

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การแสดงออกของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) ใน
ลั่นมังกกร (*Antirrhinum majus*) และการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ยีน 4'CGT
ของลั่นมังกกรในบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)

EXPRESSION OF CHALCONE 4'-O-GLUCOSYLTRANSFERASE (4'CGT) IN
SNAPDRAGON (*ANTIRRHINUM MAJUS*) AND OVEREXPRESSION OF
SNAPDRAGON 4'CGT IN LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA* GAERTN.)



วรวุฒิ เอี่ยมมงคลการ

WORRAWOOT AUEMONGKOLGARN

อพ.
๗๒๘๕๗
๒๕๕๖

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน **132476**
วัน,เดือน,ปี...18...ก.ค...2557

b.1๒๖๐๗๘๙๙
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. ๒๕๕๖

KMITL-2013-AG-M-101-150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**EXPRESSION OF CHALCONE 4'-O-GLUCOSYLTRANSFERASE (4'CGT) IN
SNAPDRAGON (*ANTIRRHINUM MAJUS*) AND OVEREXPRESSION OF
SNAPDRAGON 4'CGT IN LOTUS (*NELUMBO NUCIFERA* GAERTN.)**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2013

KMITL-2013-AG-M-101-150

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2013

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) ในลิ้นมังกร (<i>Antirrhinum majus</i>) และการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ยีน 4'CGT ของลิ้นมังกรในบัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.)
นักศึกษา	วรวิภา เอี่ยมมงคลการ
รหัสประจำตัว	52640909
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2556
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์

บทคัดย่อ

เอนไซม์ chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) มีบทบาทสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์สารกลุ่มออโรนซึ่งให้สีเหลืองในพืชบางชนิด การศึกษาการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลิ้นมังกร (*Antirrhinum majus*) สีต่างๆ ประกอบด้วย สีส้ม สีชมพู สีแดง สีม่วง สีขาวและสีเหลือง ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงโดยใช้ข้อมูลในธนาคารยีน (GenBank) พบว่าดอกสีเหลืองมีการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุด รองลงมาคือดอกสีส้ม แดง ขาว ชมพู และม่วง ตามลำดับ จากนั้นได้สังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน 4'CGT ขนาด 313 นิวคลีโอไทด์ จาก cDNA ของกลีบดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells สีเหลือง เพื่อโคลนเข้าสู่พลาสมิด pJAWOHL8 ด้วยเทคโนโลยี Gateway เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT แบบชั่วคราวด้วยวิธี Agro-infiltration เข้าสู่กลีบดอกลิ้นมังกรสีเหลืองจำนวน 7 ดอก พบว่าระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT ลดลงจำนวน 4 ดอก คิดเป็น 57 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกในทุกการทดลอง

เตรียมดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT ที่มียีน 4'CGT ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์ ที่สังเคราะห์ได้จาก cDNA ของกลีบดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells สีเหลือง ยีน neomycin phosphotransferase (*NPTII*) เป็นยีนคัดเลือก และยีน β -glucuronidase (*GUS*) เป็นยีนรายงานผล ถ่ายยีนเข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์ปทุมธานีโดยใช้อะโกรแบคทีเรียผสมสายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะ พบ shoot cluster ที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน 250 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 14 สัปดาห์ มีจำนวนยอดเฉลี่ย ขนาดยอดเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 2.52 ยอด

1.34 เซนติเมตรและ 36.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อสุ่มต้นที่รอดชีวิต 3 ต้น มาตรฐานของการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาดูงาน เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงออกของยีน *4'CGT*, *NPTII* และ *GUS* ด้วยวิธี RT-PCR สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ยีน *NPTII* และยีน *GUS* แต่ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนทั้ง 3 ต้น หยุดการเจริญเติบโตและตาย การถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคเพื่อนำพลาสมิด pCAM4'*CGT* เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวงพันธุ์บุณชริก โดยใช้แรงดันก๊าซฮีเลียม ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ร่วมกับระยะห่างของเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 เซนติเมตร พบ shoot cluster ที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 1 ต้น เมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ยีน *NPTII* และยีน *GUS* ด้วยวิธี RT-PCR สามารถตรวจพบการแสดงออกของทั้ง 3 ยีน และพบจุดสีน้ำเงินเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค GUS histochemical assay ในส่วนของใบและก้านใบ และเมื่อนำต้นบัวหลวงมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *4'CGT* และยีน *GUS* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่าสามารถตรวจพบทั้ง 2 ยีนที่แทรกอยู่ภายในโครโมโซมของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาค



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Expression of Chalcone 4'-O-Glucosyltransferase (<i>4'CGT</i>) in Snapdragon (<i>Antirrhinum majus</i>) and Overexpression of Snapdragon <i>4'CGT</i> in lotus (<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.)
Student	Worrawoot Auemongkolgarn
Student ID.	52640909
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2013
Thesis Advisor	Dr. Nonglak Parinthawong

ABSTRACT

Chalcone 4'-O-glucosyltransferase (*4'CGT*) enzyme is an important enzyme in the biosynthesis of aurone in some plants. Expression study of the *4'CGT* gene in various color of snapdragon flower (*Antirrhinum majus*) was conducted using gene specific primers designed from database in GenBank. The highest expressed of *4'CGT* gene was found in yellow, orange, red, white, pink and violet flower, respectively. The fragment of 313 bp of *4'CGT* gene from cDNA of snapdragon var. Pixie Bells was inserted into pJAWOHL8 using the Gateway technology for RNAi-mediated gene silencing. The plasmid pJAWOHL8 or pJA8-*4'CGT* was introduced into petals of *A. majus*. using Agro-infiltration technique. The result showed that, *4'CGT* in 4 lines out of 7 lines, or 57% of tested lines, were found to down-regulated. However, change of petal's color could not be observed in any experiments.

The plant transformation vector, pCAM*4'CGT* plasmid was constructed to contain the 1,374 bp of *4'CGT* gene synthesized from cDNA of snapdragon var. Pixie Bells, neomycin phosphotransferase (*NPTII*) gene as a selectable marker gene, and β -glucuronidase (*GUS*) gene as a reporter gene. The *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harboring the construct was used to transform to the shoot clusters of lotus (*Nelumbo nucifera* cv. Buntharik). The survived shoot cluster from selective medium with BA at 50 μ M, amoxicillin 250 mg/l and kanamycin 50 mg/l at 14 weeks-old gave the average number of shoot, average size and percentage of survival shoot clusters at 2.52 shoots, 1.34 cm. and 36.5%, respectively. The 3 lines of survived shoot clusters were randomly selected to examine the expression of *4'CGT*, *NPTII* and *GUS* gene, using RT-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR technique. The expression of *4'CGT*, *NPTII* and *GUS* gene was found in all 3 selected lines but the growth of transgenic plant was stopped and died.

The pCAM4'*CGT* vector was introduced into the shoot clusters of lotus using particle bombardment. The technique was conducted under the pressure of 1,100 psi and the target distance was 9 cm. One shoot was found to survive on the selective MS medium with 50 μ M BA and kanamycin at the concentration of 50 mg/l. The expression of *4'CGT*, *NPTII* and *GUS* gene was found in the survived shoot cluster when using RT-PCR technique. GUS histochemical assay was used to monitor an enzyme activity and the blue spots were found in both tissues from leaf and leaf stalk. The transgenic lotus was determined for the presence of *4'CGT* and *GUS* genes which they were found to integrate in the lotus chromosome when using Southern blot hybridization technique.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำตลอดจนแนวทางแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านอาจารย์และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุเมธ อรัญนารถ ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตียว ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพางและ ดร. ลำแพน ขวัญพูลที่กรุณาให้ความรู้ตลอดจนคำแนะนำระหว่างการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดีและที่กรุณาสละเวลามารับผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณนันทยา นุชนารถ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ หมวดเพาะชำ สวนหลวง ร. ๕ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดินมังกกรเพื่อใช้ในการงานวิจัย ขอขอบพระคุณ คุณ Sebastian Schomack ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสติก pJAWOHL8

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม และทุนสนับสนุนทำเล่มวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตศึกษาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ ให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณวิฑิตา สาริตวิท โกชัย คุณเวตาลิณี ลีทวีทรัพย์ คุณรวีรัฐ บัวทอง คุณชัยวรกุล ไชยปัญญา คุณปฤษฎางค์ อะโน และคุณสุนิสา บุญใช้ ที่ให้ความช่วยเหลือต่างๆ ในงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาอื่นๆ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
วรวุฒิ เอี่ยมมงคลการ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XIII
สารบัญภาพ.....	XV
รายการคำย่อและสัญลักษณ์.....	XIX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 สมมติฐานของการศึกษา.....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของดินมังกรและบัวหลวง.....	3
2.2 ฟลาโวนอยด์.....	4
2.2.1 ชาลโคนและออโรน.....	6
2.2.2 ฟลาวานอลและไดไฮโดรฟลาโวนอล.....	6
2.2.3 ฟลาโวนอล.....	6
2.2.4 ฟลาโวน.....	6
2.2.5 ไอโซฟลาโวนอยด์.....	6
2.2.6 แอนโทไซยานิน.....	6
2.3 ความสำคัญของเอนไซม์ Chalcone 4'-O-glucosyltransferase.....	7
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสีดอก.....	8
2.5 การควบคุมการแสดงออกของยีน.....	9
2.5.1 การควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเทคนิค antisense RNA.....	9
2.5.2 การควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเทคนิค RNA interference (RNAi).....	10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6 เทคโนโลยีเกตเวย์ (Gateway technology).....	12
2.7 การถ่ายฝากยีนในพืช	13
2.7.1 การถ่ายฝากยีนโดยตรง (direct gene transfer).....	13
2.7.2 การถ่ายฝากยีน โดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation).....	13
2.7.3 การถ่ายฝากยีน โดยใช้เข็มฉีด (microinjection).....	15
2.7.4 การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (Agrobacterium).....	15
2.7.5 การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment).....	15
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช.....	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	18
3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย.....	18
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
3.2.1 ศึกษาการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินมังกรสีต่างๆ ด้วย เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR).....	21
3.2.1.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ.....	21
3.2.1.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่า ดูดกลืนแสง และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	22
3.2.1.3 การกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนในอาร์เอ็นเอ.....	22
3.2.1.4 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอ โดยเอนไซม์ reverse transcriptase.....	22
3.2.1.5 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอก ลินมังกรด้วยวิธีการ semi-quantitative PCR.....	22
3.2.1.5.1 การปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นให้เท่ากันด้วย ปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนอ้างอิง.....	22
3.2.1.5.2 การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลินมังกรแต่ละสีด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกกลีบมังกรภายหลังการยับยั้งด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi).....	24
3.2.2.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับศึกษาหน้าที่ของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค RNA.....	24
3.2.2.2 การสังเคราะห์ยีนบางส่วนของ 4'CGT ขนาด 307 นิวคลีโอไทด์ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	24
3.2.2.3 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมระหว่างยีนบางส่วนของ 4'CGT กับพลาสมิด pJAWOHL8 (pJA8-4'CGT).....	26
3.2.2.4 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนท์ของอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101.....	27
3.2.2.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรีย.....	27
3.2.2.6 การยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ในดอกกลีบมังกรแบบชั่วคราวด้วยวิธี Agro-infiltration.....	27
3.2.2.6.1 การเตรียมแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT.....	27
3.2.2.6.2 การนำเซลล์อะโกรแบคทีเรีย ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกกลีบมังกรด้วยวิธี Agro-infiltration.....	28
3.2.2.7 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกของกลีบมังกรที่ได้รับ พลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR.....	29
3.2.2.7.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ.....	29
3.2.2.7.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอโดยเอนไซม์ reverse transcriptase.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2.7.3	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอก ลีนมังกร ระหว่างกลีบที่ได้รับและไม่ได้รับ พลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR	29
3.2.3	การเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ยีน 4'CGT จากดอกลีนมังกร ในบัวหลวงพันธุ์ปทุมธานี	29
3.2.3.1	การสังเคราะห์ยีน 4'CGT ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์ จากดอกลีนมังกรด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์	29
3.2.3.2	การสร้างดีเอ็นเอสายผสมระหว่างยีน 4'CGT กับพลาสมิด pTZ57R/T (pTZ4'CGT)	30
3.2.3.3	การสร้างดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2301 ที่มียีน 4'CGT (pCAM4'CGT)	31
3.2.3.4	การเตรียมเซลล์คอมพีเทนท์ของอะ โกรแบคทีเรีย (<i>A. tumefaciens</i>) สายพันธุ์ EHA105	33
3.2.3.5	การถ่ายโอน pCAM4'CGT เข้าสู่อะ โกรแบคทีเรีย (<i>A. tumefaciens</i>) สายพันธุ์ EHA105	33
3.2.3.6	การถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง	33
3.2.3.6.1	การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับถ่ายยีน	33
3.2.3.6.2	การถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะ โกรแบคทีเรียเป็นพาหะ	34
3.2.3.6.3	การถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค	34
3.2.3.7	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน	36
3.2.3.7.1	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS ด้วยวิธี GUS histochemical assay	36
3.2.3.7.2	การเตรียมอาร์เอ็นเอของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน 4'CGT	36
3.2.3.7.3	การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอ โดยเอนไซม์ DNase I	37
3.2.3.7.4	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในบัวหลวง ที่ได้รับการถ่ายยีน	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.3.7.5	การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>GUS</i> และ <i>NPTII</i> ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน.....	38
3.2.3.7.6	การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> และ <i>F3H</i> ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรียและการยิงอนุภาคโดยวิธีการ semi-quantitative PCR.....	39
3.2.3.8	การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>4'CGT</i> และยีน <i>GUS</i> ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization.....	39
3.2.3.8.1	การสกัดดีเอ็นเอ.....	40
3.2.3.8.2	การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	40
3.2.3.8.3	การเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วย DIG.....	41
3.2.3.8.4	การตรวจสอบยีน <i>4'CGT</i> และยีน <i>GUS</i> ในโครโมโซมบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Southern blot hybridization.....	41
บทที่ 4	ผลการทดลอง.....	43
4.1	ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>4'CGT</i> ในกลีบดอกลินมังกรสีต่างๆ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR).....	43
4.2	การแสดงออกของยีน <i>4'CGT</i> ในกลีบดอกลินมังกรพันธุ์ Pixie Bells ภายหลังการยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>4'CGT</i> ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi).....	44
4.2.1	การสร้างดีเอ็นเอสายผสมรูปแบบ inverted repeat เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ในกลีบดอกลินมังกรพันธุ์ Pixie Bells.....	44
4.2.2	การตรวจสอบการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีน <i>4'CGT</i> ในพลาสมิด pCR8- <i>4'CGT</i> เข้าสู่พลาสมิด pJAWOHL8 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	46
4.2.3	ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>4'CGT</i> ของกลีบดอกลินมังกรพันธุ์ Pixie Bells ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pJAWOHL8 (pJA8 <i>4'CGT</i>).....	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.4 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT หรือ pJAWOHL8 เข้าสู่โอรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	48
4.2.5 ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกถั่วด้วยวิธีการ Agro-infiltration	49
4.2.5.1 ลักษณะกลีบดอกถั่วหลังการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT.....	49
4.3.5.2 การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR.....	49
4.3 การถ่ายยีน 4'CGT เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ปลูกทรินคโดยใช้โอรแบคทีเรียเป็น พาหะและการยิงอนุภาค.....	51
4.3.1 การตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT.....	51
4.3.2 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วนที่ถ่ายยีนด้วยวิธีโอรแบคทีเรียและ การตรวจสอบการแสดงออกยีน 4'CGT CHS F3H GUS และ NPTII.....	53
4.3.2.1 การเจริญเติบโตของ shoot cluster บัวหลวง ที่ผ่านการคัดเลือก ด้วยสารปฏิชีวนะกานามัยซินบนอาหารชักนำสูตร MS.....	57
4.3.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT, GUS และ NPTII หลังจากการถ่ายยีนโดยใช้โอรแบคทีเรียเป็นพาหะ.....	57
4.3.2.3 การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน CHS และยีน F3H ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR.....	58
4.3.3 การเจริญเติบโตของ shoot cluster ที่ถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคและการตรวจ สอบการแสดงออกยีน 4'CGT, CHS, F3H, GUS และ NPTII.....	59
4.3.3.1 การคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหาร MS ที่มีสาร ปฏิชีวนะกานามัยซิน.....	59
4.3.3.2 การเจริญเติบโตของ shoot cluster บัวหลวงหลังจากการถ่ายยีน.....	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>4'CGT</i> , <i>GUS</i> และ <i>NPTII</i> หลังจากการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาค.....	63
4.3.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>GUS</i> ของต้นบัวหลวงพันธุ์ปลูกทรักที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด <i>pCAM4'CGT</i> ด้วยวิธี <i>GUS</i> histochemical assay.....	64
4.3.3.5 การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> และยีน <i>F3H</i> ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR.....	64
4.3.3.6 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน <i>4'CGT</i> และยีน <i>GUS</i> ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Southern blot hybridization.....	66
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	69
5.1 การแสดงออกของยีน <i>4'CGT</i> ในกลีบดอกกลีบมงกรสีต่างๆ.....	69
5.2 การยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>4'CGT</i> ในกลีบดอกกลีบมงกรสีเหลืองพันธุ์ Pixie Bells ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi).....	70
5.3 การแสดงออกของยีน <i>4'CGT</i> ในบัวหลวงพันธุ์ปลูกทรัก ภายหลังจากการถ่ายยีน <i>4'CGT</i> โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะและการยิงอนุภาค.....	71
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	73
บรรณานุกรม.....	74
ภาคผนวก.....	82
ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	83
ภาคผนวก ข แผนที่พลาสมิด.....	92
ภาคผนวก ค ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	96
ภาคผนวก ง ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง.....	98
ประวัติผู้เขียน.....	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 จำนวนยอดเฉลี่ย ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ shoot cluster บนอาหาร MS ที่มี BA 50 ไมโคร โมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะม็อกซิซิลลิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการถ่ายยีนโดยใช้อะ โกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ครั้งที่ 1-5.....	55
4.2 จำนวนยอดเฉลี่ย ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ shoot cluster หลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคบนอาหาร MS และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโคร โมลาร์ ร่วมกับ กานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	61



