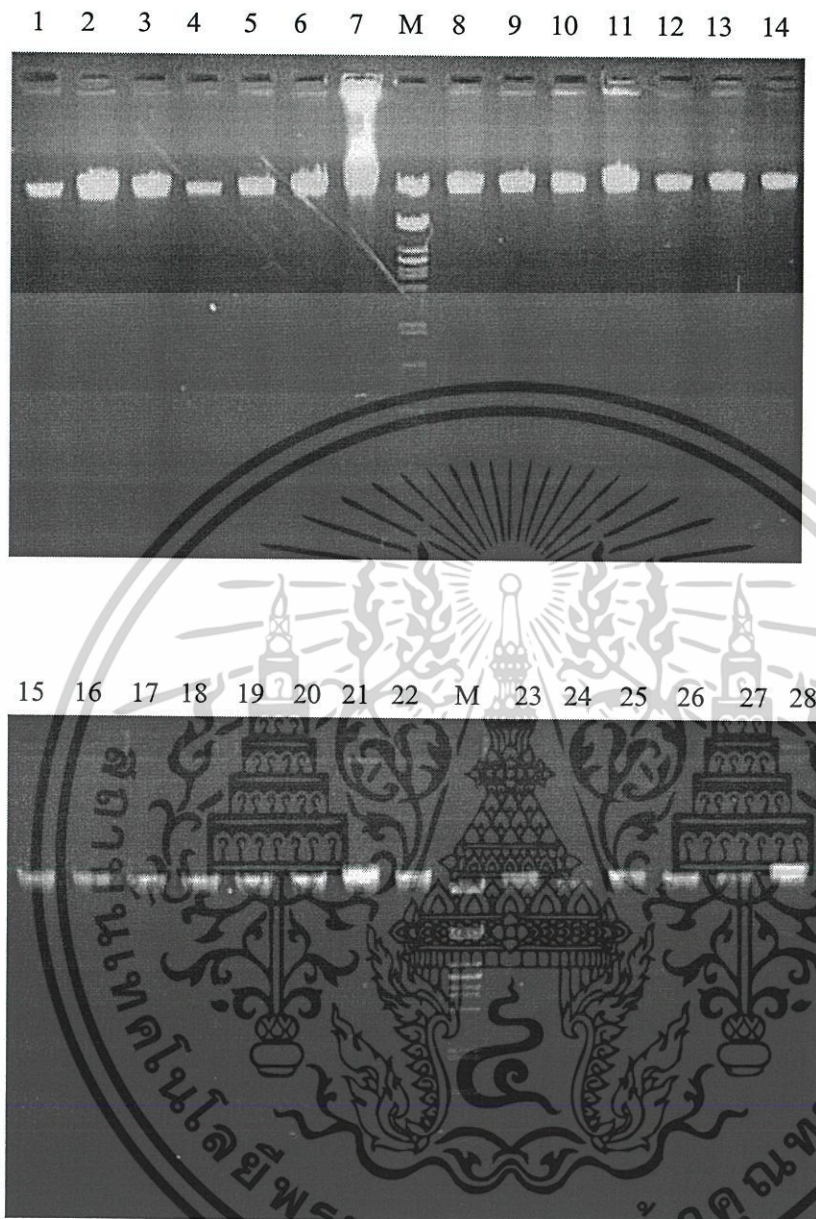
ยื่น เลียงในอาหาร MS สูตรปกติที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนยอดที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีนจะมีลักษณะไม่สมบูรณ์ คือ ลำต้นและใบสี ใบลีบเล็ก ดังรูปที่ 4.13 (ข)



รูปที่ 4.13 ลักษณะยอดของต้นยาสูบที่เจริญมาจากแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน โครงสร้าง DFR (ก) และยอดของต้นยาสูบที่เจริญมาจากแคลลัสที่ได้รับการถ่ายโอนยีน โครงสร้าง DFR (ข)

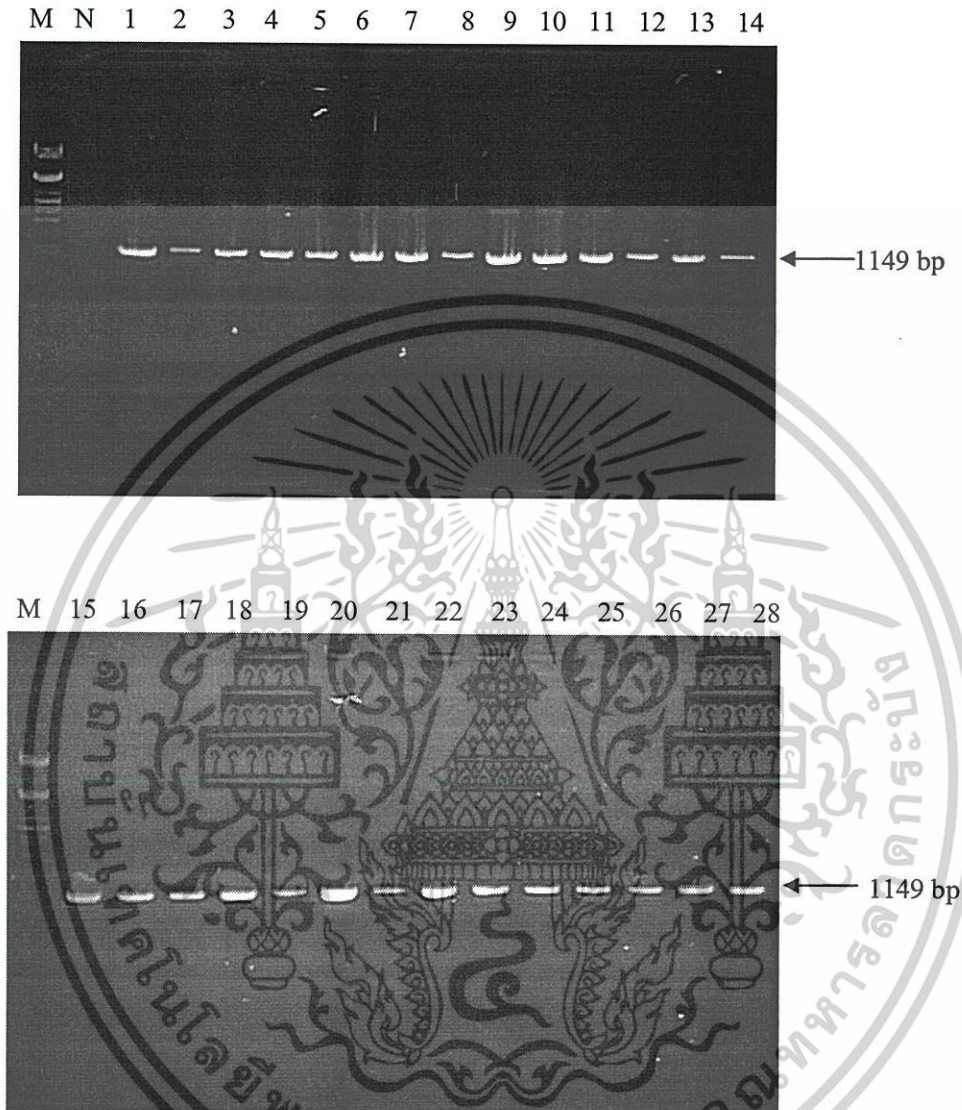
#### 4.3.2 คัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนยีน