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการ โคลนยีน ศึกษาการแสดงออกและหน้าที่ของยีน 4'CGT ในดอกลิ้นมังกรและบัวหลวง.....	97
2 ชนิดของพลาสติกเวกเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	99



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ดอกลิ้นมังกร.....	3
2.2 ดอกบัวหลวง, ปุณทริก, ปทุม, สัตตบุษย์, สัตตบงกช.....	5
2.3 โครงสร้างหลักของฟลาไวโนอยด์.....	5
2.4 วิธีการสังเคราะห์ฟลาไวโนอยด์ในกลุ่มออโรนในลิ้นมังกร (<i>Antirrhinum majus</i>).....	8
2.5 กระบวนการทำงานของ antisense RNA.....	9
2.6 กระบวนการทำงานของ RNAi.....	11
2.7 การสร้างเวกเตอร์ในระบบ Gateway เพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนในพืช.....	14
3.1 โครงสร้างของพลาสมิด pJAWOHL8.....	26
3.2 ตำแหน่งที่ฉีดเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT.....	28
3.3 ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่องยิงอนุภาครุ่น PDS 1000/He.....	36
4.1 ดอกลิ้นมังกรสีส้ม สีชมพู สีแดง สีม่วง สีขาว สีเหลืองที่ใช้ในการทดลอง.....	43
4.2 เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกลิ้นมังกรสีส้ม สีชมพู สีแดง สีม่วง สีขาว สีเหลือง ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR โดยใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนอ้างอิง.....	44
4.3 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ยีนบางส่วน 4'CGT จาก cDNA ของดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells.....	45
4.4 แผนภาพพลาสมิด pCR8-4'CGT ที่มีขนาด 3,130 นิวคลีโอไทด์และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ Eco RI.....	45
4.5 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน 4'CGT ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCR8-4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Eco RI.....	46
4.6 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA84'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III และ Xba I.....	47
4.7 แผนภาพพลาสมิด pJA8-4'CGT แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ F-pJAintron และไพรเมอร์ R-pJAintron และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hind III และ Xba I.....	48
4.8 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8-4'CGT ในอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 จำนวน 9 โคลนี ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ F-EcoRI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.9 ดอกกลั่นมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4' <i>CGT</i> ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบกับดอกกลั่นมังกรที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4' <i>CGT</i>	49
4.10 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 4' <i>CGT</i> ในกลีบดอกกลั่นมังกรที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 และกลีบดอกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4' <i>CGT</i> และมียีน 18S <i>rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง.....	50
4.11 ผลการตรวจสอบยีน 4' <i>CGT</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCAM4' <i>CGT</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI เปรียบเทียบกับพลาสมิด pCAM4' <i>CGT</i> ที่ไม่ได้ตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ พลาสมิด pCAMBIA2301 <i>CHS</i> ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พลาสมิด pCAM <i>CHS</i> ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Eco</i> RI.....	52
4.12 แผนภาพพลาสมิด pCAM4' <i>CGT</i> ที่มีชิ้นส่วนของยีน 4' <i>CGT</i> (pCAM4' <i>CGT</i>) ขนาด 1,374 นิวคลีโอไทด์แทรกอยู่.....	52
4.13 ผลการตรวจสอบ โคลโลนีที่ 1 และ โคลโลนีที่ 2 ของเซลล์อะโกรแบคทีเรียด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-CaMV และ R-NOS.....	53
4.14 การเจริญเติบโตของชิ้นส่วน shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารคัดเลือกภายหลังการถ่ายยีน โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะครั้งที่ 4 เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์.....	54
4.15 shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารชักนำสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ภายหลังการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4' <i>CGT</i> โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ อายุ 16 สัปดาห์.....	57
4.16 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4' <i>CGT</i> , <i>GUS</i> และ <i>NPTII</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4' <i>CGT</i> โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ.....	58
4.17 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน <i>CHS</i> และยีน <i>F3H</i> ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4' <i>CGT</i> โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ โดยเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติและมียีน 18S <i>rRNA</i> เป็นยีนอ้างอิง.....	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.18 การเจริญเติบโตของ shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT แบบการยิงอนุภาคครั้งที่ 1 และ shoot cluster ของบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT.....	60
4.19 ต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบการยิงอนุภาค อายุ 32 สัปดาห์ และ 40 สัปดาห์ บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์.....	62
4.20 ผลการสังเคราะห์ยีน 4'CGT, GUS และ NPTII ด้วยเทคนิค RT-PCR จาก cDNA ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยวิธีการยิงอนุภาค ครั้งที่ 1 และต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT.....	63
4.21 การติดสีน้ำเงินของชิ้นส่วนใบและก้านใบของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยวิธีการยิงอนุภาคเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนใบและก้านใบของต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT.....	65
4.22 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน CHS และยีน F3H ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยวิธีการยิงอนุภาค โดยเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ และยีน 18S rRNA.....	66
4.23 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization.....	67
4.24 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน GUS ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพผนวกที่	หน้า
1 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T.....	93
2 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pCR8.....	94
3 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pJAWOH8.....	94
4 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pCAMBIA2301.....	95
5 แผนที่ของพลาสมิดเวกเตอร์ pBI121.....	95



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

Kb	=	kilobase
RNA	=	ribonucleic acid
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
rRNA	=	ribosomal ribonucleic acid
DNA	=	deoxyribonucleic acid
PCR	=	polymerase chain reaction
α	=	alpha
β	=	beta
RT-PCR	=	reverse transcription polymerase chain reaction
M	=	molar
mM	=	millimolar
μ M	=	micromolar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บัวหลวง เป็นไม้้ำที่มีดอกสวยงามทั้งสีต้นและรูปร่าง ลักษณะของใบเป็นใบเดี่ยวเจริญขึ้นจากลำต้น โดยมีก้านใบส่งขึ้นมาเจริญที่ใต้น้ำ ผิวน้ำ หรือ เหนือน้ำ รูปร่างของใบส่วนใหญ่กลมมีหลายแบบ ออกดอกตลอดปี ชอบน้ำสะอาด ถิ่นกำเนิดของบัวอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บัวเป็นราชินีแห่งไม้้ำ จัดเป็นพันธุ์ไม้้ำที่ถือเป็นสัญลักษณ์ของคุณงามความดี ดอกบัวถือได้ว่าเป็นดอกไม้งามคู่ประชาชนและพุทธศาสนิกชนชาวไทยมาเนิ่นนาน (เสริมลาภ วสุวัต. 2547) ในทางพฤกษศาสตร์ สามารถจำแนกบัวหลวงได้เป็น 2 วงศ์ คือ บัวหลวงเอเชีย (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ให้ดอกสีขาวและชมพู และ บัวหลวงอเมริกัน (*Nelumbo lutea* Pers.) มีลักษณะเหมือนบัวหลวงในประเทศไทยและมีดอกสีเหลือง ปลูกในประเทศไทยได้แต่ไม่สามารถออกดอกได้ (ณรงค์ โฉมเฉลา. 2550) ซึ่งจะเห็นได้ว่าบัวหลวงในประเทศไทยยังคงขาดความหลากหลายของสีดอก จึงเป็นเป้าหมายหลักในการปรับปรุงพันธุ์ แม้ว่า การปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกไม้ประดับด้วยวิธีดั้งเดิมแบบผสมข้ามจะทำให้ได้ดอกไม้หลากหลายสีต้น แต่นักปรับปรุงพันธุ์ยังคงถูกจำกัดในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ด้วยข้อจำกัดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสีที่มีอยู่ในพืชแต่ละชนิด ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไม้ดอกเศรษฐกิจหลายชนิดให้มีสีตามที่ต้องการด้วยวิธีการผสมข้าม (คำรพ รัตนสุด. 2553)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อเปลี่ยนแปลงกระบวนการผลิตสารสีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหญ่และกลุ่มหลักที่ให้สีแก่พืช โดยศึกษาและถ่ายโอนยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญสำหรับการสังเคราะห์สาร aurone ที่ให้โทนสีเหลืองในดอกกลี้นม้งกร (Ono *et al.* 2006) เข้าสู่บัวหลวงเพื่อเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase ในกลีบดอกกลี้นม้งกรสีต่างๆ

1.2.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase แบบชั่วคราวภายหลังการยับยั้งการแสดงออกด้วยเทคนิค RNAi ในกลีบดอกกลี้นม้งกร

1.2.3 ศึกษาการแสดงออกของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase ภายหลังจากการถ่ายยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ปลูกด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียและเครื่องยิงอนุภาค

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการกลางโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.4 สมมติฐานของการศึกษา

ยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (*4'CGT*) ควรจะมีการแสดงออกมากที่สุดในดอกสีเหลืองและเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วย RNAi อาจส่งผลให้การแสดงออกของยีน *4'CGT* ลดลง ในขณะที่การใช้พลาสมิด pCAM*4'CGT* ร่วมกับอะโกรแบคทีเรียหรือเครื่องยิงอนุภาคในการถ่ายยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (*4'CGT*) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ปลูก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในชิ้นส่วนบัวหลวงที่รอดชีวิตจากอาหารคัดเลือก

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบผลการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกสีน้มนังกรสีต่างๆ

1.5.2 ทราบผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค RNAi ในกลีบดอกสีน้มนังกร

1.5.3 สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ภายหลังจากการถ่ายยีน *4'CGT* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ปลูกด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะหรือด้วยวิธีการใช้เครื่องยิงอนุภาค

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลีนมังกรและบัวหลวง

ลีนมังกรมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Antirrhinum majus* อยู่ในวงศ์ Scrophulariaceae มีชื่อสามัญว่า snapdragon มีถิ่นกำเนิดในแถบเมดิเตอร์เรเนียน เป็นพืชฤดูเดียว ทรงพุ่มเตี้ย ดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ทำให้ผสมเกสรง่าย เกสรตัวผู้ 4 อัน การออกดอกของ snapdragon จะตอบสนองต่อความยาวช่วงแสงและอุณหภูมิ (นงนุช จงจิระศิริ. 2522)

ลีนมังกร เป็นไม้ดอกที่มีดอกสวยงาม ดอกบานได้นาน ทนและมีกลิ่นช่อดอกยาว มีกลิ่นหอมเล็กน้อย ต้นสูง 15-80 ซม. ลำต้นตั้งตรง ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามรูปใบหอก แฉก ปลาย และโคนเรียวแหลม ดอกมีหลายสี เช่น สีเหลือง แดง ม่วง ขาว และในบางพันธุ์มีหลายสีในดอกเดียวกัน เช่น ขาวกับม่วง น้ำตาลแซมแดง หรือ เหลือง เป็นต้น (ภาพที่ 2.1) ดอกมี 2 ประเภท คือ ประเภทแรกมีลักษณะ snapping คือ ถ้าบีบด้านข้างดอกกลีบบนและกลีบล่างจะแยกจากกัน เรียกดอกชนิดนี้ว่าดอกมาตรฐาน อีกประเภทหนึ่งกลีบดอกจะแบกว้างและเห็นคอดอกชัดเจน ดอกจะใหญ่และบานนาน แต่ไม่มีลักษณะ snapping เรียกดอกแบบนี้ว่า ดอกเบบอเซเลีย (azalea flowered) ช่อดอกเป็นแบบ spike เป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ทำให้ผสมเกสรง่าย (แววไว รัตนะ สาขา. 2511)



ภาพที่ 2.1 ดอกลีนมังกร

ที่มา http://www.virtualflowers.com.au/annuals_snapdragon.asp

บัวหลวงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn มีชื่อสามัญว่า lotus มี 2 กลุ่มย่อย ประกอบด้วย ปทุมชาติซึ่งโลกตะวันออก (*N. nucifera*) มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *N. nucifera* Gaertn. และปทุมชาติซึ่งโลกตะวันตก (*N. lutea*) มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ ให้ดอกสีเหลือง นักพฤกษศาสตร์ให้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *N. lutea* Pers. ให้ดอกเฉพาะทางซีกโลกตะวันตก ในไทยปลูกได้แต่ไม่ให้ดอก (ปริมลาภ ชูเกียรติมัน และเสริมลาภ วสุวัต. 2547) (ภาพที่ 2.2) บัวเป็นพันธุ์ไม้น้ำที่ถือว่าเป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์ผุดผ่องและคุณงามความดีในพุทธศาสนา เป็นพันธุ์ไม้น้ำสง่างาม ดอกมีขนาดใหญ่ มีสีอันสวยงาม เด่นสะดุดตาสะใจแก่ผู้พบเห็น บางชนิดมีกลิ่นหอมน่าชื่นชมด้วยเหตุนี้เองบัวจึงได้รับสมญาว่า “ราชินีแห่งไม้น้ำ” (นิติศาสตร์ อารมย์ ดี. 2549) โดย จีน ฉู่ปุ่น อินเดีย อียิปต์ ต่างก็อ้างว่าได้พบบัวหลวงนี้ก่อน แต่ออกมาเป็นชื่อ Hindu lotus เพราะอินเดียเคยเป็นอาณานิคมของอังกฤษ และคนอินเดียส่วนใหญ่นับถือศาสนาพราหมณ์ หรือฮินดู จึงเรียกเป็นภาษาสามัญว่า Hindu lotus (วาสนา มิตรานนท์. 2527) นอกจากทางด้านศาสนาแล้วยังพบว่าบัวเข้ามาเกี่ยวข้องกับงานทางด้านศิลปะแขนงต่างๆ ทั้งจิตรกรรม ประติมากรรม และสถาปัตยกรรม

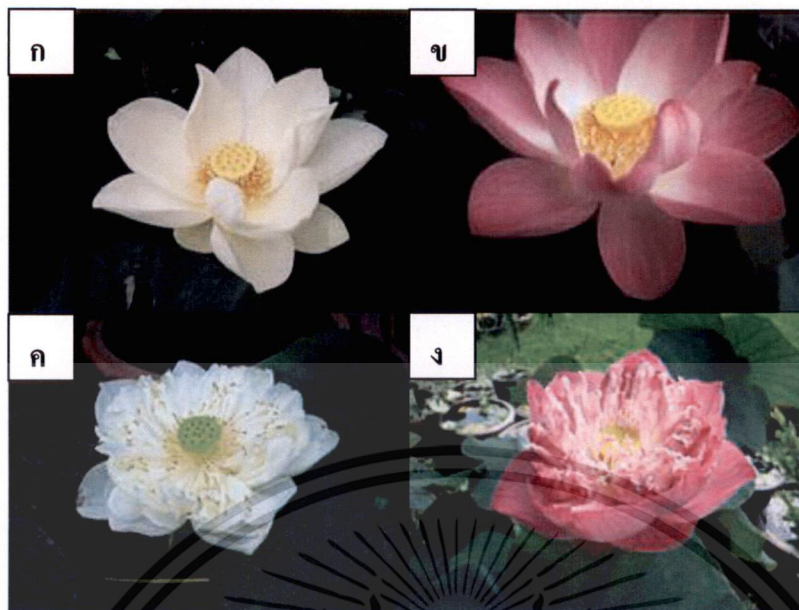
นอกจากบัวหลวงแล้วในประเทศไทยยังพบบัวอีกวงศ์ คือ วงศ์ Nymphaeaceae โดยแบ่งเป็น 2 สกุล คือ สกุล *Nymphaea* ชื่อสามัญภาษาสากล คือ water lily มีชื่อเรียกทั่วไปว่า “อูบลชาติ” หรือ “บัวสาย” เป็นบัวก้านอ่อนส่งใบลอยผิวน้ำ ได้แก่ บัวฝรั่ง บัวผันบัวเผื่อน บัวจงกลนี บัวนางกวัก บัวยักษ์ออสเตรเลีย และสกุล *Victoria* บัววิกตอเรีย มีชื่อเรียกกันทั่วไปว่า บัวกระดัง มีขนาดใหญ่ที่สุด ขอบใบยกขึ้นตั้งตรง คล้ายกระดังมีหนามแหลม บัวแต่ละสกุลมีความหลากหลายต่างกัน ในปัจจุบันมีทั้งสายพันธุ์แท้และสายพันธุ์ลูกผสมมากมายและบัวยังมีประโยชน์อีกมากในเรื่องของสมุนไพรอีกด้วย (เสริมลาภ วสุวัต. 2547)

2.2 ฟลาโวนอยด์

สีของดอกไม้แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของรงควัตถุ (pigment) เช่น กลุ่ม เบตาเลอิน (betalain) ให้โทนสีในช่วงสีเหลืองจนถึงสีแดง กลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นเม็ดสีไม่ละลายน้ำที่นอกจากจะมีบทบาทในการสังเคราะห์แสงแล้วยังพบในโครโมพลาสต์ (chromoplast) ของเนื้อเยื่อกลีบดอกไม้เช่นกัน ให้โทนสีในช่วงสีเหลืองถึงส้ม และกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นเม็ดสีที่ละลายน้ำ สะสมอยู่ในแวคิวโอล (vacuole) ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มหลักที่ให้สีแก่พืช มีโทนสีกว้างตั้งแต่สีเหลืองอ่อน จนถึงแดง ม่วง และน้ำเงิน (มณฑินี ชีรารักษ์. 2550)

ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่ทำให้เกิดสีต่างๆ ของพืชในธรรมชาติ แบ่งออกตามโครงสร้างได้มากกว่า 10 กลุ่ม และในแต่ละกลุ่มยังแบ่งออกเป็นชนิดต่างๆ ได้อีก จากการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 ทำให้ทราบถึงบทบาทของฟลาโวนอยด์ในด้านต่างๆ ต่อพืชและสิ่งแวดล้อมอันรวมถึงมนุษย์

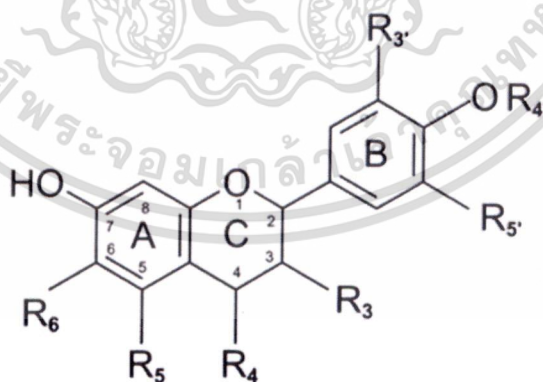
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 ดอกบัวหลวง ปุณทริก (ก), ปทุม (ข), สัตตบุษย์ (ค), สัตตบงกช (ง)

ที่มา www.thaiwaterlily.com/show_page.php?topic_id=144&auto_id=4&TopicPk=

และสัตว์ ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่มีคาร์บอน 15 ตัว จัดเรียงตัวในระบบ 3 วง คือ วงฟีนิล (phenyl ring) 2 วง และวงแลคโตน (lactone ring) 1 วง (ภาพที่ 2.3) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตามตำแหน่งต่างๆ ทำให้เกิดอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์มากมายหลายชนิด (ชมพูนุช และณัฐกานต์. 2546, Deroles *et al.* 2000)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์ (A และ B เป็นวงฟีนิล, C เป็นวงแลคโตน และ R_n คือตำแหน่งที่เกิดการเติมหมู่ไฮดรอกซี) (Patel. 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ชาลโคนและออโรน

สารนี้มีโครงสร้างที่วงแลคโตนผิดจากกลุ่มอื่นๆ เมื่อสัมผัสแอมโมเนียจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดงจึงเรียกลักษณะนี้ว่า antochlor chalcone ให้สีเหลืองเข้มได้แก่ สีของดอกไม้ในวงศ์ Compositae วงศ์ Oxidaceae วงศ์ Scrophulariaceae วงศ์ Liliaceae และวงศ์ Acanthaceae เป็นต้น สารออโรนพบในดอก ใบ เปลือก และเนื้อไม้ที่มีสีเหลืองทอง เช่น sulfurein ในดอกกรักร์ (*Dahlia* spp.) และ hispidol glucoside ในถั่วเหลือง (Tanaka *et al.* 1998)

2.2.2 ฟลาโวนอลและไดไฮโดรฟลาโวนอล

สารเหล่านี้ให้สีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี พบได้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ สารที่พบมากคือกลุ่มของไกลโคไซด์ เช่น hesperidin และ naringin ในเปลือกส้ม ฟลาโวนอยด์ทั้งสองตัวมีความคงทนต่อกรดเกลือแต่จะสลายตัวใน chalcine เมื่ออุ่นกับด่าง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราได้จึงใช้ในการเก็บรักษาไม้ (Britsch *et al.* 1993)

2.2.3 ฟลาโวนอล

ฟลาโวนอลเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินในใบและเนื้อไม้ มักพบในดอกไม้โดยเป็นสารเม็ดสีชนิดหนึ่งซึ่งช่วยล่อแมลงเพื่อให้เกิดการผสมเกสร จึงมีความสำคัญต่อพืชยืนต้นเพื่อดำรงเผ่าพันธุ์สำหรับในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำพวกจลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียและสาหร่าย พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอลต่ำมากหรือแทบไม่มีเลย สำหรับเชื้อรา *Aspergillus candidus* พบว่ามีคลอร์ฟลาโวนอลซึ่งมีฤทธิ์ต้านจลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น แบคทีเรีย (อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536)

2.2.4 ฟลาโวน

มักพบในส่วนของเปลือกต้น แก่น ผล และราก ให้สีเหลืองอ่อนถึงแก่ ฟลาโวนที่พบในเปลือกต้นของพืชพวกขนุน (*Artocarpus*) และหม่อน (*Morus*) มีลักษณะเฉพาะคือมีหน่วยของไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid) ในโมเลกุลกาเลนจิน (galangin) (อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536)

2.2.5 ไอโซฟลาโวนอยด์

ไอโซฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายตัว เช่น โรทีโนน จาก *Derris* spp. มีฤทธิ์ทำให้ปลาตาย หรือโคเมสโตลจากพืชตระกูลถั่วเป็นไฟโตอะเลคซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนผิวพืช (Basile *et al.* 2003)

2.2.6 แอนโทไซยานิน

พบในแควิวโอลของเนื้อเยื่อดอกและใบของพืช สามารถละลายในน้ำ (Cavalcanti *et al.* 2011) ค่อนข้างไม่เสถียร เปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลได้ง่ายจากปัจจัยต่างๆ ทั้ง pH ของสาร ความเข้มข้นของแสง และอุณหภูมิ (Davies. 2004; Stiles *et al.* 2006; Tanaka *et al.* 2008; อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536; จริ่งแท้ ศิริพานิช. 2541) แอนโทไซยานินมีสีตั้งแต่โทนสีน้ำเงิน ม่วงถึงแดง พบในดอกไม้ ผัก ธัญพืช และผลไม้ คุณค่าที่ความยาวคลื่นแสง 490-550 นาโนเมตร (Lea and Leegood. 1999; Giusti and Wrolstad. 2001; Davies. 2004; Jordheim *et al.* 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

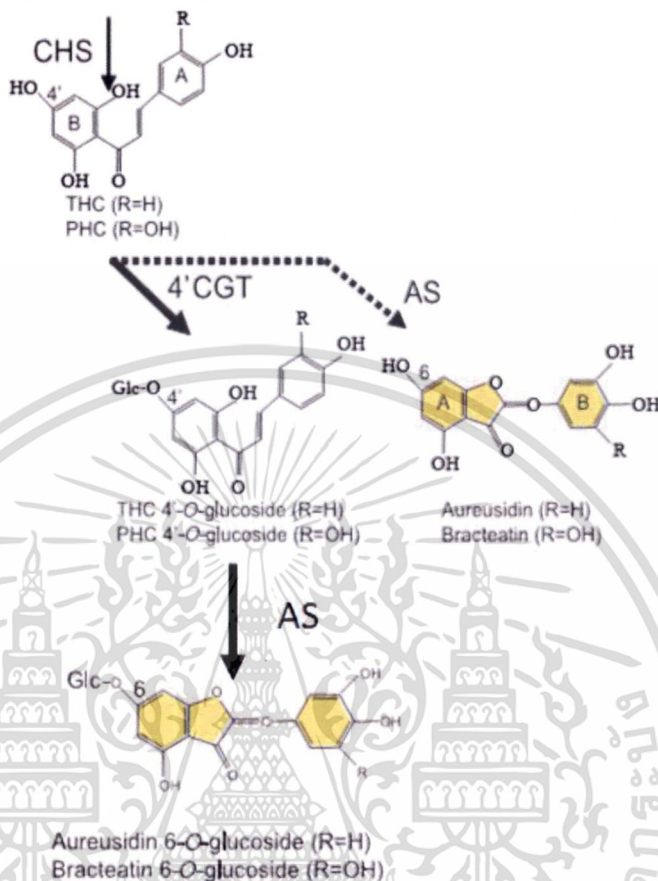
2.3 ความสำคัญของเอนไซม์ Chalcone 4'-O-glucosyltransferase

Chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) (EC. 2.4.1.286) เป็นเอนไซม์ในวิถีสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และเป็นยีนขั้นต้นที่สังเคราะห์เอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลผลิต aureusidin ซึ่งเป็น aurone ที่มีสีเหลืองสว่าง (คำรพ รัตนสุด. 2553) การสังเคราะห์ 4'CGT เริ่มต้นจากการรวมตัวของ malonyl-CoA 3 โมเลกุล ซึ่งได้รับมาจากวิถีอะซิเตท-มาโลเนท (acetate-malonate pathway) กับ p-coumaroyl-CoA 1 โมเลกุลที่ได้จากวิถีชีวสังเคราะห์ชิคิเมท (shikimate pathway) โดยการทำงานของเอนไซม์แซลโคเนซินเทส (chalcone synthase, CHS) เกิดเป็นนารินจินินแซลโคเน (naringenin chalcone) ซึ่งมีสีเหลือง จากนั้นเอนไซม์ 4'CGT จะทำปฏิกิริยาการเติมน้ำตาล (glucosylation) ให้กับนารินจินินแซลโคเน ที่ตำแหน่ง 4' ของวง B ได้เป็น tetrahydroxychalcone 4'-O-glucoside จากนั้นเอนไซม์ออโรลิดินซินเทส (aureusidin synthase, AS) เข้ามาเปลี่ยนเป็น aureusidin 6-O-glucoside ที่มีสีเหลือง (ภาพที่ 2.4) โดยมีรายงานพบว่าทั้ง 4'CGT และ AS จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์ aureusidin 6-O-glucoside ในการเกิดสีเหลืองในดอกลิ้นมังกร Ono *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาขึ้นที่เกี่ยวกับการเติมน้ำตาลกลูโคส (glucosylation) โดยได้ทำการศึกษาขึ้น UDP-glucosyl transferase (UGT) 5 ชนิด จากพืชที่แตกต่างกันดังนี้ ยีน *anthocyanin 3GGT* จากดอกมอร์นิงกลอดี้ (*Ipomoea nil*; AB192314) ยีน *anthocyanidin 3GT* จากดอกพิทูเนีย (*Petunia hybrida*; AB027454) ยีน *anthocyanin 5GT* จากดอกเวอร์บีนา (*Verbena hybrid*; AB013598) ยีน *baicalein 7 GT* จาก *Scutellaria baicalensis* (AB031274) และ ยีน *anthocyanin 3GT* จากดอก *Gentiana triflora* (AB076697) โดยนำยีน UGTs มาติดฉลากด้วย DIG probe เพื่อตรวจการแสดงออกของยีน UGTs ภายใน cDNA ของดอกลิ้นมังกรสีเหลือง จากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยการออกแบบไพรเมอร์จากตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง เพื่อสังเคราะห์ยีน 4'CGT จากนั้นจึงทำการศึกษาหน้าที่ของยีน เริ่มต้นโดยการถ่ายยีน 4'CGT ร่วมกับยีน AS จากดอกลิ้นมังกรสีเหลือง เข้าสู่แววมยุราสีน้ำเงินพันธุ์ Summerwave blue ทำให้เกิดการสะสมของ aureusidin 6-O-glucoside แต่พบสีเหลืองเฉพาะบริเวณเกสรตัวผู้ (stamen) เกสรตัวเมีย (carpel) และบริเวณรอยต่อระหว่างโคนกลีบดอก (lobe) กับหลอดดอก (throat) โดยที่ส่วนอื่นของดอกยังเป็นสีน้ำเงิน ขณะที่การแสดงออกร่วมกันของยีน 4'CGT และ AS ร่วมกับการยับยั้งการทำงานของยีน F3H หรือ DFR ในแววมยุราโดยวิธี RNAi (RNA interference) ทำให้ได้แววมยุราดอกสีเหลืองสดทั้งดอก

Okinaka *et al.* (2003) ถ่ายยีน F3'5'H จาก *Campanula medium* เข้าไปในยาสูบดอกสีชมพู พบว่าต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมมีการสะสม anthocyanin ชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของ delphinidin สูงกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน F3'5'H จากพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) และ *Lycianthes rantonnei* โดยให้ดอกสีม่วงอมชมพู แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ F3'5'H ของ *C. medium* มีประสิทธิภาพการทำงานดีกว่าเอนไซม์ F3'5'H จากพิทูเนียและ *L. rantonnei*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 *p*-coumaryl-CoA + 3 malonyl-CoA



ภาพที่ 2.4 วิธีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในกลุ่มออโรนในต้นมังกร (*Antirrhinum majus*) (*CHS*, chalcone synthase; *4'CGT*, chalcone 4'-O-glucosyltransferase; *AS*, aureusidin synthase; Glc, glucose) (ดัดแปลงจาก Ono *et al.* 2006)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสีดอก

Tsuda *et al.* (2004) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีดอกพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) โดยยับยั้งการแสดงออกยีน *CHS* ของ *P. hybrida* พบว่าดอกพิทูเนียเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีขาว และเมื่อยับยั้งการแสดงออกยีน *F3'H* ของ *P. hybrida* ร่วมกับการเติมยีน *DFR* ที่ได้จากกุหลาบ พบว่าดอกพิทูเนียเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้ม และพบว่ามัตินพิทูเนียได้รับการถ่ายยีนและให้สีดอกคงที่เพียงจำนวนเล็กน้อย โดยในทางการค้าจำเป็นต้องถ่ายยีนจำนวนหลายต้นเพื่อใช้คัดเลือก phenotype และรักษาสายพันธุ์ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Davies *et al.* (2006) สังเคราะห์ยีนในกลุ่มออโรน คือ aureusidin synthase (*AS*) และ aureusidin 7-O-glucosyltransferase (*A7GT*) ที่ได้จากยีน *AS* ที่มีการเติมหมู่กลูโคส เป็นยีนที่ให้โทนสีเหลืองในพืชหลายชนิด โดยทำการศึกษาในต้นมังกร (*Antirrhinum majus*) และศึกษาการแสดงออกของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเห็นไปเชิงประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนด้วยวิธี northern RNA analysis พบยีน *AS* แสดงออกเฉพาะในกลีบดอกและไม่พบในใบ ในช่วง การพัฒนาของดอกใน 7 ระยะ พบว่าปริมาณ *AS* และ *A7GT* เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยพบปริมาณของ ยีน *AS* มากกว่า *A7GT* เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบสารออโรนมากที่สุด ในดอกสี เหลือง รองลงมาคือดอกสีเหลืองอ่อน ส่วนดอกสีขาวไม่พบสารออโรน

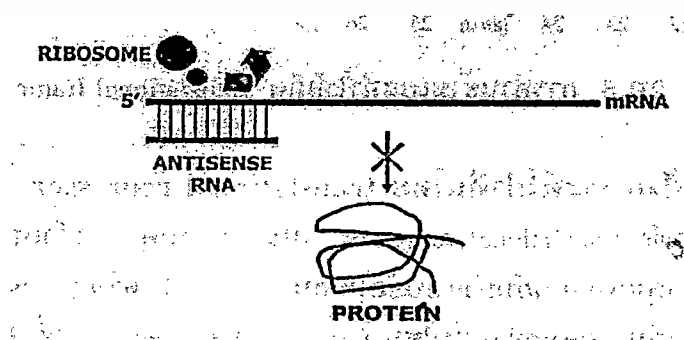
Katsumoto *et al.* (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกกุหลาบ ซึ่งเป็นดอกไม้ที่ไม่ พบการสะสมของแอนโทไซยานินชนิดที่เป็นอนุพันธ์ของ delphinidin จึงทำให้ดอกกุหลาบไม่มีสี น้ำเงินหรือสีม่วง เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *DFR* ในกุหลาบสายพันธุ์ที่มีสีแดง ชมพูและส้ม ซึ่งมีการสะสมของแอนโทไซยานิน ชนิด cyanidin และ pelargonidin และเติมยีน *F3'5'H* ที่ได้จาก ไวโอลา (*Viola odorata* L.) และยีน *DFR* จากไอริส (*Iris x hollandica*) เข้าไป พบว่ากุหลาบ คัดแปลงพันธุกรรมมีการสะสมของแอนโทไซยานิน ชนิด delphinidin และมีสีดอกที่เป็นสีม่วงมาก ขึ้น

2.5 การควบคุมการแสดงออกของยีน

การควบคุมการแสดงออกของยีน คือการควบคุมอัตราการผลิตและการสลายของโปรตีนใน เซลล์ในขณะเวลาหนึ่ง เกี่ยวข้องกับสมดุลของหลายกระบวนการที่สำคัญ ได้แก่ กระบวนการ ถอดรหัส (transcription) การตกแต่งหลังการถอดรหัส (posttranscriptional modification) กระบวนการ แปลรหัส (translation) และการตกแต่งหลังการแปลรหัส (posttranslational modification) โดย กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนภายในเซลล์ในขั้นตอนการตกแต่งหลังการถอดรหัส ได้แก่ antisense RNA (พัชรี บุญศิริ และคณะ 2551) และ RNA interference (Elbashir *et al.* 2001)

2.5.1 การควบคุมการแสดงออกโดยเทคนิค antisense RNA

กระบวนการ antisense RNA เป็นการยับยั้งการแสดงออกของยีนในขั้นตอนหลังกระบวนการ ถอดรหัส (post-transcriptional gene silencing หรือ PTGS) ที่พบในทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเริ่มจาก ชิ้นส่วน RNA ที่มีลำดับเบสคู่สมกับ mRNA เป้าหมายเข้าจับกับ mRNA เป้าหมาย ทำให้ขัดขวาง การเข้าทำงานของ ribosomal RNA ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (ภาพที่ 2.5) (พัชรี บุญศิริ และคณะ 2551)



ภาพที่ 2.5 กระบวนการทำงานของ antisense RNA (พัชรี บุญศิริ และคณะ 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และสงวนลิขสิทธิ์โดยศูนย์วิจัยและพัฒนาการวิจัยด้าน การค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 การควบคุมการแสดงออกโดยเทคนิค RNA interference (RNAi)