คัดเลือกต้นยาสูบที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้นและใบมีสีเขียว และมีรากเลี้ยงบนอาหาร MS และตรวจสอบยีนที่ถูกถ่ายโอนเข้าสู่ต้นยาสูบ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่คัดเลือกได้ (รูปที่ 4.14) และตรวจสอบหาชิ้นที่แทรกอยู่ในดีเอ็นเอของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเทียบกับดีเอ็นเอต้นยาสูบปกติด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่แทรกอยู่กับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ พบว่าต้นยาสูบคัดแปลงพันธุกรรม โคลนลำดับที่ 1 ถึง 28 ได้รับการถ่ายโอนยีน โครงสร้าง DFR ดังรูป 4.15



รูปที่ 4.14 ผลการสกัดดีเอ็นเอของต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมของยีน โครงสร้าง *DFR* โคลนที่ 1 ถึง 28 เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ผลการทำพีซีอาร์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโครงสร้าง *DFR* โคลนที่ 1 ถึง 28 และคั้นปกติ (N) โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (M)

#### 4.4 ผลของความเครียดจากความเค็มและความแห้งแล้งที่มีต่อการแสดงออกของต้นยาสูบทดลอง

เมื่อนำต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม (ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุม *TT8* ยีนโครงสร้าง *F3'H* และ *DFR*) และต้นยาสูบปกติที่มีลักษณะสมบูรณ์และอายุใกล้เคียงกัน มาเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความเครียดจากความเค็มของโซเดียมคลอไรด์ หรือความแห้งแล้งจากน้ำตาแลแมนนิทอลที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ทั้งสองการทดลอง ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของต้นยาสูบทดลอง

#### 4.4.1 ผลการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่ตอบสนองต่อความเครียดทางความเค็มและความแห้งแล้งของต้นยาสูบทดลอง

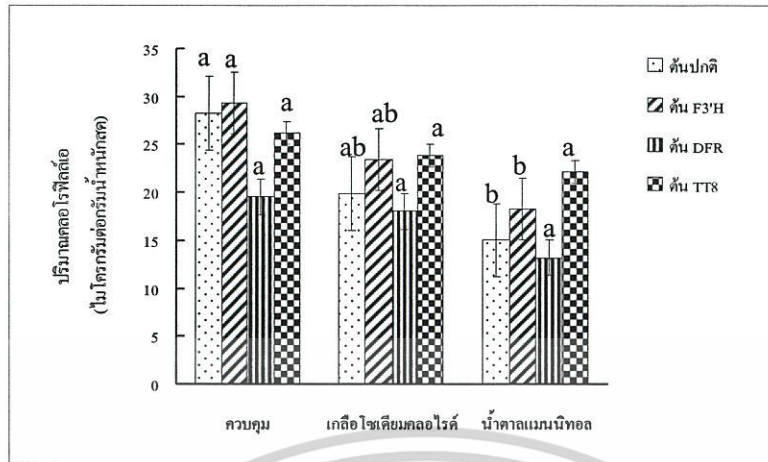
##### 4.4.1.1 การเปลี่ยนแปลงของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

ปริมาณของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของพืชได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ในหน่วยไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด (รูปที่ 4.16) ต้นยาสูบที่ได้รับสภาวะเครียดมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาโดยตรวจสอบที่การผลิตคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ พบว่าทุกสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ และแมนนิทอลมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับต้นยาสูบชุดควบคุม โดยการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์เอ เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ สายพันธุ์ F3'H สายพันธุ์ DFR และสายพันธุ์ TT8 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 29.52, 20.30, 7.66, และ 8.98 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่การลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์เอ เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอล ต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ F3'H มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 46.17 และ 37.75 ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ DFR และสายพันธุ์ TT8 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 32.37 และ 15.55 ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

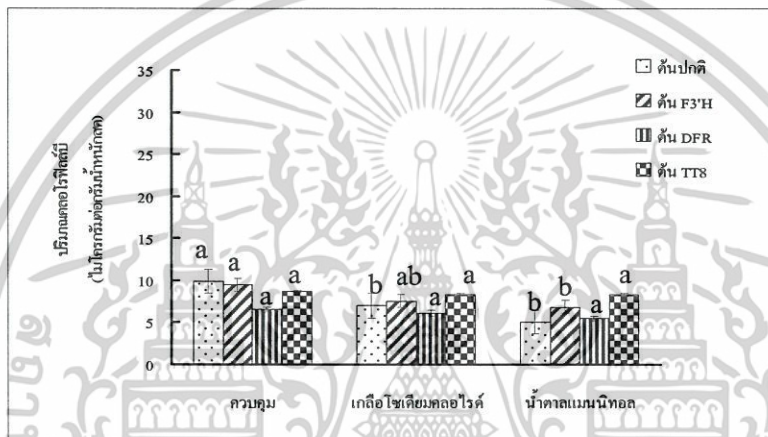
ปริมาณคลอโรฟิลล์บีของต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือน้ำตาลแมนนิทอล พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 29.51 และ 49.04 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ต้นยาสูบสายพันธุ์ F3'H เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอลมีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 27.57 และมีความแตกต่างทางสถิติ ต้นยาสูบสายพันธุ์อื่นๆ มีปริมาณคลอโรฟิลล์บีลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต้นยาสูบสายพันธุ์ F3'H สายพันธุ์ DFR และสายพันธุ์ TT8 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 20.38, 7.12 และ 4.31 ตามลำดับ และเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอล ยาสูบสายพันธุ์ DFR และสายพันธุ์ TT8 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 16.46 และ 4.84 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

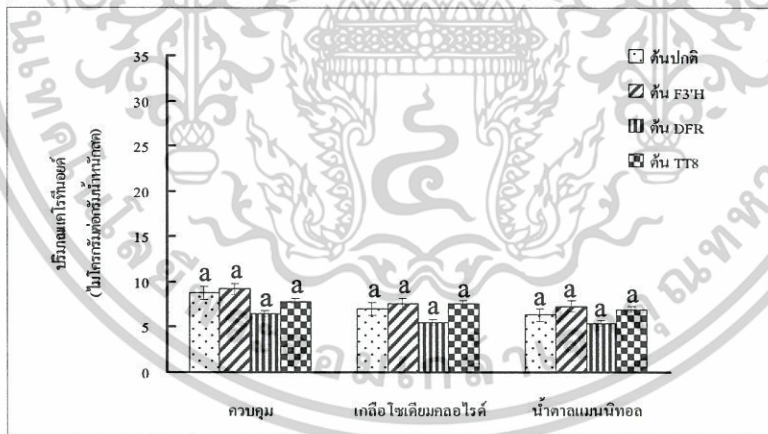
(ก)



(ข)



(ค)



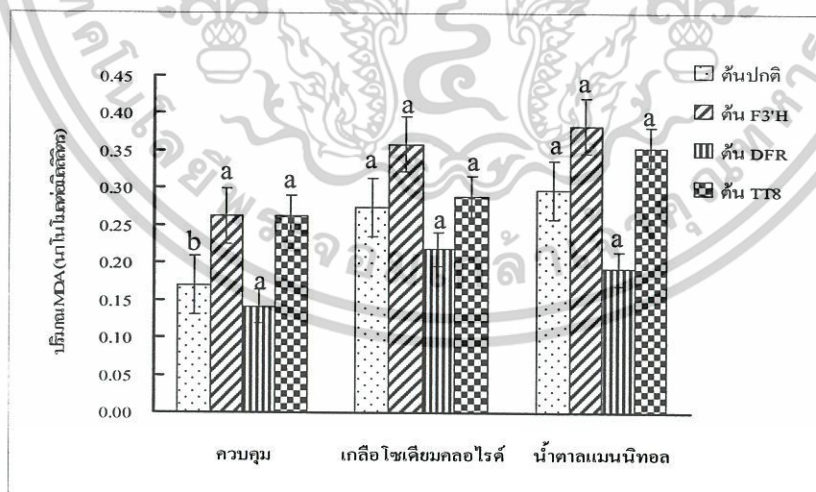
รูปที่ 4.16 ปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์เอ (ก) คลอโรฟิลล์บี (ข) และแคโรทีนอยด์ (ค) ของต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจากยีน (*F3'H*, *DFR* และ *TT8*) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ อักษรเหมือนกัน แสดงความไม่แตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ( $P \leq 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณแคโรทีนอยด์ พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ สายพันธุ์ F3'H สายพันธุ์ DFR และสายพันธุ์ TT8 มีเปอร์เซ็นต์การลดลงเมื่อได้รับการทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 19.83, 18.30, 15.24 และ 2.79 ตามลำดับ และเมื่อได้รับการทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอลมีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 27.51, 21.21, 17.29 และ 11.51 ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างทางสถิติทั้งสองการทดลอง

#### 4.4.4.2 การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในต้นยาสูบ

การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในต้นยาสูบทดลอง โดยวิเคราะห์ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) ด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) และกรดไทโอบาร์บิวริก (thiobarbituric acid) กำหนดปริมาณ MDA ในหน่วยนาโนโมลต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 4.17) พบว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติมีปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล โดยมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นเท่ากับ 61.79 และ 75.40 ตามลำดับ ต้นยาสูบสายพันธุ์ F3'H สายพันธุ์ DFR และสายพันธุ์ TT8 เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นเท่ากับ 36.98, 54.76 และ 9.78 ตามลำดับ และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอล ต้นยาสูบสายพันธุ์ F3'H สายพันธุ์ DFR และสายพันธุ์ TT8 มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นเท่ากับ 46.32, 36.32 และ 34.88 ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน