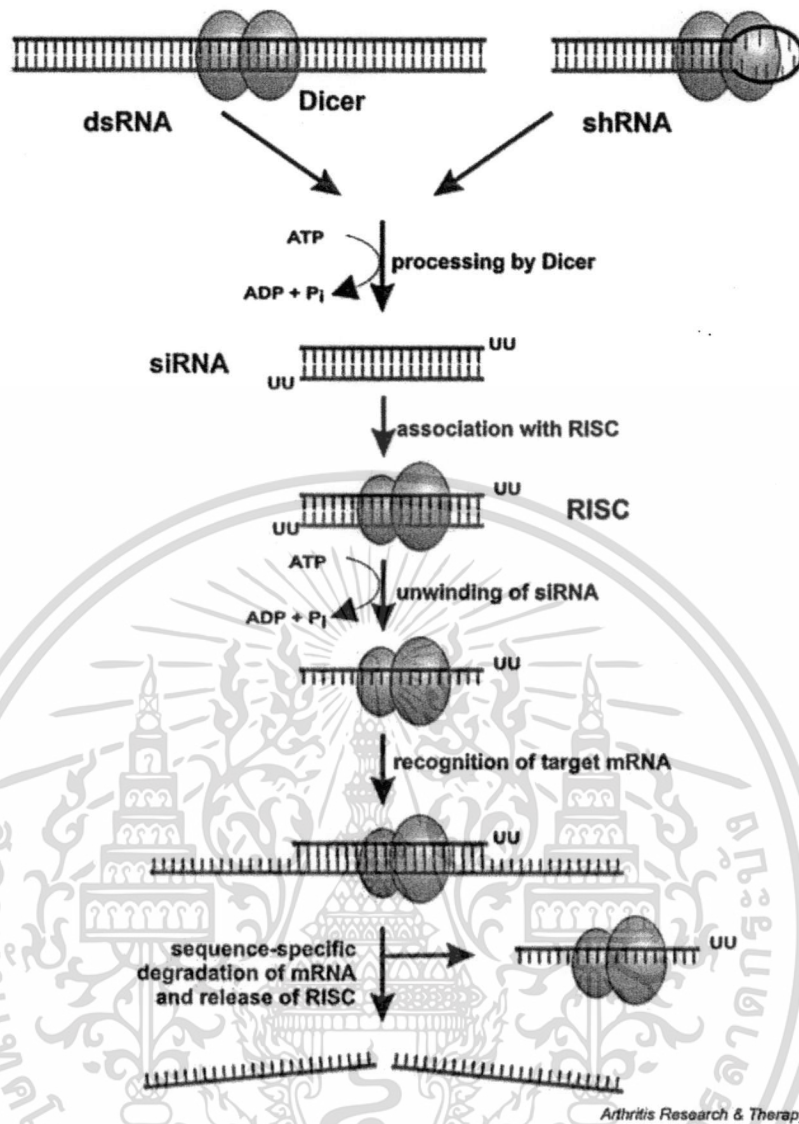
การยับยั้งการทำงานของ mRNA โดยวิธีการ RNA interference (RNAi) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมกระบวนการถอดรหัสและการสังเคราะห์โปรตีนอย่างเฉพาะเจาะจงที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต เช่น พืช สัตว์ และ รา เป็นกลไกธรรมชาติที่เซลล์ใช้ในการทำลาย RNA สายคู่ (กนกวรรณ จารุกัจจร และ พیمان โภคาทรัพย์. 2552; พชรีย์ บุญศิริ และคณะ. 2551; Small. 2007)

2.5.2.1 กระบวนการทำงานของ RNAi

กระบวนการ RNAi เริ่มต้นเมื่อเกิด RNA สายคู่ (dsRNA) ภายในเซลล์ จากนั้น เอนไซม์ไดเซออร์ ซึ่งเป็นเอนไซม์เอนโดไรโบนิวคลีเอส (endoribonuclease) ในกลุ่ม RNase III (กนกวรรณ จารุกัจจร และ พیمان โภคาทรัพย์. 2552) เข้าตัด dsRNA เป็น small interference RNA (siRNA) ที่มีลักษณะเป็น RNA สายคู่สั้นๆ ที่มีความยาวประมาณ 25 นิวคลีโอไทด์ (Macrae *et al.* 2006) siRNA นี้จะรวมเข้ากับ RNA-induced silencing complex (RISC) โดย RISC เป็นคอมเพล็กซ์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของโปรตีนหลายชนิดเพื่อทำงานร่วมกัน ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ในกลุ่ม helicase และ RNase III ด้วย เอนไซม์ในกลุ่ม helicase จะทำหน้าที่คลายเกลียว siRNA ให้เหลือเพียง antisense strand อยู่ใน RISC ซึ่ง antisense strand นี้ จะทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดความเฉพาะเจาะจงในการทำงานของ RISC หลังจากนั้น RISC จะจับกับเฉพาะ mRNA ที่มีลำดับเบสคู่สมกับ antisense strand เท่านั้น หลังจากนั้น RISC จับกับ mRNA เป้าหมาย จะทำให้เกิดการตัดทำลาย mRNA เป้าหมายด้วยเอนไซม์ไดเซออร์ทำให้สาย mRNA เป้าหมายขาดออก หากแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ก็จะทำให้ได้ขนาดโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์และไม่สามารถทำหน้าที่ได้ (ภาพที่ 2.6) (กนกวรรณ จารุกัจจร และ พیمان โภคาทรัพย์. 2552)

2.5.2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการใช้เทคโนโลยี RNAi เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนในพืช

Nishihara *et al.* (2005) ศึกษาผลกระทบของการยับยั้งกระบวนการในวิถีชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ของต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยยับยั้งยีนแซลโคเนไอโซเมอเรส (chalcone isomerase, *CHI*) ด้วยเทคนิค RNAi พบว่าสีชมพูของดอกยาสูบจางลง และมีการสะสมของแอนโทไซยานินน้อยลงในกลีบดอก ส่วนในละอองเกสรพบว่ามีสีเหลืองเนื่องจากมีปริมาณการสะสม chalcone แสดงว่า *CHI* มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแซลโคเน (chalcone) ไปเป็นฟลาโวนอน (flavanone)



ภาพที่ 2.6 กระบวนการทำงานของ RNAi
ที่มา <http://dna-rna.net/2011/08/25/rna-interference>

Nakamura *et al.* (2006) ศึกษาวิธีการแสดงออกของยีน anthocyanin synthase (*ANS*) ได้แก่ antisense suppression, sense suppression และ RNAi ในดอกแวมยูรา (*Torenia hybrid*) พบว่า กว่าครึ่งของพืชที่รับการถ่ายยีนโดยวิธี RNAi ให้ดอกสีขาว ในขณะที่วิธี antisense suppression ได้ดอกสีขาวในจำนวนเล็กน้อย ส่วนวิธี sense suppression ไม่พบดอกสีขาวเลย จากการทดลองพบว่ายีน *ANS* นั้นสามารถยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ในกลุ่มแอนโทไซยานินได้ อีกทั้งดอกสีขาวที่ได้จากเทคนิค RNAi ยังสามารถเติบโตเป็นเวลา 3 ปีภายในโรงเรือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Seitz *et al.* (2006) ศึกษาการยับยั้งยีน *F3'5'H* ของดอกแอฟริกันเดซี่ ด้วยเทคนิค RNAi และถ่ายยีน *DFR* ที่ได้จากเยอบีร่า (*Gerbera hybrid*) เข้าสู่ดอกแอฟริกันเดซี่ พบว่าดอกแอฟริกันเดซี่จากดอกปกติที่มีสีม่วงได้เปลี่ยนเป็นสีแดง ส่งผลให้ดอกแอฟริกันเดซี่มีการสะสมสารในกลุ่ม pelargonidin ที่ได้จากการทำงานของยีน *DFR*

Nakatsuka *et al.* (2008) ประสบความสำเร็จในการเปลี่ยนแปลงสีดอกหรีด (*gentian*) โดยทำการยับยั้งยีน *CHS ANS* และ *F3'5'H* ด้วยเทคนิค RNAi พบว่ากลีบดอกหรีดจากต้นที่ได้รับการยับยั้งยีน *CHS* ได้ดอกที่มีสีขาวทั้งดอก และดอกที่มีสีฟ้าอ่อน กลีบดอกจากต้นที่ยับยั้งยีน *ANS* พบเพียงดอกที่มีสีฟ้าอ่อน ส่วนการยับยั้งยีน *F3'5'H* ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดการสะสมสารในกลุ่ม delphinidin ให้โทนสีม่วง พบว่าสาร delphinidin ลดลง แต่กลับมีสารในกลุ่ม cyanidin เพิ่มขึ้นแทน ทำให้ได้ดอกหรีดสีโทนม่วงแดง

Kamiishi *et al.* (2011) ศึกษาหน้าที่ของยีน *CHS* ที่สกัดได้มาจากกลีบดอก *Tricyrtis* sp. สีชมพู-ม่วง ซึ่งมีการสะสมสารในกลุ่ม cyanidin โดยถ่ายยีนด้วยวิธีการ *Agrobacterium*-mediated transformation และศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยเทคนิค RNAi พบว่ากลีบดอก *Tricyrtis* sp. ที่ได้รับการถ่ายยีนมีสีชมพู-ม่วงที่จางลงเพียง 1 ดอก และอีก 5 ดอก มีสีกลีบดอกเปลี่ยนเป็นสีขาว และเมื่อนำดอกสีขาวไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าไม่มีการสะสมสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

2.6 เทคโนโลยีเกตเวย์ (Gateway technology)

Gateway technology คือ ระบบที่มีพื้นฐานมาจาก bacteriophage lamda-based site-specific recombinant ที่เรียกว่า *att* site ซึ่งเมื่อนำไปวางขนานข้างขึ้นส่วน DNA ที่เราสนใจ จะทำให้สามารถย้ายชิ้นส่วน DNA เข้าสู่เวกเตอร์ตัวอื่นๆ ที่มีตำแหน่ง *att* ที่เข้าคู่กัน ดังนั้นในกระบวนการโคลนจึงไม่ต้องการเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และเอนไซม์ไลเกส (ligase) ในการถ่ายโอนชิ้นยีน จึงเป็นระบบที่ง่ายต่อการย้าย DNA จากโคลนนิ่งเวกเตอร์เข้าสู่เวกเตอร์ที่แสดงออกได้ในสิ่งมีชีวิต (Karimi *et al.* 2002) วิธีการของ Gateway อาศัยส่วนประกอบที่สำคัญ 2 ส่วนคือ ปฏิกริยา LR clonase และ BP clonase ซึ่งอยู่บนเวกเตอร์ที่เข้าคู่กัน (*attL* และ *attR* หรือ *attB* และ *attP*) ปฏิกริยา LR ถูกเร่งโดยเอนไซม์ LR clonase โดยเริ่มจากผลผลิตพีซีอาร์ที่โคลนเข้าสู่ entry vector (pENTR) ที่มี *attL* 2 ตำแหน่งขนานข้างผลผลิตพีซีอาร์ด้วยระบบ TA cloning ก่อน จากนั้น ปฏิกริยา LR ที่ทำงานโดยเอนไซม์ LR clonase จะย้ายชิ้นส่วน DNA ที่เราสนใจซึ่งถูกขนานข้างด้วย *attL* จาก pENTR เข้าสู่ destination vector (pDEST) ที่มีตำแหน่ง *attR* โดยที่ตำแหน่ง *att* จะไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนเนื่องจากมีขนาดเพียง 21-25 bp (Hartley *et al.* 2000) ส่วนปฏิกริยา BP ถูกเร่งปฏิกริยาโดยเอนไซม์ BP clonase โดยเริ่มจากผลผลิตพีซีอาร์ ที่ออกแบบไพรเมอร์ให้มี ส่วนของ *attB* ขนานข้างผลผลิตพีซีอาร์ จากนั้นจึงนำเข้าสู่ donor vector (pDONR) ที่ขนานข้างด้วย

attP 2 ตำแหน่ง โดยภายหลังจากการเข้าสู่กันของ *attB* และ *attP* ผลผลิตพีซีอาร์ที่เราสนใจจะอยู่ภายใน pENTR จากนั้นจึงสามารถเข้าสู่ปฏิกิริยา LR ในลำดับต่อไป (ภาพที่ 2.7)

กลไกการทำงานของเอนไซม์ LR clonase หลังจากถ่ายโอนผลผลิตพีซีอาร์ที่เราสนใจเข้าสู่เวกเตอร์ pENTR ตำแหน่ง *attL* จะถูกตัดได้ปลายเหนียว โดยอาศัยโปรตีน excisionase (Xis) ปลายเหนียวของ pENTR จะเคลื่อนย้ายและรวมตัวเข้ากับปลายเหนียวของ destination vector (pDEST) ด้วยโปรตีน integrase (Int) และ integration host factor (IHF) ตรงบริเวณตำแหน่ง *attR* ที่เป็นตำแหน่งคู่สมกันกับตำแหน่ง *attL* ดังนั้นตำแหน่ง *att* จึงถือได้ว่าเป็นกุญแจสำคัญของระบบ Gateway ซึ่งเป็นตำแหน่งตัดของ phage λ โดย pENTR จะมี *attL* และ pDEST จะมี *attR* โดยเป็นส่วนสำคัญในระบบ Gateway เพื่อนำไปวิเคราะห์และศึกษาหน้าที่ของยีนได้ ดังภาพที่ 2.5 (Patton. 2000)

2.7 การถ่ายฝากยีนในพืช

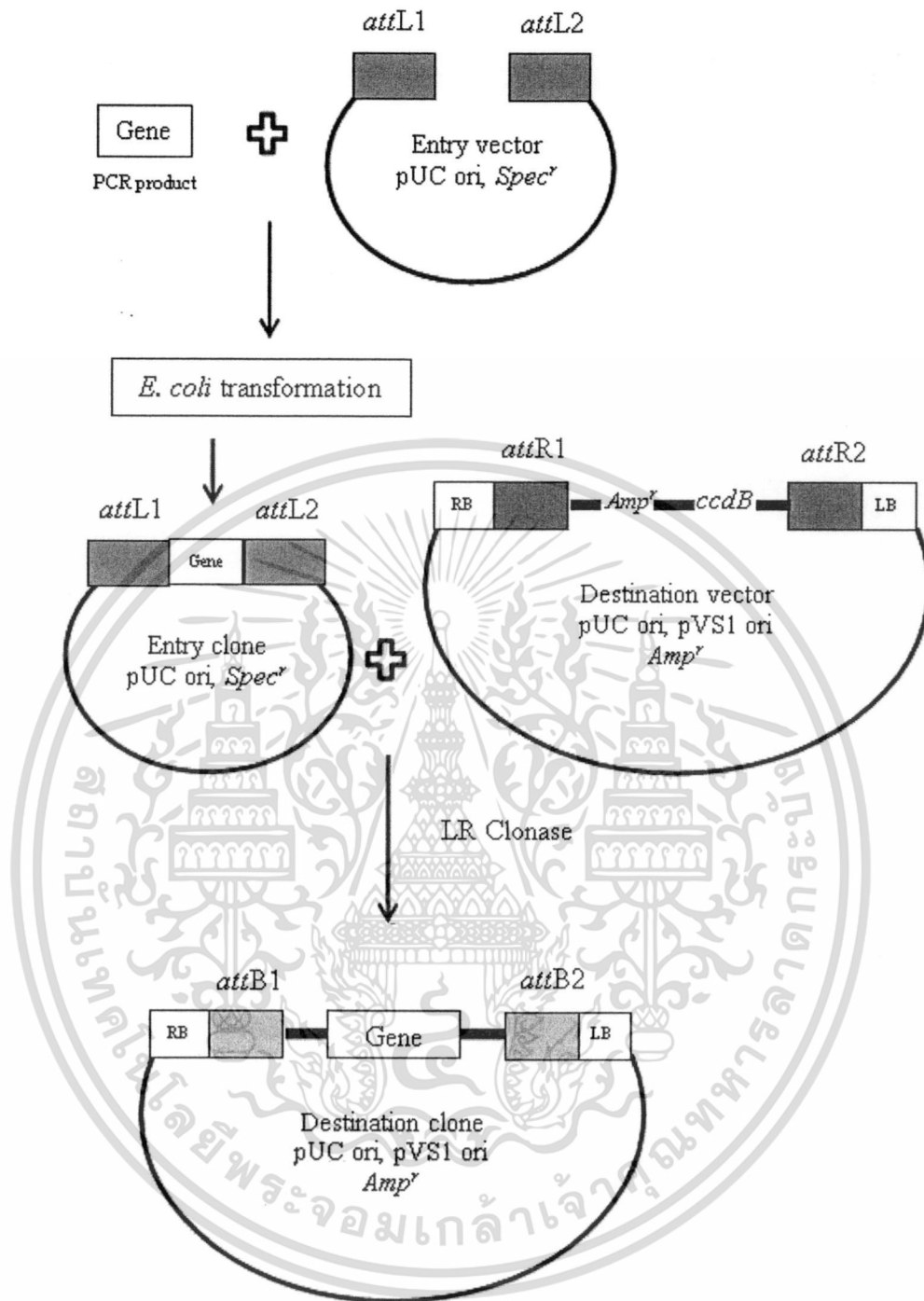
ในปัจจุบันได้มีการตัดแปลงพันธุกรรมพืชในหลากหลายสายพันธุ์ เช่น ฝ้าย ข้าวโพด ข้าว โดยจุดประสงค์หลัก คือ เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ของพืชให้มีความต้านทานต่อโรคต่างๆ และช่วยเพิ่มผลผลิตที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ เพื่อให้เพียงพอต่อจำนวนประชากรบนโลก ในปัจจุบันการถ่ายยีนในพืชมีอยู่ 5 วิธี (ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม. 2522, สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2536)

2.7.1 การถ่ายฝากยีนโดยตรง (direct gene transfer)

การถ่ายฝากยีนวิธีนี้ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ประกอบมากนัก การถ่ายยีนจะถ่ายผ่านโปรโตพลาสต์โดยแยกโปรโตพลาสต์จากพืชแล้วนำมาบ่มรวมกับสารละลาย DNA ที่เตรียมไว้ ใส่สารละลาย PEG ร่วมด้วย ให้มีความเข้มข้นประมาณ 40% กลไกการทำงานของ PEG จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโปรโตพลาสต์อ่อนตัวลง จึงมีโอกาสด้าน DNA จากภายนอกจะเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น ในการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ก็นิยมใช้สารละลาย PEG เช่นเดียวกัน นอกจากนี้อาจใช้สารละลาย PEG ร่วมกับการใช้ความร้อนระยะสั้นๆ อย่างทันทีทันใด (heat shock) โดยนำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลาย DNA และ PEG มาใส่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้ายมาใส่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที