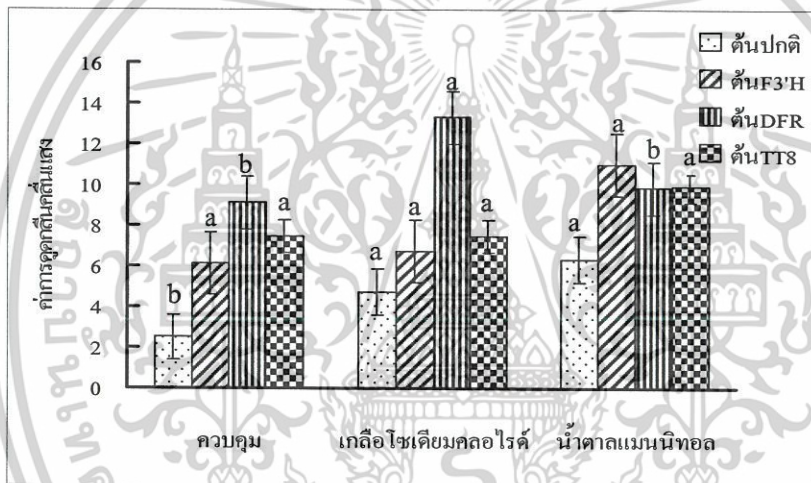


รูปที่ 4.17 ปริมาณสาร MDA ในสารสกัดจากต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจากยีน (*F3'H*, *DFR* และ *TT8*) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ อักษรเหมือนกัน แสดงความไม่แตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ( $P \leq 0.05$ )

#### 4.4.2 การผลิตสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของต้นพืชทดลองที่ตอบสนองต่อความเครียดทาง ความเค็มและความแห้งแล้ง

##### 4.4.2.1 สารกลุ่มฟลาวานอน

พบว่าสารแนรินเจนินของต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ และน้ำตาลแมนนิทอล ต้นยาสูบสายพันธุ์ DFR มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่สายพันธุ์ F3'H และสายพันธุ์ TT8 มีแนวโน้มของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอล แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจาก ดังรูปที่ 4.18



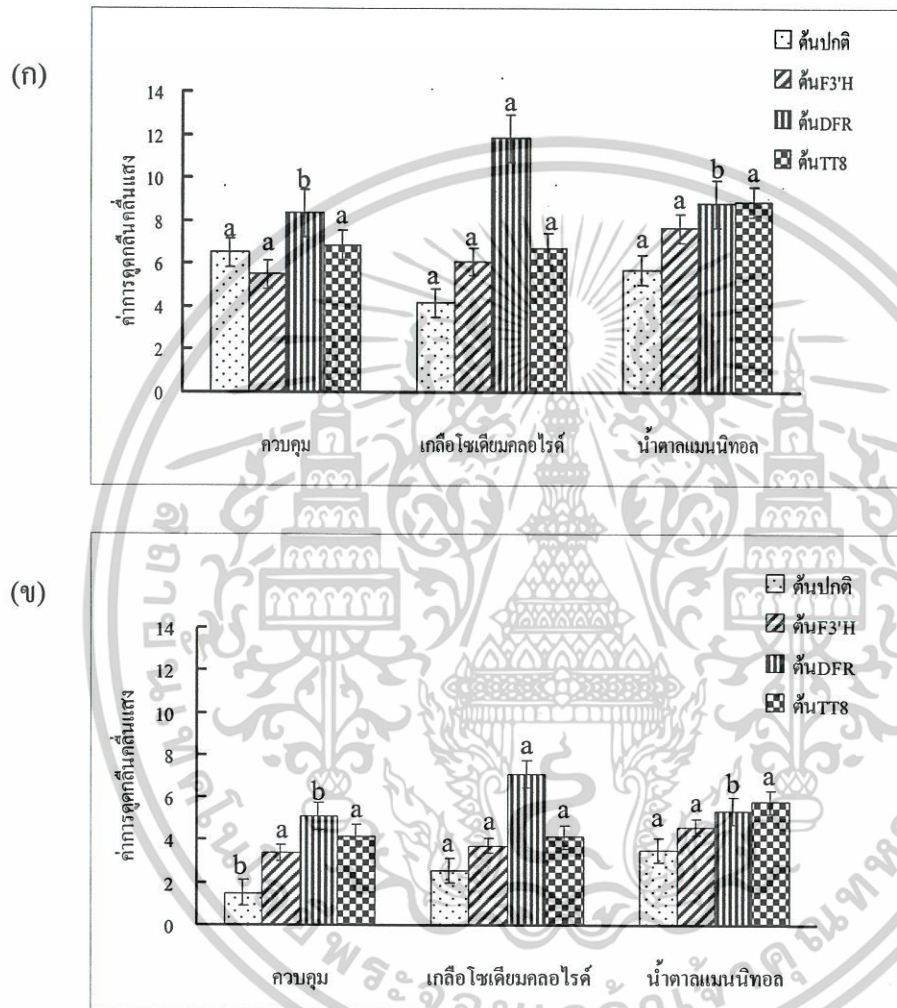
รูปที่ 4.18 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตรของสารแนรินเจนิน ที่สกัดได้จากต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมจากยีน (*F3'H*, *DFR* และ *TT8*) ของพืชสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ อักษรเหมือนกัน แสดงความไม่แตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ( $P \leq 0.05$ )