2.7.2 การถ่ายฝากยีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation)

electroporation เป็นวิธีที่ทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์โดยใช้กระแสไฟฟ้า นำมาประยุกต์ใช้ในการถ่ายฝากยีนในพืชโดยนำโปรโตพลาสต์มาบ่มรวมกับสารละลาย DNA หรือ โครโมโซม แล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปเพื่อทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ DNA มีโอกาสแทรกเข้าสู่เซลล์ทางช่องเปิดนั้น ในสารละลายอาจจะมีสาร PEG ด้วยก็ได้ กระแสไฟฟ้าที่ใช้มี 2 ระบบคือ ระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าต่ำ ระยะเวลาสั้น (long pulse) และระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าสูงกว่า ใช้เวลานาน (short pulse) ทั้งนี้ขนาดของกระแสไฟฟ้าที่ใช้และเวลา



ภาพที่ 2.7 การสร้างเวกเตอร์ในระบบ Gateway เพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนในพืช (pUC ori คือจุดเริ่มต้นการจำลองตัวเองของ *E. coli*, pVS1 ori คือจุดเริ่มต้นการจำลองตัวเองของ *Agrobacterium tumefaciens*, *Spec^r* คือยีนต้านทานยาปฏิชีวนะสปีดติโนมัยซิน, *Amp^r* คือยีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน, *ccdB* คือยีนยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย) (ดัดแปลงจาก Xu and Li. 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรโตพลาสต์ เช่น โปรโตพลาสต์ที่แยกมาจากใบยาสูบ มีขนาดประมาณ 42 ไมครอน กระแสไฟฟ้าที่ใช้สำหรับระบบแรกคือ 400 โวลต์ เป็นเวลา 10×10^{-3} วินาที ส่วนระบบหลังคือ 1,400 โวลต์ เป็นเวลา 10×10^{-6} วินาที เป็นต้น การทำให้เกิดช่องขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์นี้ นอกจากจะใช้กระแสไฟฟ้าธรรมดาอาจจะใช้แสงเลเซอร์โดยแสงเลเซอร์สามารถทะลุผ่านผนังเซลล์ได้ ดังนั้นส่วนของพืชที่นำมาใช้อาจเป็นโปรโตพลาสต์หรือเซลล์ที่อยู่ในสภาพแคลลัสก็ได้

2.7.3 การถ่ายฝากยีนโดยใช้เข็มฉีด (microinjection)

วิธีนี้ทำได้เหมือนกับในสัตว์ แต่ต่างกันคือ ไม่จำเป็นต้องใช้ไข่ที่เพิ่งผสมจะใช้กับโปรโตพลาสต์ที่มาจากเซลล์ใดก็ได้ แล้วฉีด DNA เข้าไป ในพืชทำได้ยากกว่าในสัตว์ เนื่องจากพืชมีแวคิวโอลซึ่งเป็นที่เก็บเอนไซม์และสารพิษหลายชนิด การฉีดจึงต้องระมัดระวังไม่ให้ถูกแวคิวโอลแตกเพราะมักจะทำให้เซลล์ตาย บางครั้งพบว่านิวเคลียสซ่อนอยู่หลังแวคิวโอล ทำให้ไม่สามารถฉีด DNA เข้าไปได้ วิธีแก้ปัญหาคือ เลือกเซลล์ที่มีนิวเคลียสอยู่รอบเซลล์ในทิศทางของเข็มที่ใช้ฉีด แต่เซลล์ที่มีนิวเคลียสอยู่รอบเซลล์ มักจะไม่ค่อยแข็งแรง อีกทางหนึ่งคือ ทำให้เซลล์เกาะติดอยู่กับที่เพื่อสะดวกในการฉีดโดยมี micromanipulator หรือ holding pipette ดูดเซลล์ไว้ หรือทำให้เซลล์เกาะติดกับแก้วโดยเคลือบแก้วด้วยสาร poly L-lysine หรือใช้วิธีฝังโปรโตพลาสต์ไว้ในอะกาโรส แล้วจึงเลือกฉีด DNA เข้าสู่โปรโตพลาสต์ที่อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม

2.7.4 การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (Agrobacterium)

อะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) เป็นจุลินทรีย์ในดินที่ทำให้เกิดโรคปุ่มปมในพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด มีความสามารถในการส่งถ่ายส่วนของโมเลกุลที่เรียกว่า transfer-DNA (T-DNA) ซึ่งอยู่ภายในพลาสมิด Ti (tumour inducing) เข้าไปแทรกในโครโมโซมของพืช โดย T-DNA จะอยู่อย่างถาวรในเซลล์พืชและส่งผ่านไปสู่เซลล์ลูกเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม ดังนั้นการตัดต่อยีนที่สนใจเข้าไปในส่วน T-DNA ทำให้ชิ้น DNA ที่สนใจนั้นสามารถแสดงออกได้ในพืช

2.7.5 การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

การยิงอนุภาคอาศัยหลักการการใช้แรงดันจากก๊าซฮีเลียมที่มีความเร็วสูง (1,400 ฟุต/วินาที) ในสภาพสุญญากาศ แรงดันจะทำให้แผ่นรองรับความดัน (rapture disc) แตกออกและดันแผ่นเมมเบรนบางๆ ที่มี DNA จับกับตัวพาหะซึ่งอาจจะเป็นทองหรือทังสเตน ออกไปกระทบกับแผ่นโลหะที่เป็นตะแกรงลวดขนาดเล็กซึ่งกั้นแผ่นเมมเบรนให้หยุด (stopping screen) แต่จะปลด ปล่อยเฉพาะ DNA และทองหรือทังสเตนวิ่งไปหาเซลล์เป้าหมายที่อยู่ในจานอาหารสังเคราะห์ที่วางไว้บริเวณชั้นด้านล่าง ซึ่งปรับตำแหน่งได้หลายระดับตามต้องการ วิธีการนี้ให้ประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ได้กับการถ่ายยีนเข้าสู่นิวเคลียสหรือเข้าสู่ออร์แกเนลล์เช่น ไมโทคอนเดรียหรือคลอโรพลาสต์ได้

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

สุนนทิพย์ บุนนาค และ เนริสา คุณประทุม (2540) ศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ timentin, cefotaxime และ carbenicillin ต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* L.) และความสามารถในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA 105 พบว่า timentin และ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่ม ในขณะที่ carbenicillin ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียพบว่า timentin มีประสิทธิภาพในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA 105 ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อัญจนา และคณะ (2544) ศึกษาการถ่ายยีน rep เข้าสู่มะเขือเทศโรงงานพันธุ์ 134-1-2 โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อโรคใบด่างที่เกิดจาก *Cucumber mosaic virus* พบว่าการเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญและพัฒนาของชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนสารปฏิชีวนะซีโฟแท็กซิมที่ใช้ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่ออัตราการเกิดยอดมะเขือเทศ แต่มีผลยับยั้งการพัฒนาเป็นยอดที่สมบูรณ์ สายพันธุ์ของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ประสบความสำเร็จคือ AGL1 โดยมีประสิทธิภาพของการถ่ายยีนอยู่ที่ 5.06-11.20 เปอร์เซ็นต์

สุภาภรณ์ และคณะ (2547) ศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะ 2 ชนิดคือ timentin และ augmentin ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ พบว่า timentin สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ยาปฏิชีวนะ augmentin ต้องใช้ที่ความเข้มข้นถึง 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย และพบว่าความเข้มข้นของ augmentin ที่ 100-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการชักนำการเกิดแคลลัสและการเกิดยอด

Dai *et al.* (2001) เปรียบเทียบวิธีการถ่ายยีนในข้าวระหว่างการใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะและการยิงอนุภาค โดยเลือกยีน *NPTII* ยีน *HPT* และยีน *GUS* ในการศึกษา พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนชุดของยีนที่ถ่ายเข้าสู่ต้นข้าวด้วยวิธีการยิงอนุภาคจะมีจำนวนชุดของยีนมากกว่าวิธีของอะโกรแบคทีเรีย และยังพบว่าการแสดงออกของยีน *GUS* ในต้นที่ถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียจะมีความเสถียรมากกว่าต้นที่ถ่ายยีน *GUS* ด้วยวิธีการยิงอนุภาค

Rhimi *et al.* (2007) ศึกษาการถ่ายยีน *NPTII* เข้าสู่เมลอน (*Cucumis melo* cv. Maazoun) โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ พบว่าเมื่อใช้อาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ร่วมกับ IAA 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ และใช้ kanamycin ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือก และเมื่อนำต้นถ่ายยีนไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดที่ได้รับถ่ายยีน 6.66 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zottini *et al.* (2008) ศึกษาวิธีการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนแบบชั่วคราวในสภาพปลอดเชื้อด้วยเทคนิค Agro-infiltration โดยทำการถ่ายยีน *GFP* เข้าสู่ไวองุ่น (*Vitis vinifera*) พบว่าสามารถพัฒนาวิธีการถ่ายยีนแบบชั่วคราวที่มีประสิทธิภาพและประสบความสำเร็จเข้าสู่ไวองุ่นและสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *GFP* ในกลุ่มเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน

Boase *et al.* (2010) โคลนยีน *F3'5'H* จาก cyclamen และถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ในรูปแบบ antisense พบว่าดอก cyclamen ที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'5'H* แบบ antisense สีดอกได้เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีแดง/ชมพู และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร delphinidin ซึ่งเป็นสารที่ให้สีม่วงในกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สาร delphinidin มีปริมาณลดลง ส่งผลให้ปริมาณสารในกลุ่มแอนโทไซยานินลดลงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในบางดอกที่ได้รับการถ่ายยีน



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

3.1.1 พืชทดลอง

3.1.1.1 ถิ่นมังกร (*Antirrhinum majus*)

3.1.1.2 บัวหลวงปลูกทริก (*Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Buntharik)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.2.1 เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

3.1.2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101

3.1.2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 เอนไซม์ DNase I, RNase-free (Fermentas, USA)

3.1.3.2 เอนไซม์ RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas, USA)

3.1.3.3 เอนไซม์ Ribolock™ RNase Inhibitor (Fermentas, USA)

3.1.3.4 เอนไซม์ RNase A (Fermentas, USA)

3.1.3.5 เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Fermentas, USA)

3.1.3.6 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Fermentas, USA)

3.1.3.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI (Fermentas, USA)

3.1.3.8 เอนไซม์ตัดจำเพาะ Eco RI (Fermentas, USA)

3.1.3.9 เอนไซม์ตัดจำเพาะ Sac I (Fermentas, USA)

3.1.3.10 spermidine free base (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.3.11 absolute ethyl alcohol (Merck, Germany)

3.1.3.12 agar, bacteriological grade for culture media (Criterion, USA)

3.1.3.13 agarose gel (Vivantis, Malaysia)

3.1.3.14 bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)

3.1.3.15 calcium chloride (Ajax Finechem, Australia)

3.1.3.16 chloroform (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.3.17 ethidium bromide (Vivantis, Malaysia)
- 3.1.3.18 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA, Univar, Australia)
- 3.1.3.19 glycerol (APS Finechem, Australia)
- 3.1.3.20 isoamyl alcohol (Merck, Germany)
- 3.1.3.21 isopropyl alcohol (Merck, Germany)
- 3.1.3.22 isopropyl- β -D-1-Thiogalactoside (IPTG, Invitrogen, USA)
- 3.1.3.23 2-(n-morpholino) ethanesulfonic acid, 4-morpholineethanesulfonic acid monohydrate (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.24 peptone powder (Merck, Germany)
- 3.1.3.25 phenol (Merck, Germany)
- 3.1.3.26 potassium hydroxide (Carlo Erba Reagenti S.P.A., Italy)
- 3.1.3.27 sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.3.28 sodium dodecyl sulfate (Bio Basic Inc., USA)
- 3.1.3.29 sucrose (Bio Basic Inc., USA)
- 3.1.3.30 mannitol (Univar, Australia)
- 3.1.3.31 diethylpyrocarbonate (USB, USA)
- 3.1.3.32 dipotassium hydrogen phosphate (Univar, Australia)
- 3.1.3.33 magnesium phosphate (Univar, Australia)
- 3.1.3.34 sodium di hydrogen phosphate (Univar, Australia)
- 3.1.3.35 potassium ferricyanide (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.36 potassium ferrocyanide (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.37 Tris (Hydroxymethyl) aminomethane (Research Organic Inc., USA)
- 3.1.3.38 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal, Vivantis, Malaysia)
- 3.1.3.39 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronidase (X-gluc, Vivantis, Malaysia)
- 3.1.3.40 Triton-X 100 (Merck, Germany)
- 3.1.3.41 1-naphthaleneacetic acid (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.42 benzylaminopurine (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.43 thidiazuron (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.3.44 3', 5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone (Acetosyringone, Fluka, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1.4.1 Luria-Bertani agar
- 3.1.4.2 Luria-Bertani broth
- 3.1.4.3 yeast extract phosphate agar
- 3.1.4.4 yeast extract phosphate broth
- 3.1.4.5 yeast extract-mannitol agar
- 3.1.4.6 yeast extract- mannitol broth

3.1.5 สารปฏิชีวนะ

- 3.1.5.1 แอมพิซิลลิน (Bio Basic, Canada)
- 3.1.5.2 สเปคตินโนมายซิน (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.5.3 ไรเฟมพิซิน (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.5.4 กานามัยซิน (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.5.5 อะม็อกซิซิลลิน (Zhongshan, China)

3.1.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.1.6.1 1 Kb DNA Ladder (Fermentas, USA)

3.1.7 พลาสมิด

- 3.1.7.1 pCR8 (Invitrogen, USA)
- 3.1.7.2 pTZ57R/T (Fermentas, USA)
- 3.1.7.3 pJAWOHL8 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Sebastian Schornack, The Sainsbury Laboratory UK)
- 3.1.7.4 pCAMBIA2301

3.1.8 อุปกรณ์

- 3.1.8.1 เครื่องแก้วและบีกเกอร์ขนาดต่างๆ (Pyrex, Germany)
- 3.1.8.2 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA2202S-CW, Germany)
- 3.1.8.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)
- 3.1.8.4 เครื่องถ่ายภาพเจล (Syngene, Genegenius, Japan)
- 3.1.8.5 เครื่องปั่นสารและให้ความร้อน (Wisestir, MSH-20A, Korea)
- 3.1.8.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบธรรมดา (Eppendorf, Model 5418, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์และสงวนลิขสิทธิ์ของเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.8.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Jouan, CR3i, France)
- 3.1.8.8 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, T1 thermocycler, Germany)
- 3.1.8.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Eppendorf, Model 6132, Germany)
- 3.1.8.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott, CG 842, Germany)
- 3.1.8.11 ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Biorad, PAC200, USA)
- 3.1.8.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Vision, VS-1400LSN, Korea)
- 3.1.8.13 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool, SNH0303D11A, Thailand)
- 3.1.8.14 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Jouan, VXE380, Czech Republic)
- 3.1.8.15 ตู้บ่มเชื้อ (Mettler, BE-400, Germany)
- 3.1.8.16 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Stuart, SI500, UK)
- 3.1.8.17 ตู้อบเครื่องแก้ว (Jouan, Innovens-118EU2, France)
- 3.1.8.18 นาฬิกาจับเวลา (Presto, Model 0421301, China)
- 3.1.8.19 แผ่นกรองเชื้อ 0.22 ไมครอนเมตร (Sartorius stedim biotech, Minisart, Germany)
- 3.1.8.20 ไมโครปีเปต (Labnet, USA)
- 3.1.8.21 ไมโครเวฟ (LG, MS-2343LQ, Thailand)
- 3.1.8.22 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy, ES-315, Japan)
- 3.1.8.23 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, SV-1422, Germany)
- 3.1.8.24 เครื่องยิงอนุภาครุ่น PDS 1000/He (BioRad, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ศึกษาการแสดงออกของยีน $4'CGT$ ในกลีบดอกลินมังกรสีต่างๆ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

3.2.1.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ

บดกลีบดอกของลินมังกร พันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลือง สีชมพู สีม่วง และสีขาว พันธุ์ Cameo ดอกสีส้มและสีแดง ใช้เนื้อเยื่อแต่ละตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิกรัม ต่อสารละลาย Trizol (Invitrogen, USA) 1 มิลลิลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม chloroform 0.2 มิลลิลิตร และเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนที่มีอาร์เอ็นเอ ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติม isopropanol alcohol 0.5 มิลลิลิตร ต่อ Trizol 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีและ

ไม่ผ่านการใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที คูลสารละลายทิ้งแล้วเติม ethanol 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายทำให้ตะกอนแห้งและเติม DEPC-dH₂O เพื่อละลายตะกอน

3.2.1.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง และเทคนิคอะโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

วัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{230} A_{260} และ A_{280}) โดยเจือจางอาร์เอ็นเอที่สัดส่วน 1 ต่อ 100 (อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตร และ DEPC-dH₂O 99 ไมโครลิตร) อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เข้าใกล้ 2.0 (Sambrook *et al.* 1989) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นมาเชื่อมปริมาณ 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นอะโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลของอาร์เอ็นเอเคลื่อนที่ด้วยแรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โดยมีสารละลาย 0.5x TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า

3.2.1.3 การกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนในอาร์เอ็นเอ

กำจัดดีเอ็นเอที่ปนอยู่ในอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ Dnase I โดยใน 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X buffer DNase I เอนไซม์ DNase I 1 ยูนิต RiboLock RNase Inhibitor 1 ยูนิต DEPC-dH₂O 3 ไมโครลิตร อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 200 นาโนกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.1.4 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอโดยเอนไซม์ reverse transcriptase

สังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอของกลีบดอกถั่วมั่งกร โดยใช้อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 50 นาโนกรัม เป็นแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา reverse transcription ตามวิธีการของ RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 200 ไมโครลิตร และเก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.1.5 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกถั่วมั่งกรด้วยวิธีการ semi-quantitative PCR

3.2.1.5.1 การปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นให้เท่ากันด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ยีน 18S rRNA เป็นยีนอ้างอิง

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เราสนใจ จำเป็นต้องคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืช หรือ housekeeping gene เพื่อใช้เป็นยีนอ้างอิงสำหรับเอกสารนี้ ปรับปริมาณของ cDNA เริ่มต้นที่ใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR ให้เท่ากันโดยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง จากนั้นปรับความเข้มข้นของ cDNA ที่เตรียมไว้ให้เท่ากันก่อนนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับศึกษาการแสดงออกของยีน *4'CGT* โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์ยีน *18S rRNA* เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl_2 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, cDNA ของลีนมังกร ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 U/ μl 0.2 ไมโครลิตร, 10 μM ไพรเมอร์ 18-SF 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM ไพรเมอร์ 18-SR (ตารางภาคผนวกที่ 1) 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 24 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดและความเข้มของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *18S rRNA* ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ด้วยแรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โดยมีสารละลาย 0.5x TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้าโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.2.1.5.2 การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอก ลีนมังกรแต่ละสีด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

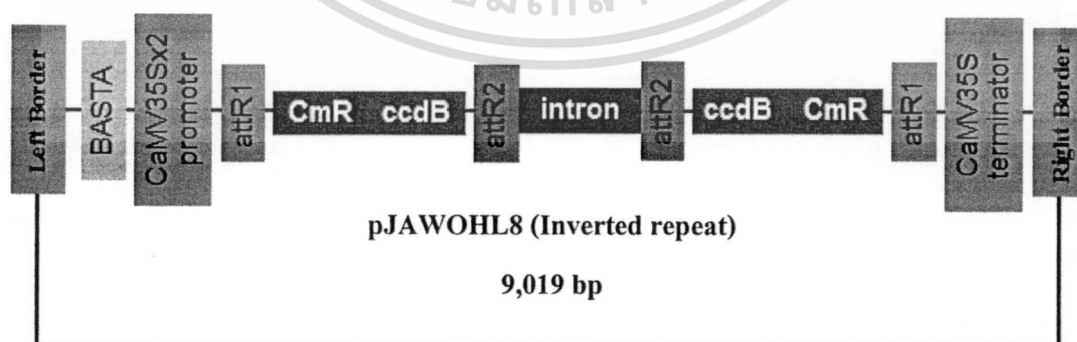
นำ cDNA ของดอกลีนมังกรพันธุ์ Pixie Bells (สีเหลือง สีชมพู สีม่วง และ สีขาว) และ พันธุ์ Cameo (สีส้มและสีแดง) ที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากันแล้ว ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ร่วมกับไพรเมอร์ *4'CGT* เพื่อศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในดอกลีนมังกรแต่ละสีในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl_2 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, cDNA ของลีนมังกร 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 U/ μl 0.2 ไมโครลิตร, 10 μM ไพรเมอร์ F-Bam HI-*4'CGT* 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM ไพรเมอร์ R-*4'CGT* -Sac I (ตารางภาคผนวกที่ 1) 0.5 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเมื่อครบกำหนดเวลานำไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอะกา

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำพลาสมิด pCR8 ที่มียีน 4'CGT แทรกอยู่ (pCR8-4'CGT) ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่เติมสารปฏิชีวนะสเปคตินอไมซิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดียวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะสเปคตินอไมซินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดแยกพลาสมิดตามวิธีการของ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) โดยดูดเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิกรัมปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และเทสารละลายใส่ที่เติม PD1 buffer ที่เย็นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ละลายเซลล์ด้วยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลง เติม PD2 buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และพลิกหลอดไปมา 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที จากนั้นเติม PD3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และพลิกหลอดทันที 10 ครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน PD column ที่อยู่บน collection tube ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง สุดท้ายปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ column แห้ง แล้วย้าย column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิกรัม หลอดใหม่พร้อมกับอุ้ง elution buffer ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ เก็บรักษาดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบ พลาสมิด pCR8-4'CGT ที่ได้ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O 16.8 ไมโครลิตร, 10x *Eco* RI buffer 2 ไมโครลิตร, pCR8-4'CGT ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร และ 10 U/ μ l *Eco* RI (Fermentas, USA) 0.2 ไมโครลิตร ผสมสารเข้ากันดีในหลอดขนาด 1.5 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมงและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพโรเมออร์ M13F (ตารางภาคผนวกที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.3 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมระหว่างยีนบางส่วนของ 4'CGT กับพลาสมิด pJAWOHL8 (pJA8-4'CGT)

เชื่อมต่อยีนบางส่วนของ 4'CGT เข้ากับพลาสมิด pJAWOHL8 (ภาพที่ 3.1, ได้รับความอนุเคราะห์จาก Sebastian Schornack, The Sainsbury Laboratory UK) ซึ่งเป็นพลาสมิด สำหรับการสร้างรูปแบบ inverted repeat ด้วยปฏิกิริยา LR (Invitrogen, USA) ทำปฏิกิริยาใน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยพลาสมิด pCR8-4'CGT ปริมาณ 150 นาโนกรัม พลาสมิด pJAWOHL8 ปริมาณ 150 นาโนกรัม และเอนไซม์ LR clonase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้ เข้ากันแล้วบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นใส่ส่วนผสมปริมาตร 2 ไมโครลิตร ถ่ายไอออนเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสาร ปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดียวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความ เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดแยกพลาสมิดตามวิธีการของ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ดังข้อที่ 3.2.2.2 ตรวจสอบพลาสมิด pJA8-4'CGT ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O 16.6 ไมโครลิตร, 10x Tango buffer 2 ไมโครลิตร, pJA8-4'CGT ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร และ 10 U/ μ l *Hind* III (Fermentas, USA) 0.2 ไมโครลิตร และ 10 U/ μ l *Xba* I (Fermentas, USA) 0.2 ไมโครลิตร ผสมสารเข้ากันดีในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมงและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำส่งวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ F-IntronpJA8 และ R-IntronpJA8 (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่ ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอินตรอนบนพลาสมิด pJAWOHL8



ภาพที่ 3.1 โครงสร้างของพลาสมิด pJAWOHL8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.4 การเตรียมเซลล์คอมพีเทนท์ของอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101

เลี้ยงแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) สายพันธุ์ GV3101 ในอาหารเหลว yeast extract phosphate (YEP) ที่เติมสารปฏิชีวนะไรแฟมพิซิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ระหว่าง 0.5-0.8 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นตกตะกอนที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวใสด้านบนทิ้ง ละลายตะกอนด้วย glycerol ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย glycerol ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร สูดถ่ายแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

3.2.2.5 การถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรีย

ถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธี electroporation และเลี้ยงเซลล์อะโกรแบคทีเรียบนอาหารคัดเลือก YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไรแฟมพิซินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.2.2.6 การยับยั้งการแสดงออกของยีน 4'CGT ในดอกกลีบมังกรแบบชั่วคราวด้วยวิธี Agro-infiltration

นำแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกกลีบมังกรเพื่อศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของยีน 4'CGT โดยเปรียบเทียบจากปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ระหว่างกลีบดอกที่ไม่ได้รับและได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกกลีบมังกร

3.2.2.6.1 การเตรียมแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT

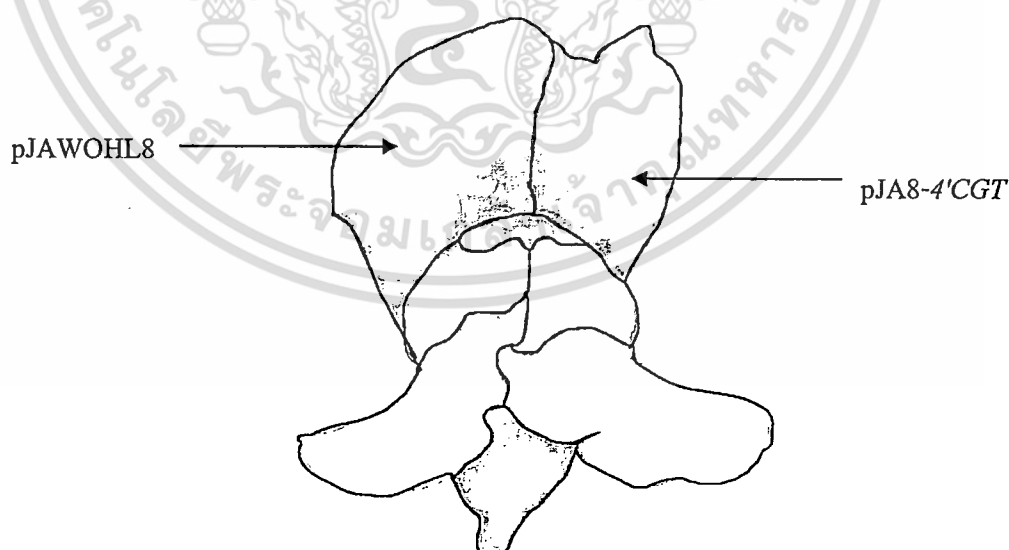
เลี้ยงแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT ตามวิธีการของ Zottini *et al.* (2008) โดยเลี้ยงในอาหารเหลว YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไรแฟมพิซินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จำนวน 25 ไมโครลิตร เลี้ยงต่อในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี หากมีการนำเอกสารนี้ไปใช้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลว YEP ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร และไรแฟมพิซินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2.6.2 การนำเซลล์อะโกรแบคทีเรีย ที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกกลีบมังกรด้วยวิธี Agro-infiltration

นำสารแขวนลอยเซลล์อะโกรแบคทีเรีย มาปั่นตกตะกอนในหลอด ไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 6 นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอน 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย infiltration buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 50 mM MES (pH 5.6), 2 mM sodium phosphate (Na_3PO_4), 0.5% glucose (w/v) และ 100 mM อะซิโตไซริงโณน ละลายตะกอนเซลล์โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงซ้ำๆ และ ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที เมื่อได้ ตะกอนที่ล้างเสร็จแล้ว นำไปละลายด้วย infiltration buffer และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า 0.2 จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มืด นาน 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันไม่ให้อะซิโตไซริงโณน เสื่อมคุณสมบัติทางเคมี จากนั้นฉีดเข้าสู่กลีบดอกกลีบมังกรด้วยกระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร ตาม วิธีการของ Zottini *et al.* (2008) โดยใน 1 กลีบ จะแบ่งเป็นกลีบด้านซ้ายฉีดอะโกรแบคทีเรียที่มี พลาสมิด pJAWOHL8 (control) และกลีบด้านขวาฉีดอะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJA8-4'CGT (RNAi) (ภาพที่ 3.2) โดยทำการทดลองทั้งหมด 7 ดอก จากนั้นเก็บต้นกลีบมังกรไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 3.2 ตำแหน่งที่ฉีดเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-4'CGT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.7 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกของลินม้งกรที่ได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-*4'CGT* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

3.2.2.7.1 การเตรียมอาร์เอ็นเอ

บดกลีบดอกของลินม้งกรที่ได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-*4'CGT* ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ต่อ Trizol (Invitrogen, USA) 1 มิลลิลิตร สกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการของ Trizol reagent (Invitrogen, USA) ดังข้อที่ 3.2.1.1 และ กำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ DNase I ดังข้อที่ 3.2.1.3

3.2.2.7.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอโดยเอนไซม์ reverse transcriptase

สังเคราะห์ cDNA จากกลีบดอกลินม้งกรที่ได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-*4'CGT* โดยใช้อาร์เอ็นเอปริมาณ 50 นาโนกรัม เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา reverse transcription ตามวิธีการของ RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas, China) ทำปฏิกิริยาที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 200 ไมโครลิตร และเก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2.7.3 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลินม้งกรระหว่างกลีบที่ได้รับและไม่ได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-*4'CGT* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

ปรับปริมาณ cDNA เริ่มต้นของกลีบดอกลินม้งกรที่ได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-*4'CGT* ให้เท่ากันโดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิงดังข้อที่ 3.2.1.5.1 เมื่อสามารถปรับความเข้มข้น cDNA ของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันแล้ว ใช้ cDNA ดังกล่าวเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR ดังข้อที่ 3.2.1.5.2

3.2.3 การเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ยีน *4'CGT* จากดอกลินม้งกรในบัวหลวงพันธุ์ปลูกเขตรักษาพันธุ์

ศึกษาหน้าที่ของยีน *4'CGT* ในบัวหลวงพันธุ์ปลูกเขตรักษาพันธุ์โดยการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยวิธีการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะหรือเครื่องยิงอนุภาค

3.2.3.1 การสังเคราะห์ยีน *4'CGT* ขนาด 1,374 คู่เบส จากดอกลินม้งกรด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 3.2.1.4 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ F-*Bam*HI-*4'CGT* และ R-*4'CGT*-*Sac* I (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่ออกแบบจากข้อมูลยีน *4'CGT* ของดอกลินม้งกร โดยเพิ่มบริเวณสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI ทางด้านปลาย 5' ของยีนและเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac* I ทางด้านปลาย 3' ของยีน ในปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, cDNA ของลิ้นมังกร ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 U/μl 0.2 ไมโครลิตร, 10 μM F-Bam HI-4'CGT 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM R-4'CGT –Sac I 0.5 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และเมื่อครบกำหนดเวลานำไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,374 คู่เบส โดยน้ำหนักเจลต้องไม่เกิน 0.4 กรัมใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ FavorPrep™ GEL/PCR purification mini kit (Favorgen, Taiwan) เติม FADF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด (พลิกหลอดให้เจลละลายทุกๆ 3 นาที) เมื่อเจลละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง คูณใส่ FADF column ที่อยู่บน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง หลังจากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเป็นการทำให้ column แห้ง จากนั้นย้าย column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่พร้อมกับอุณหภูมิล้าง elution buffer ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บรักษาดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร (A₂₃₀ A₂₆₀ และ A₂₈₀) โดยเจือจางดีเอ็นเอที่สกัดส่วน 1 ต่อ 100 (ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร และ dH₂O 99 ไมโครลิตร) นำดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตรวจสอบโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, China)

3.2.3.2 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมระหว่างยีน 4'CGT กับพลาสมิด pTZ57R/T (pTZ4'CGT)

นำยีน 4'CGT ขนาด 1,374 คู่เบส เชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas, USA) ในอัตราส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ความเข้มข้น 150 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 3 ไมโครลิตร ต่อพลาสมิด pTZ57R/T ความเข้มข้น 55 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ด้วยเอนไซม์ T4 ligase (Fermentas, USA) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสม pTZ4'CGT เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีการเคลือบด้วย 0.1M IPTG ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ X-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค blue/white screening นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอสายผสมตามวิธีการของ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ดังข้อที่ 3.2.2.2 จากนั้นตรวจสอบพลาสมิด pTZ4'CGT ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Sac I เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O 15 ไมโครลิตร, 10x buffer BamHI 2 ไมโครลิตร, pTZ4'CGT ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร และ 10 U/ μ l Bam HI (Fermentas, USA) 0.5 ไมโครลิตร และ 10 U/ μ l Sac I (Fermentas, USA) 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารเข้ากันดีในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมงและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ F-M13/pUC (-20) และ R-M13/pUC (-26) (ตารางภาคผนวกที่ 1)

3.2.3.3 การสร้างดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2301 ที่มียีน 4'CGT (pCAM4'CGT)

พลาสมิด pCAMBIA2301 เป็นพลาสมิดที่มียีนรายงานผลคือ *GUS* และมียีนคัดเลือกคือ *NPTII* เริ่มต้นโดยนำพลาสมิด pTZ4'CGT ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Sac I เพื่อแยกบริเวณของยีน 4'CGT ขนาดประมาณ 1,374 คู่เบส ออกจากพลาสมิด pTZ57R/T และพลาสมิด pCAMBIA2301*CHS* (ได้รับความอนุเคราะห์จากปฤษฎางค์ อะโน) ที่ผ่านการตัดแปลงให้พลาสมิด pCAMBIA2301 สามารถขับเคลื่อนยีน *CHS* ด้วยโปรโมเตอร์และเทอร์มินเตอร์จากพลาสมิด pBI121 ตัด pCAMBIA2301*CHS* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Sac I เพื่อแยกชิ้นส่วนของยีน *CHS* ออกจากพลาสมิด pCAMBIA2301 ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder จากนั้นเชื่อมต่อยีน 4'CGT เข้าสู่พลาสมิด pCAMBIA2301 เพื่อแทนที่ยีน *CHS* ด้วยเอนไซม์ T4 ligase โดยในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O 5 ไมโครลิตร 10x ligation buffer 2 ไมโครลิตร ชิ้นยีน 4'CGT ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Sac I ความเข้มข้น 12 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 9 ไมโครลิตร พลาสมิด pCAMBIA2301 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Sac I ที่ไม่มียีน *CHS* ความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 ligase ความเข้มข้น 5 U/ μ l ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถ่ายโอนดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที และเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นสายผสมตามวิธีการของ High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) ดังข้อที่ 3.2.2.2 และตรวจสอบพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O 16.5 ไมโครลิตร, 10x buffer *Eco*RI 2 ไมโครลิตร, pCAM4'CGT ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร และ 10 U/μl *Eco* RI (Fermentas, USA) 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารเข้ากันดีในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมงและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.2.3.4 การเตรียมเซลล์คอมพิเทนซ์ของอะโอบาเรคทีเรียม (*A. tumefaciens*) สายพันธุ์ EHA105

เพาะเลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ตามวิธีการของวิลลาซีนี ลิทวิทซ์ (2554) ที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายโอนเซลล์อะโอบาเรคทีเรียม สายพันธุ์ EHA105 เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ปลูกพริก โดยเลี้ยงอะโอบาเรคทีเรียมสายพันธุ์ EHA105 บนอาหารแข็ง YM (Yeast extract-Malt) โดยการลากเชื้อแบคทีเรียบนจานเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือก 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (starter) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นดูดจากหลอด starter ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ขวดขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เลี้ยงจนได้สารแขวนลอยเซลล์ที่มีความหนาแน่น $5-10 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.6-0.7 ย้ายเชื้อจากขวดเดิมมาใส่หลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนเซลล์นำไปแช่บนน้ำแข็งทันที เติมน้ำ glycerol ที่เจือจาง 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการพลิกหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติมน้ำ glycerol ที่เจือจาง 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการพลิกหลอดไปมา โดยทำบนน้ำแข็งตลอดการเตรียม ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอน เติมน้ำ 1 M sorbitol ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมตะกอนให้เข้ากับสารละลายโดยการให้ปั่นตุ๋นขึ้นลง แล้วแบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

หลอดละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.3.5 การถ่ายโอน pCAM4'CGT เข้าสู่โกรแบคทีเรีย (*A. tumefaciens*) สายพันธุ์ EHA105

ถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT เข้าสู่เซลล์โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี electroporation ตามวิธีการของ วิลลาสินี ลีทวีทรัพย์ (2554) เริ่มต้นโดยนำพลาสมิด pCAM4'CGT ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีอาหารเหลว YM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเซลล์คอมพิเทนท์ของโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA105 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วผสมกันอย่างเบามือ แช่บนน้ำแข็ง ทำการแช่เครื่อง electroporation โดยเลือกที่โหมด "Agr (*Agrobacterium*)" จากนั้นดูดเซลล์โกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAM 4'CGT ขึ้นมาใส่หลอด electroporation cuvette แล้วนำไปใส่เครื่อง electroporation จากนั้นกดปุ่ม "Pulse" เพื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าให้สามารถนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โกรแบคทีเรีย นำเซลล์โกรแบคทีเรียที่มีพลาสมิด pCAM4'CGT แช่บนน้ำแข็ง จากนั้นเลี้ยงในอาหารเหลว YM นำไปแช่ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเซลล์โกรแบคทีเรียปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เกลี่ยเซลล์โกรแบคทีเรียบนอาหารแข็ง YM ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.2.3.6 การถ่ายยีนเข้าสู่บัวหลวง

3.2.3.6.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับถ่ายยีน

เตรียมชิ้นส่วนพืชสำหรับถ่ายยีนตามวิธีการของ Raveevato et al. (2013) เริ่มต้นโดยนำเมล็ดบัวหลวงพันธุ์ปทุมธานีมาผ่านน้ำไหลนาน 1 ชั่วโมง แล้วทำการฟอกด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที จากนั้นฟอกด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม Tween 20 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่านาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตัดชิ้นส่วนของคัพพะบริเวณตายอด เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 40 μM และ Thidiazuron (TDZ) 0.5 μM เป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นย้ายชิ้นส่วนลงในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 50 μM เป็นเวลา 2 เดือน เพื่อชักนำให้เกิด shoot cluster ก่อนนำมาถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียโกรแบคทีเรีย และเครื่องยิงอนุภาค

3.2.3.6.2 การถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

ถ่ายยีนโดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ โดยคัดแปลงวิธีการของ วิลลาซีนี ลีทวิทซ์ (2554) เริ่มต้นโดยการนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย ที่ได้จากข้อ 3.2.3.5 เลี้ยงในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 2 วันนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.6-0.7 แล้วนำไปหมუნเหวี่ยงตกตะกอนที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกเติมอาหารเหลว MS 10 มิลลิลิตร และเติมสารอะซิโตไซริงโกนความเข้มข้น 100 μM จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของเซลล์อะโกรแบคทีเรีย เป็น 1:10 ด้วยอาหารเหลว MS นำชิ้นส่วน shoot cluster แชนาน 10 นาที ซับแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย ส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมอะซิโตไซริงโกนความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 2 วัน ในสภาพมืดเพื่อป้องกันไม่ให้อะซิโตไซริงโกนเสื่อมทางเคมีแล้วนำชิ้นส่วน shoot cluster มากำจัดเซลล์อะโกรแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่เติมสารปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 μM ที่เติมสารปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลินความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้กำจัดแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน *NPTII* โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์

3.2.3.6.3 การถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาค

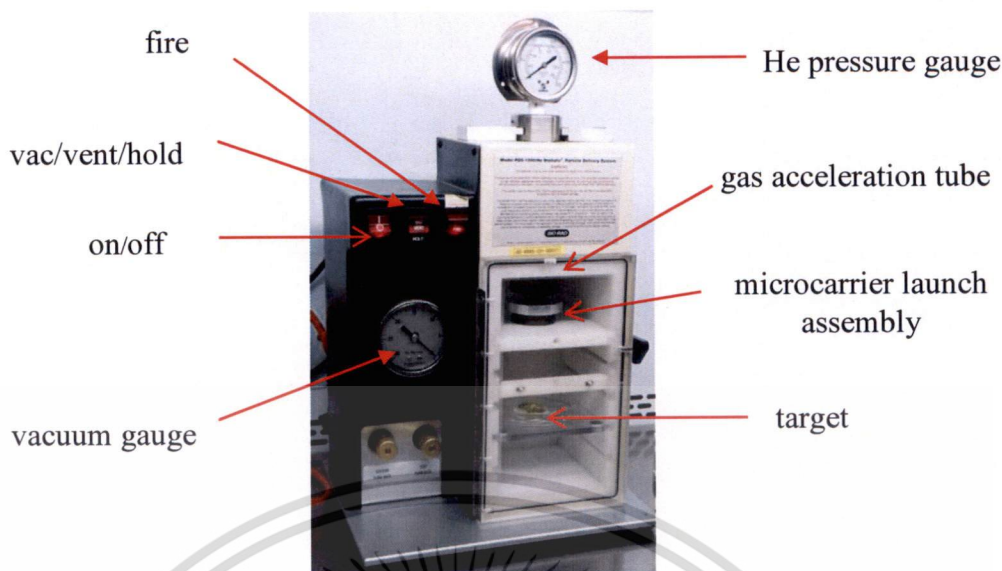
ถ่ายยีนโดยเครื่องยิงอนุภาคตามวิธีการของ Buathong *et al.* (2013) ทำการปรับสภาพ osmotic ของชิ้นส่วน shoot cluster ที่เตรียมไว้โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2M mannitol และ 2M sorbitol นำกระดาษกรองรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร วางไว้ด้านบนอาหาร แล้วนำชิ้นส่วนดังกล่าวจำนวน 20 ชิ้น วางบนแผ่นกระดาษกรองรูปวงกลมเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ก่อนถ่ายยีน เตรียมพลาสมิด pCAM4'CGT เคลือบอนุภาคทองคำ โดยใช้อุณหภูมิทองคำปริมาณ 60 มิลลิกรัมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วล้างด้วย ethanol 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที นำไปหมუნเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำตกตะกอน แล้วดูด ethanol ที่ทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนการล้างด้วย ethanol 99 เปอร์เซ็นต์จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตรโดยการเขย่าให้ทองคำกระจายตัวในน้ำ นำไปหมუნเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ตกตะกอนแล้วดูดน้ำใส่ทิ้ง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม glycerol เจือจาง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอเคลือบอนุภาคทองคำโดยการนำอนุภาคทองคำที่เตรียมไว้มาเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้อนุภาคทองคำมีการกระจายตัว หลังจากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการเชิงงานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติมพลาสติกดีเอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 2.5M แคลเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำ 0.1M spermidine free base (Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที โดยเขย่าหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เบาๆ เป็นระยะๆ หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ใส่น้ำที่ใสทิ้งแล้วเติม ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการเขย่าเบาๆ ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ใส่น้ำที่ใสทิ้งแล้วเติม ethanol 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมโดยการเขย่าเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกันจะได้อนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยพลาสติกดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีน

ยิงอนุภาคทองคำเคลือบพลาสติกดีเอ็นเอด้วยเครื่องยิงอนุภาคแบบ PDS 1000/He (BioRad, USA) ดังแสดงในภาพที่ 3.3 โดยการฉีดทำความสะอาดตู้ยิงด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ นำ microcarriers และ plastic insertion tool ไปนั่งฆ่าเชื้อ แช่แผ่นกันความดันแก๊ส (rupture disk) ใน isopropanol แล้วนำขึ้นมารอให้แห้ง จากนั้นใส่แผ่นกันความดันแก๊สตามขนาดความดันที่ต้องการลงใน holder ที่ผ่านการนั่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยการทดลองนี้เลือกใช้ขนาด 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แล้วนำเข้าประกบกับเครื่องตรงส่วนปลายของ gas acceleration tube ภายในตู้ยิงประกอบ microcarriers ที่ผ่านการนั่งฆ่าเชื้อแล้วซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกสีเหลืองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร เข้ากับ holder ให้ปิดหอยค้อนอนุภาคทองคำที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่น microcarriers รอให้แห้งพอประมาณ ใช้ปากคีบหยิบตะแกรงลวด (stopping screen) มาวางบน microcarriers launch assembly ที่ผ่านการนั่งฆ่าเชื้อแล้ว นำ macrocarriers ที่แห้งแล้วมาวางบน macrocarriers holder ในลักษณะคว่ำลง ปิดฝา macrocarriers launch assembly แล้วนำไปวางในเครื่องยิงอนุภาค นำจานเพาะเลี้ยงที่มีเนื้อเยื่อเป้าหมายวางบนชั้นวาง (petri dish holder) ให้อยู่ในระดับที่ห่างจากเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ 9 เซนติเมตร หมุนปุ่มปรับความดันแก๊สให้เกิน 200 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เปิด main switch บนส่วนควบคุมข้างตู้ยิง กดปุ่ม vac (vacuum) เพื่อทำให้ภายในตู้ยิงเป็นสุญญากาศจนถึงระดับ 26-28 นิ้วปรอท โดยให้สังเกตจาก vacuum gauge กดปุ่มเดิมไปที่ hold สังเกตว่าไฟสีแดงจะติดที่ปุ่ม fire ที่อยู่ข้างๆ จึงกดปุ่ม fire ค้างไว้ ระหว่างนี้ให้สังเกต He pressure gauge ให้ได้แรงดันที่ 1,100 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว และจะได้ยินเสียงดังคล้ายเกิดการระเบิดภายในตู้ยิงจึงปล่อยมือจากปุ่ม fire กดปุ่ม vac ไปที่ vent เพื่อปล่อยอากาศเข้าไปภายในตู้ยิง เมื่อไม่มีสภาพสุญญากาศจะสามารถเปิดฝาตู้ได้ ปิดฝาจานเพาะเลี้ยงและนำจานเพาะเลี้ยงที่มีเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ถูกยิงแล้วออกมา นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนแล้วมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 μ M เพื่อปรับสภาพ osmotic ของเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 μ M ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.3 ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่องยิงอนุภาครุ่น PDS 1000/He (BioRad, USA)

3.2.3.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

3.2.3.7.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี *GUS*

histochemical assay

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี *GUS* histochemical assay นำใบของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *GUS* มาแช่ในสารละลาย X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์ β -glucuronidase โดยอาศัยเครื่องปั๊มสุญญากาศที่แรงดัน 300 มิลลิบาร์ ตามวิธีการของ Matsumoto *et al.* (2009) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นบ่มในที่มีดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำจัดคลอโรฟิลล์ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ นำมาตรวจสอบการแสดงออกของ *GUS* โดยการสังเกตจากการเกิดสีน้ำเงินบนชิ้นส่วนพืชภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป

3.2.3.7.2 การเตรียมอาร์เอ็นเอของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *4'CGT*

สกัดอาร์เอ็นเอจากบัวหลวงตามวิธีการของ Invitrap[®] Spin Plant RNA Mini Kit (Stratec molecular, Germany) เริ่มจากบดใบบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน *4'CGT* ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม lysis solution RP ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ลงใน receiver column ที่ตั้งอยู่บน receiver tube ขนาด 2 มิลลิลิตร (ชุดที่ 1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสใน receiver tube ใส่ลงใน receiver column ที่ตั้งอยู่บน receiver tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ชุดใหม่อีกครั้ง (ชุดที่ 2) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นถอด receiver

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

column ออกแล้วเติม absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน receiver tube ชุดที่ 2 ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงซ้ำๆ จากนั้นดูดสารละลายใน receiver tube ชุดที่ 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน RTA column ที่ตั้งอยู่บน RTA tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้งแล้วเติมสารละลายที่เหลือใน receiver tube ชุดที่ 2 ใส่ลงใน RTA column ที่ตั้งอยู่บน RTA tube อันเดิมอีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง แล้วเติม wash buffer R1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม wash buffer R2 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง และเติม wash buffer R2 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนสารละลายด้านล่างทิ้ง จากนั้นย้าย RTA column ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง ย้าย RTA column ใส่ลงใน elution tube แล้วเติม elution buffer R ที่เย็นปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำอาร์เอ็นเอไปวัดปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงและเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังข้อที่ 3.2.1.2 เก็บอาร์เอ็นเอที่เหลือที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.3.7.3 การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอโดยเอนไซม์ DNase I

นำอาร์เอ็นเอของบัวหลวงแต่ละตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ

3.2.3.7.2 มากำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ DNase I เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DEPC-dH₂O 6 ไมโครลิตร, 10x buffer DNase I ที่มี MgCl₂ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 1 ยูนิต Ribolock™ RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร, 1 ยูนิต DNase I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และอาร์เอ็นเอของบัวหลวงความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 50 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งปฏิกิริยา แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{230} A_{260} และ A_{280}) โดยเจือจางอาร์เอ็นเอที่สัดส่วน 1 ต่อ 100 (อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตรและ DEPC-dH₂O 99 ไมโครลิตร) อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เข้าใกล้ 2.0 (Sambrook *et al.* 1989) จากนั้นนำอาร์เอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 10x loading dye 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลของอาร์เอ็นเอเคลื่อนที่ด้วยแรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โดยมีสารละลาย 0.5x

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษ เท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นไปใช้โดยไม่แจ้งขออนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า ทำการสังเคราะห์ cDNA ตามข้อที่ 3.2.1.4 จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยปฏิกิริยา semi-quantitative PCR ดังข้อที่ 3.2.1.5

3.2.3.7.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

ใช้ cDNA ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโครแบคทีเรียเป็นพาหะและการยิงอนุภาคเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH₂O 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวง ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 U/μl 0.2 ไมโครลิตร, 10 μM F-Bam HI-4'CGT 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM R-4'CGT –Sac I (ตารางภาคผนวกที่ 1) 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.2.3.7.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS และ NPTII ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน

ใช้ cDNA ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโครแบคทีเรียและการยิงอนุภาคมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS และ NPTII โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH₂O 12.8 ไมโครลิตร, 10x Taq buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวง ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 U/μl 0.2 ไมโครลิตร, 10 μM ไพรมเมอร์ F-gusA 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM ไพรมเมอร์ R-gusA สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS โดยออกแบบไพรมเมอร์ตามรายงานของ Hajian *et al.* (2011) และ 10 μM ไพรมเมอร์ F-NPTII 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM ไพรมเมอร์ R-NPTII สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน NPTII โดยออกแบบไพรมเมอร์ตามรายงานของ Faize *et al.* (2010) (ตารางภาคผนวกที่ 1) 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำใน

เอกสารนี้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.2.3.7.6 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรียและการยิงอนุภาคโดยวิธีการ semi-quantitative PCR

ทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* ซึ่งเป็นยีนแรกในวิถีชีวสังเคราะห์ในกลุ่มฟลาโวนอยด์และยีน *F3H* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่มแอนโทไซยานิน เพื่อศึกษาปริมาณการแสดงออกภายหลังจากการถ่ายยีน *4'CGT* โดยทำการปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นที่สังเคราะห์ได้จากใบของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนของพลาสมิด pCAM4'*CGT* และใบบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* ให้เท่ากันโดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง ดังข้อที่ 3.2.1.5.1 เมื่อปรับความเข้มข้นของ cDNA ของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันแล้วใช้ cDNA ดังกล่าวเป็นต้นแบบในการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* ด้วยวิธีการ semi-quantitative PCR

ตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH₂O 12.8 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร, cDNA ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* หรือ cDNA ของบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* 1 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 U/μl 0.2 ไมโครลิตร, 10 μM ไพรมเมอร์ CHSF 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM ไพรมเมอร์ CHSR สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* (ตารางภาคผนวกที่ 1), 10 μM ไพรมเมอร์ F3H_SenseF 0.5 ไมโครลิตร และ 10 μM ไพรมเมอร์ F3H_STOP สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* โดยออกแบบไพรมเมอร์ตามรายงานของ ชัยวรกุล ชัยปัญญา (2555) (ตารางภาคผนวกที่ 1) ผสมสารให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA)

3.2.3.8 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *4'CGT* และยีน *GUS* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

พลาสมิด pCAM4'*CGT* ที่ถ่ายโอนเข้าสู่พืช ภายหลังจากที่มีการตรวจสอบการแสดงผลของยีนแล้วจำเป็นต้องตรวจสอบยีน *4'CGT* และยีน *GUS* ที่แทรกอยู่ในโครโมโซมไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชโดยอาศัยเทคนิค Southern blot hybridization โดยตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และย้ายดีเอ็นเอนั้นออกจากเจลอะกาโรส ไปสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) หรือแผ่นเยื่อไนลอน (derivatized nylon)