##### 4.4.2.2 สารกลุ่มฟลาโวน

ต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารลูทีโอลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ และน้ำตาลแมนนิทอล ต้นยาสูบสายพันธุ์ DFR มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพิ่มขึ้นของทั้งสองสาร เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

F3'H และสายพันธุ์ TT8 มีค่าการดูดกลืนคลีนแสงของทั้งสองสาร ภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอลมากกว่าสภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ดังรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 336 และ 350 นาโนเมตร ของสารอะพิจินิน (ก) และสารลูทิโอลิน (ข) ที่สกัดได้จากต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมจากยีน (*F3'H*, *DFR* และ *TT8*) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ อักษรเหมือนกัน แสดงความไม่แตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ( $P \leq 0.05$ )

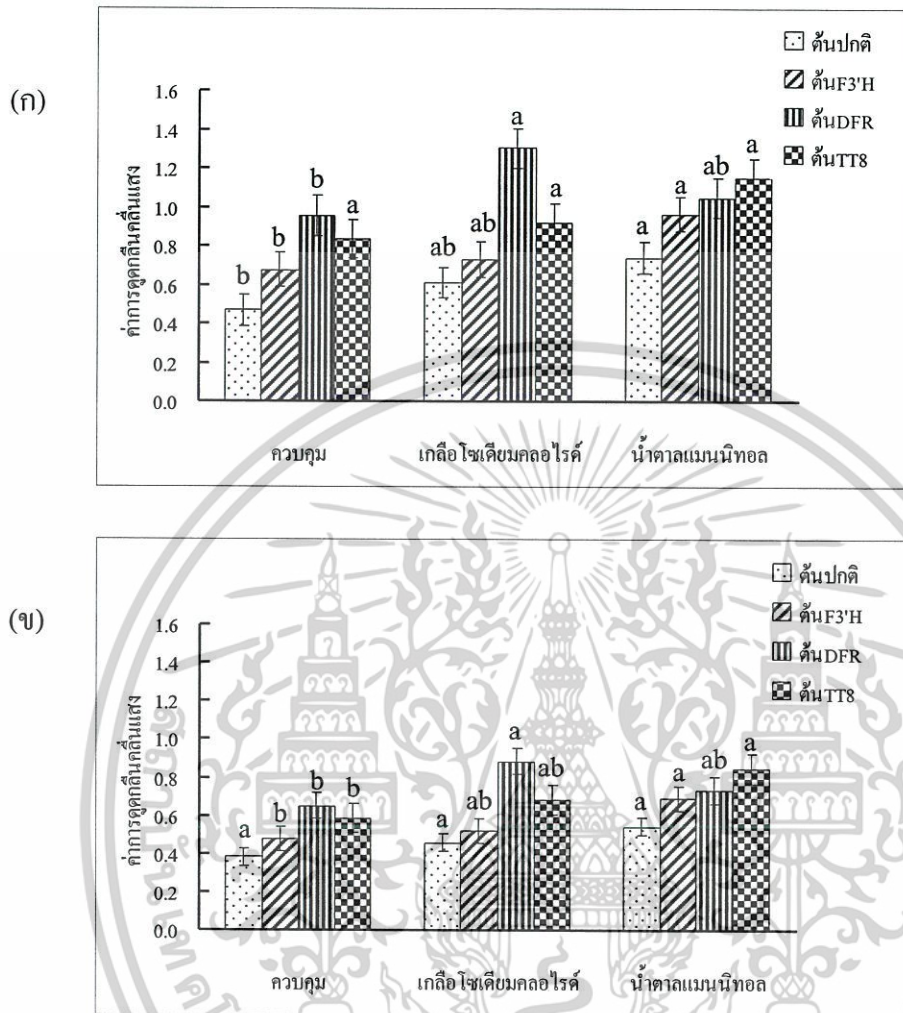
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2.3 สารกลุ่มเฟลโวนอล

สารเคเอ็มพีรอล และสารเคเวอร์เซตินในต้นยาสูบสายพันธุ์ DFR และสายพันธุ์ F3'H มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ และน้ำตาลแมนนิทอล ตามลำดับ ต้นยาสูบสายพันธุ์ TT8 มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารเคเวอร์เซติน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอล ในขณะที่ต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติมีค่าการดูดกลืนคลื่นของสารเคเอ็มพีรอล เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอล ดังรูป 4.20

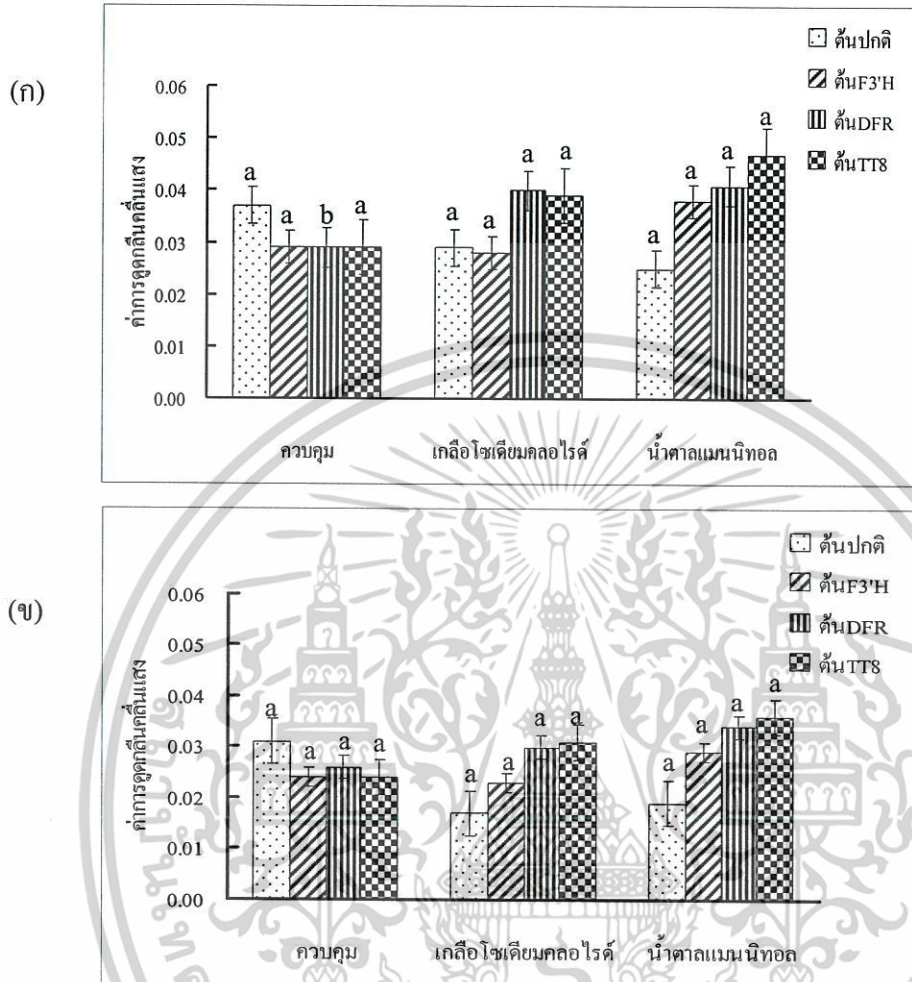
#### 4.4.2.4 สารกลุ่มแอนโทไซยานิน

สารเพลาโกนินดินของต้นยาสูบสายพันธุ์ DFR มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่สายพันธุ์ปกติมีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารเพลาโกนินดิน และไซยานิดินลดลงเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะเครียดทั้งจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์และน้ำตาลแมนนิทอล แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบสายพันธุ์ TT8 มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์และน้ำตาลแมนนิทอล ต้นยาสูบสายพันธุ์ F3'H มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำตาลแมนนิทอล แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ดังรูป 4.21



**รูปที่ 4.20** ผลการวัดค่าการดูดกลืนแห้งที่ความยาวคลื่น 368 และ 374 นาโนเมตร ของสารเคเอ็มพี-รอล (ก) และสารเคเวอร์เซดิน (ข) ที่สกัดได้จากต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และต้นยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมจากยีน (*F3'H*, *DFR* และ *TT8*) ของชีวสังเคราะห์ฟลัโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ อักษรเหมือนกัน แสดงความไม่แตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ( $P \leq 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.2** ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 535 นาโนเมตร ของเพลตาโกนินดิน (ก) และสารไซยานินดิน (ข) ที่สกัดได้จากต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ และต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมจากยีน (*F3'H*, *DFR* และ *TT8*) ของชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลแมนนิทอล ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 4 ซ้ำ อักษรเหมือนกัน แสดงความไม่แตกต่างทางสถิติในสารชนิดเดียวกัน จากการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย DMRT ( $P \leq 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนยีนโครงสร้าง *DFR* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสม และสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ *yT&A* และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้อ *E. coli* พบว่าโคลนที่ 2-11 มีการสอดแทรกของดีเอ็นเอของยีนโครงสร้าง *DFR* และ มีการสอดแทรกของดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* อย่างถูกต้อง ทําการเลือกโคลนที่ 3 และ 9 มาทําให้บริสุทธิ์เพื่อทําการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *pBI121*

ทําการตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่ออย่างถูกต้องจากโคลนที่ 3 และ 9 ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ *pBI121* ซึ่งมีส่วนที่สามารถแสดงออกได้ในพืช พบว่าโคลนที่ 3.5, 3.7, 3.19, 3.29 และ 9.2 มีการสอดแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน โครงสร้าง *DFR* อย่างถูกต้อง และได้เลือกโคลนที่ 9.2 มาทําการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ *LBA4404* และทําการนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงบนอาหาร *MS* สูตรชักนำแคลลัสที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าจำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ 48 ใบ จากจำนวนที่ใช้ในการทดลอง 50 ใบ คิดเป็นประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน 96 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดเลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ได้จำนวน 28 ต้น และตรวจสอบการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบ ด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากต้นยาสูบและทําเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *DFR* พบว่า ทุกต้นได้รับการถ่ายโอนยีนโครงสร้าง *DFR*

ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม สามารถทนต่อสภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ และน้ำตาลแมนนิทอลได้ดีกว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ ซึ่งตรวจพบได้จากการลดลงของปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง คือ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ ของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่น้อยกว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ ซึ่งบ่งบอกถึงการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ มีการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05ด้วยเหตุนี้จึงทําให้ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมสามารถทนต่อสภาวะความเครียดจากเกลือ โซเดียมคลอไรด์ หรือน้ำตาลแมนนิทอล และเกิดการสะสมสารกลุ่มฟีนอลิกได้ดีกว่าต้นยาสูบสายพันธุ์ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- กนกพร สมพรไพลิน. 2545. ผลของชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมสีในพืช. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 10: 23-27.
- คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. 2007. ฟลาโวนอยด์. [Online]. Available: <http://www.nstlearning.com/blog/?p=57>
- หัตถา กาวังศ์. 2548. อนุพันธุศาสตร์. เชียงใหม่, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- โสภา วัชรอุปต์, ปรีชา บุญจง, จัฑนา บุญยรัตน์ และมาลีรักษ์ อัคร์สินทอง. 2550. สารต้านอนุมูลอิสระ. นิวไทยมิตรการพิมพ์.
- Andersen, O.M., and Markham. K.R. 2006. Flavonoids Chemistry Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton.
- Arita Laboratory. 2007. What is flavonoid? [Online]. Available: <http://www.metabolome.jp/software/FlavonoidViewer>
- Bharti, A, and Khurana, J. 2003. Molecular characterization of *transparent testa (tt)* mutants of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Estland) impaired in flavonoid biosynthetic pathway. *Plant Sci.* 165: 1321-1332.
- Bovy, A., Schijlen, E., Tunen, A. and Vos, C. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochem.* 65: 2631-2648.
- Caboche, M., Debeaujon, I., Jond, C., Lepiniec, L. and Nesi, N. 2001. The Arabidopsis *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell.* 13: 2099-2114.
- Ramsey, D. 2006. Tobacco. [Online]. Available: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nicotiana\\_Tobacco\\_Plants\\_1909px.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nicotiana_Tobacco_Plants_1909px.jpg).
- Fetrow, J., Muday, G. and Winkel, B. 2001. Members of co-expression network centered on *AtF3'H* (*TT7*). [Online]. Available: <http://www.biol.vt.edu/faculty/winkel/lab/tools.html>.
- Froemel, S., de Vlaming, P., Stotz, G., Wlering, H., Forkmann, G. and Schram, A.W. 1985. Genetic and biochemical studies on the conversion of flavanones to dihydroflavonols in flowers of *Petunia hybrida*. *Theor. Appl. Genet.* 70: 561-568.
- González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S. and Tuñón, M.J. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp.* 22: 287-293.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Harborne, J.B. 1998. *Phytochemical Methods a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Kluwer Academic Publishers, London, U.K.
- Heller, W. and Forkmann, G. 1988. *Biosynthesis of Flavonoids*. In: Harborne, J.B. (ed.): *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*. Chapman and Hall, London, pp. 399-425.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. and Prange, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.
- Jakubowski, H. 2008. [Online]. Available:  
<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/pcr.gif>.
- Ithal, N. and Reddy, R.A. 2004. Rice flavonoid pathway genes, *OsDfr* and *OsAns*, are induced by dehydration, high salt and ABA, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, OsC 1-MYB. *Plant Sci.* 166: 1505-1513.
- Koes, R., Quattrocchio, F. and Verweij, W. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Plant Sci.* 10: 236-242.
- Kreuzaler, F., Ragg, H., Fautz, E., Kuhn, D.N., and Hahlbrock, K. 1983. UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Festuca hortense*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 2591-2593.
- Kuhn, B., Forkmann, G., and Seyffert, W. 1978. Genetic control of chalcone flavanone isomerase activity in *Callistephus chinensis*. *Planta* 138: 199-203.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148: 350-380.
- Linus Pauling Institute. 2009. Chemical Structures of Some Flavones. [Online]. Available:  
<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/flavone.html>.
- Martens, S. and Mithofer, A. 2005. Flavones and flavone synthases. *Phytochem.* 66: 2399-2407.
- Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J. and Vrijlandt, E. 1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1: 37-49.
- Nakamura, N., Mizutani, M., Tanaka, Y. and Ono, E. Method for producing yellow flower by controlling flavonoid synthetic pathway. U.S patent No.0009032, Jan 2008.
- Reif, H.J., Nlesbach, U., Deumling, B. and Saedler, H. 1985. Cloning and analysis of two genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida*. *MOI. Gen. Genet.* 199: 208-215.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Schoenbohm, C., Martens, S., Eder, C., Forkmann, G. and Weisshaar, B. 2000. Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. *Biol. Chem.* 381: 749-753.
- Shabala, S.N., Shabala, S.I., Martynenko, A.I., Babourina, O. and Newman, I.A. 1998. Salinity effect on bioelectric activity, growth,  $\text{Na}^+$  accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: a comparative survey and prospects for screening. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 609-616.
- Solvo Biotechnology. 2005. Effect of flavonoids on the P-Glycoprotein activity. [Online]. Available: <http://www.solvo.hu/Literature/Scienceletter/2/Scienceletter2.html>.
- Stotz, G., de Vlaming, P., Wiering, H., Schram, A.W. and Forkmann, G. 1985. Genetic and biochemical studies on flavonoid 3'-hydroxylation in flowers of *Btuniahybrida*. *Theor. Appl. Genet.* 70: 300-305.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

Bacto tryptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร
NaCl	10.0	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto tryptone	2.0	กรัมต่อลิตร
Bacto yeast extract	0.2	กรัมต่อลิตร
NaCl	0.0585	กรัมต่อลิตร
KCl	0.0186	กรัมต่อลิตร
MgCl <sub>2</sub>	10.0	มิลลิโมลาร์
MgSO <sub>4</sub>	10.0	มิลลิโมลาร์

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1.0	ลิตร
กลูโคสเข้มข้น 2 โมลาร์	10.0	มิลลิลิตร

## 4. อาหารสูตร MS

สูตรอาหาร MS	ชื่อสารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	จำนวนที่ใช้ (มิลลิกรัม)ต่อลิตร
stock 1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	100x	165
	$\text{KNO}_3$		192
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		37
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$		17
stock 2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100x	44
stock 3	$\text{H}_3\text{BO}_3$	1000x	3.1
	KI		0.415
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.125
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.0125
stock 4	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100x	2.23
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.86
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.0025
stock 5	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	100x	3.73
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		2.78
stock 6	Inositol	100x	5
	Nicotinic acid		0.025
	Pyridoxin HCl		0.025
	Thiamine HCl		0.005
	Glycine		0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### ขั้นตอนการทดลอง

1. การแยกดีเอ็นเอจากเจล (Amersham Biosciences Crop.)
  - 1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว คัดเจลส่วนที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้นใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก
  - 1.2 เติม capture buffer ลงในหลอดจากข้อ 1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตร ต่อ เจล หนัก 10 มิลลิกรัม
  - 1.3 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด
  - 1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เพื่อให้ของเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน
  - 1.5 ย้ายของเหลวในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กไปใส่ในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ (GFX column) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
  - 1.6 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์
  - 1.7 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
  - 1.8 ย้ายจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กหลอดใหม่ แล้วเติมน้ำปราศจากประจุที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดกับคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
  - 1.9 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ที่ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
  - 1.10 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก

## 2. การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์ด้วยวิธี heat-shock และการคัดเลือกโคลน

- 2.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์
  - 2.1.1 นำคอมพีเทนท์เซลล์ซึ่งเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส มาละลายโดยวางบนน้ำแข็ง
  - 2.1.2 ดูดคอมพีเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ซึ่งแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม ligation solution และผสมให้เข้ากัน โดยการปิเปตขึ้นลง วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
  - 2.1.3 นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.1.4 เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 2.2 การคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับเวกเตอร์ pBI121 ที่มีจีนดีเอ็นเอแทรกอยู่
- 2.2.1 เตรียมเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน
- 2.2.2 สเปรดเซลล์แขวนลอยที่เหลือนบนเพลตที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

### 3. การสกัดพลาสมิด

- 3.1 ถ่ายโอนโคโลนีเดี่ยวบนเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
- 3.2 นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเซลล์
- 3.3 เทส่วนอาหารทิ้ง เติม TBE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นวางหลอดบนน้ำแข็ง
- 3.4 เติม Solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติม Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 3.5 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 3.6 ย้ายของเหลวส่วนบนไปใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กใหม่ แล้วเติมเอทานอลที่เย็นจัดเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 3.7 นำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที
- 3.8 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 3.9 ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูหรือใช้เคซิเคเตอร์
- 3.10 ละลายดีเอ็นเอด้วย TBE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งมี *RNase* เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 3.11 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. การเตรียมเชื้อและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียโดยวิธี freeze-thaw (กนกพร, 2547)

- 4.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร LB โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำ สารละลายเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมา วางบนน้ำแข็ง 10 นาที
- 4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 4.3 เทส่วนบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาละลายในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง
- 4.4 นำเซลล์แขวนลอยในแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาดเล็กใหม่และผสมเวคเตอร์ที่มียีนที่สนใจประมาณ 10 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตดูด ขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง บนน้ำแข็ง
- 4.5 นำสารละลายนี้ใส่ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นน้ำแข็งแล้วนำมาบ่ม ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นเติมอาหาร LB 1 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า 200 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง
- 4.6 นำสารละลายดังกล่าว ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 4.7 เทอาหารส่วนบนทิ้งไป ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยอาหารสูตร LB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- 4.8 สเปรดเซลล์บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน

#### 5. การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (กนกพร, 2547)

- 5.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ในอาหารเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะ คานามัยซิน นานข้ามคืน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที
- 5.2 นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตรมาใส่ในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรประมาณ 0.8
- 5.3 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 5.4 เทส่วนอาหารทิ้งไป แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลายซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์กับ Tween-80 0.5 เปอร์เซ็นต์
- 5.5 นำใบยาสูบที่ปราศจากเชื้อมาทำให้เกิดบาดแผลโดยตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสและ

จุ่มในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 6.4 เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ภายใต้การสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 5.6 นำชิ้นส่วนของพืชดังกล่าววางบนเพลต ที่มีกระดาษทิชชูซึ่งปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียส่วนเกินออก
- 5.7 วางชิ้นส่วนของพืชบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่
- 5.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้อสงอย่างต่อเนื่อง 3 วัน หลังจากบ่มเนื้อเยื่อประมาณ 3 วัน อะโกราแบคทีเรียจะย้ายส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ตรงบริเวณรอยตัดของพืช และ T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพืช
- 5.9 ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ ที่สามารถฆ่าอะโกราแบคทีเรียได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ภายใต้อสงอย่างต่อเนื่อง
- 5.10 ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชบนอาหารใหม่ตามข้อ 5.9 ทุกๆ 2 สัปดาห์และคัดเลือกต้นที่คาดว่าจะได้รับยีน

## 6. การสกัดดีเอ็นเอจากพืช (กนภพร, 2548)

- 6.1 ใส่ใบไม้ 50-100 มิลลิกรัมในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 150 ไมโครลิตร
- 6.2 ใช้แท่งแก้วบดละเอียดจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.3 เติมสารละลายสกัดดีเอ็นเอ 300 ไมโครลิตร และสารละลายผสม phenol/chloroform/isoamylalcohol 450 ไมโครลิตร แล้วปิดฝาและเขย่า 1 นาที
- 6.4 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 6.5 นำสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 2 เท่าผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดไปมา
- 6.6 วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 6.7 เทของเหลวทิ้ง ล้างส่วนตะกอนข้างล่างด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 500 ไมโครลิตร
- 6.8 ปั่นด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 6.9 เทของเหลวทิ้ง และทำให้แห้ง (คว่ำบนกระดาษซับที่สะอาด)
- 6.10 ละลายตะกอนใน TBE ซึ่งมี RNase ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ประมาณ 50 ไมโครลิตร
- 6.11 นำสารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร นำมาหยอดใน เจลอะกาโรส 1เปอร์เซ็นต์ เพื่อดูปริมาณดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้