3.2.3.8.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ (McCauley and Palomec. n.d.) บดตัวอย่างใบบัวในโกรงที่เย็นจัด ตักชิ้นส่วนที่บดแล้วใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ให้มีน้ำหนัก ประมาณ 40-50 มิลลิกรัม เติม CTAB buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม chloroform:isoamyl alcohol ที่อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกกลับหลอดไปมาอย่างเบา บั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ประมาณ 350 ไมโครลิตร เติม 5M potassium acetate 28 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาอย่างเบา เติม isopropanol 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ บั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายทิ้ง เติม 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาอย่างเบา บั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูด 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ออก เติม 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาอย่างเบา บั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูด 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ออก นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ที่มีตะกอนดีเอ็นเอไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตะกอนแห้ง และละลายตะกอนด้วย dH_2O 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.2.3.8.2 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.3.8.1 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยแบ่งออกเป็น 2 หลอด หลอดที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI โดยทำปฏิกิริยาใน ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O 45 ไมโครลิตร, 10x *Eco* RI buffer 30 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอบัวหลวง ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 220 ไมโครลิตร และ 10 U/ μ l *Eco* RI (Fermentas, USA) 5 ไมโครลิตร ผสมสารเข้ากันดีในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมง หลอดที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Eco* RI โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 300 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O 10 ไมโครลิตร, 10x Tango buffer 60 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอบัวหลวง ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 220 ไมโครลิตร 10 U/ μ l *Eco* RI (Fermentas, USA) 5 ไมโครลิตร และ 10 U/ μ l *Bam* HI (Fermentas, USA) 5 ไมโครลิตร ผสมสารเข้ากันดีในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.8.3 การเตรียมผลผลิตพีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วย DIG

ในขั้นตอนการทำ Southern blot hybridization จำเป็นต้องใช้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีการติดฉลากด้วย DIG โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 100 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH₂O 55 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer 10 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 10 ไมโครลิตร, 10 mM PCR DIG probe synthesis dNTP 12.5 ไมโครลิตร, cDNA ของลิ้นมังกร ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร; *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 U/μl 2.5 ไมโครลิตร, 10 μM F-EcoRI-4'CGT 2.5 ไมโครลิตร และ 10 μM R-4'CGT-Sac I (ตารางภาคผนวกที่ 1) 2.5 ไมโครลิตร สำหรับการตรวจสอบยีน 4'CGT

ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีการติดฉลากด้วย DIG สำหรับยีน *GUS* โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร 100 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH₂O 55 ไมโครลิตร, 10x *Taq* buffer 10 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 10 ไมโครลิตร, 10 mM PCR DIG probe synthesis dNTP 12.5 ไมโครลิตร, พลาสมิด pCAM4'CGT ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase (Fermentas, USA) ความเข้มข้น 5 U/μl 2.5 ไมโครลิตร, 10 μM F-gusA 2.5 ไมโครลิตร และ 10 μM R-gusA (ตารางภาคผนวกที่ 1) 2.5 ไมโครลิตร

3.2.3.8.4 การตรวจสอบยีน 4'CGT และยีน *GUS* ในโครโมโซมบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

นำเจลอะกาโรสจากข้อ 3.2.3.8.2 ล้างด้วย depurination buffer เขย่าเป็นเวลา 10 นาที กวาดเจลด้วยน้ำกลั่น ล้างเจลด้วย denaturation buffer เขย่าเป็นเวลา 30 นาที กวาดด้วยน้ำกลั่น ล้างเจลด้วย neutralization buffer เขย่าเป็นเวลา 30 นาที กวาดด้วยน้ำกลั่น เติมน้ำ 20x SSC ลงในภาชนะโดยมีแผ่นกระจกใสขนาด วางพาดบนภาชนะ นำแผ่นกระดาษกรองวางพาดบนกระจกโดยให้ปลายทั้งสองด้านจุ่มลงใน 20x SSC ที่อยู่ในภาชนะ วางเจลที่ได้จากการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนแผ่นกระดาษกรองวางในลอนเมมเบรนบนเจล วางกระดาษกรอง 6 แผ่นบนในลอนเมมเบรน จากนั้นวางกระดาษทิชชูบนกระดาษกรองโดยวางของที่มีน้ำหนักไว้ด้านบน เพื่อให้ดูบัพเฟอร์ขึ้นมาที่เมมเบรนโดยอาศัยแรงคาปิลลารี หลังจากเคลื่อนย้ายดีเอ็นเอจากเจลขึ้นมาบนในลอนเมมเบรนแล้ว นำในลอนเมมเบรนเข้าเครื่อง crosslinker โดยหงายด้านที่ประกบเจลขึ้น ใช้เวลาประมาณ 3 นาที นำในลอนเมมเบรนใส่ในขวด hybridize ที่มี hybridization buffer (Roche, Germany) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเข้าสู่ hybridization เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย hybridization buffer และเติม hybridization buffer 40 มิลลิลิตร และผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.2.3.8.3 ปริมาตร 95 ไมโครลิตร โดยก่อนใส่ นำผลผลิตพีซีอาร์ไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีเมื่อครบแล้วให้วางในน้ำแข็งทันที นำในลอนเมมเบรนที่มี hybridization buffer และผลผลิตพีซีอาร์เข้าเครื่อง hybridization ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เติมน้ำ hybridization buffer ออกจากขวด

ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

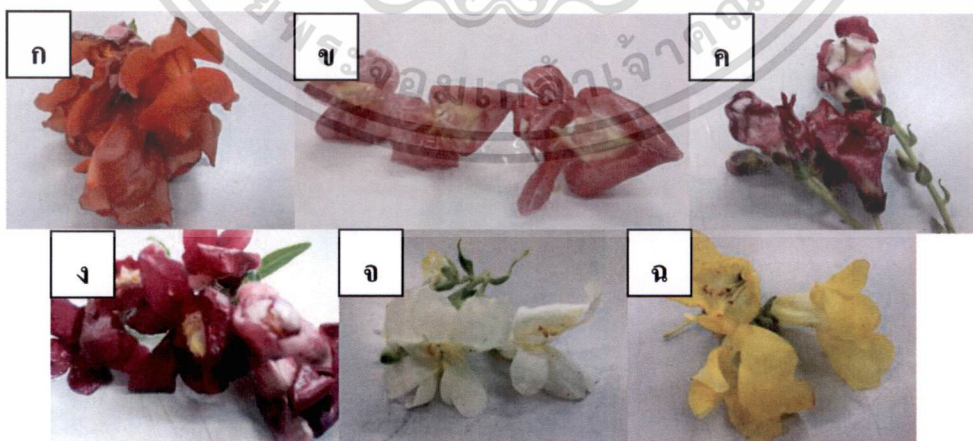
hybridization เดิม low stringency (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่เข้าเครื่อง hybridization ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 รอบ จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย medium stringency (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่เข้าเครื่อง hybridization ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 รอบ ระวังอย่าให้ไนลอนเมมเบรนแห้ง นำไนลอนเมมเบรนล้างด้วย washing buffer (ภาคผนวก ก) 25 มิลลิลิตร ในภาชนะที่พอดีกับไนลอนเมมเบรน เขย่าที่เครื่อง shaker เป็นเวลา 5 นาที เท washing buffer ที่เติม blocking solution (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มี anti-digoxigenin ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เท blocking solution ที่มี anti-digoxigenin ที่แห้งแล้วล้างด้วย washing buffer เขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 15 นาที เท washing buffer ที่แห้งแล้วเติม detection buffer (ภาคผนวก ก) 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 5 นาที นำไนลอนเมมเบรนใส่ถุงซิปลที่มี detection buffer 10 มิลลิลิตร และ CDP-star (GE Healthcare Life Sciences, UK) 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที นำไนลอนเมมเบรนห่อด้วยพลาสติกใสรีดเอาฟองอากาศออกให้หมด โดยหันด้านหน้าไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอเข้าประกบกับแผ่นฟิล์มภายในห้องมืด นำแผ่นฟิล์มและไนลอนเมมเบรนเข้า cassette ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดข้ามคืน จากนั้นนำแผ่นฟิล์มแยกจากไนลอนเมมเบรนในที่มืด แช่แผ่นฟิล์มในน้ำยา developer 30 วินาที ล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแช่แผ่นฟิล์มด้วยน้ำยา fixer เป็นเวลา 30 วินาที นำแผ่นฟิล์มล้างน้ำกลั่น ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นบนแผ่นฟิล์ม

บทที่ 4

ผลการทดลอง

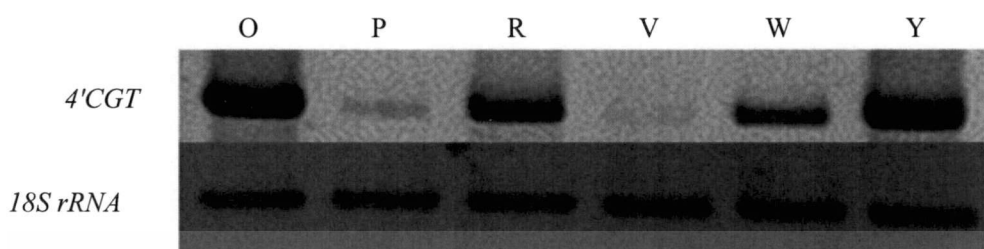
4.1 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกกลีบมังกรสีต่างๆ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์หรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

สังเคราะห์ยีน *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-BamHI-*4'CGT* และ R-*4'CGT*-SacI ที่จับบริเวณตำแหน่งอนุรักษ์บนยีน *4'CGT* ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ของยีน *4'CGT* ในกลีบมังกร โดยศึกษาในกลีบดอกกลีบมังกรพันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลือง สีชมพู สีม่วง และ สีขาว และพันธุ์ Cameo ดอกสีส้มและสีแดง (ภาพที่ 4.1) ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่สนใจ จำเป็นต้องคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืช (housekeeping gene) เป็นยีนอ้างอิงในการปรับปริมาณ cDNA เริ่มต้นที่ใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR ให้เท่ากันซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง เมื่อสามารถปรับปริมาณ cDNA ของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันสำหรับการทำ semi-quantitative PCR แล้วจึงทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกของกลีบมังกรสีต่างๆ ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์บนเจลพบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส ในตัวอย่าง cDNA จากทุกสีดอกและเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในแต่ละสีดอก พบว่า ดอกสีเหลืองมีปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* โดยมีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด รองลงมาคือสีส้ม สีแดง สีขาว สีชมพู และสีม่วง (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 ดอกกลีบมังกร สีส้ม (ก) สีชมพู (ข) สีแดง (ค) สีม่วง (ง) สีขาว (จ) สีเหลือง (ฉ) ที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลิ้นมังกร สีส้ม (O) สีชมพู (P) สีแดง (R) สีม่วง (V) สีขาว (W) และสีเหลือง (Y) ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

4.2 การแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells ภายหลังจากยับยั้งการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

ศึกษาหน้าที่ของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค RNAi และติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกพร้อมกับการแสดงออกของยีน *4'CGT*

4.2.1 การสร้างดีเอ็นเอสายผสมรูปแบบ inverted repeat เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi ในกลีบดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells

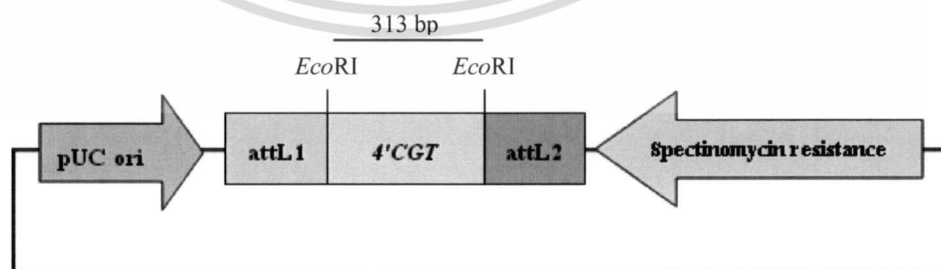
สังเคราะห์ชิ้นส่วนยีน *4'CGT* จาก cDNA ของดอกลิ้นมังกรสีเหลือง พันธุ์ Pixie Bells โดยออกแบบไพรเมอร์ตำแหน่งที่ 1,062 ถึง 1,374 บนสาย mRNA ของยีน *4'CGT* ผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์พบชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส (ภาพที่ 4.3) เมื่อใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับขั้นตอน annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์เชื่อมต่อกับพลาสมิด pCR8 เพื่อสร้างพลาสมิด pCR8-*4'CGT* (ภาพที่ 4.4) แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบโคลนด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับไพรเมอร์ F-EcoRI-*4'CGT* และ R-*4'CGT*-SacI จากนั้นคัดเลือกโคลนเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะสเปคโตโนมายซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *4'CGT* ขนาดประมาณ 300 คู่เบส ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCR8-*4'CGT* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,817 คู่เบส ที่เป็นขนาดของพลาสมิด pCR8 และ 313 คู่เบส ที่เป็นยีน *4'CGT* บางส่วน (ภาพที่ 4.5) นำส่งตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *4'CGT* จำนวน 313 คู่เบส ในพลาสมิด pCR8-*4'CGT* เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *4'CGT* ของลิ้นมังกร (EF650015.1) ตำแหน่งที่ 336 ถึง 644 คู่เบส จากนั้นทำการคัดเลือก พลาสมิด pCR8-*4'CGT* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องนำไปใช้ในการถ่ายโอนเข้าสู่พลาสมิด pJAWOHL8 ด้วยปฏิกิริยา LR แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ

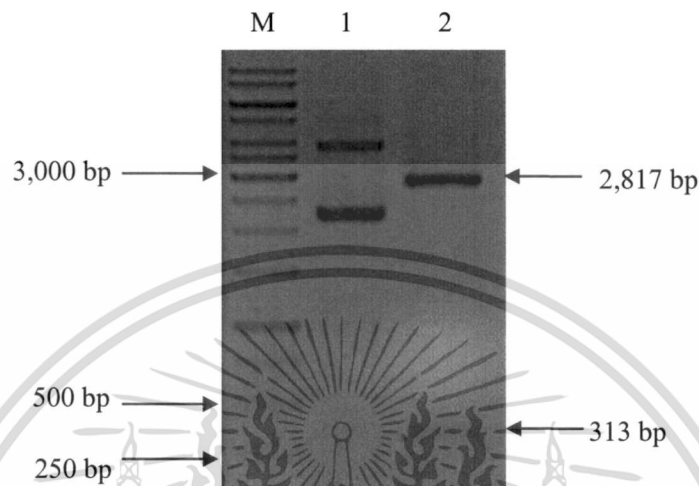


ภาพที่ 4.3 ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการสังเคราะห์ชิ้นบางส่วนของ *4'CGT* จาก cDNA ของดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells (2) ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 313 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) และ negative control คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่ได้ใส่ cDNA ของดอกลิ้นมังกร (1)



ภาพที่ 4.4 แผนภาพพลาสมิด pCR8-*4'CGT* ที่มีขนาด 3,130 คู่เบสและตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI

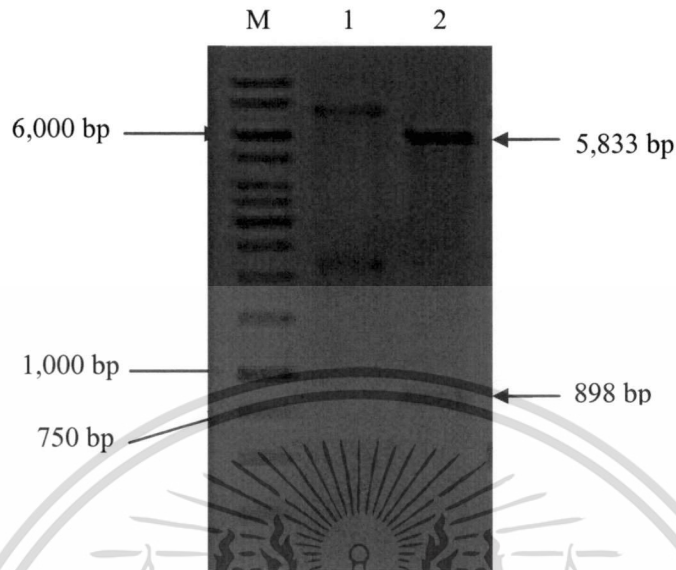
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ผลการตรวจสอบชิ้นส่วนยีน *4'CGT* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pCR8-*4'CGT* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (2) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) พลาสมิด pCR8-*4'CGT* ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (1)

4.2.2 การตรวจสอบการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีน *4'CGT* ในพลาสมิด pCR8-*4'CGT* เข้าสู่พลาสมิด pJAWOHL8 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

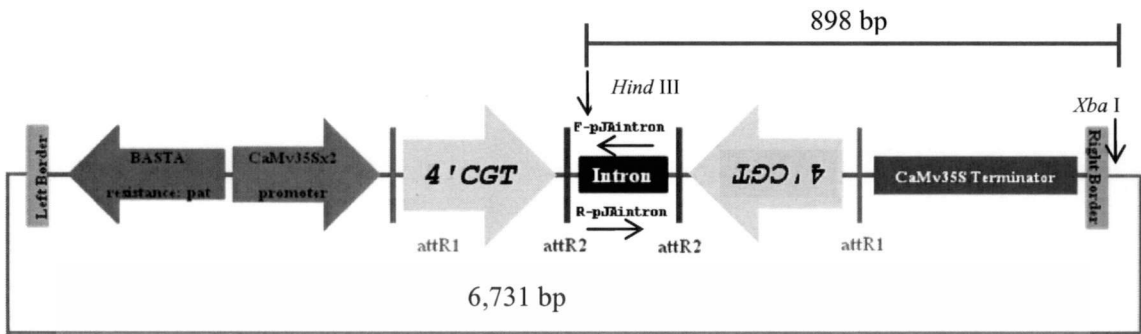
นำพลาสมิด pCR8-*4'CGT* มาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *4'CGT* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 898 คู่เบส และขนาด 5,833 คู่เบส (ภาพที่ 4.6) ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้เกิดจากการตัดของเอนไซม์ *Hind* III บริเวณ intron ของพลาสมิด pJAWOHL8 1 ตำแหน่ง และการตัดของเอนไซม์ *Xba* I บนตำแหน่งคู่เบสที่ 3,798 ของพลาสมิด pJAWOHL8 จากนั้นนำพลาสมิด pJA8-*4'CGT* ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 4.6 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8-4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I (2) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) และพลาสมิด pJAWOHL8 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I (1)

4.2.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT ของกลีบดอกลินม้งกรพันธุ์ Pixie Bells ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pJAWOHL8 (pJA8-4'CGT)

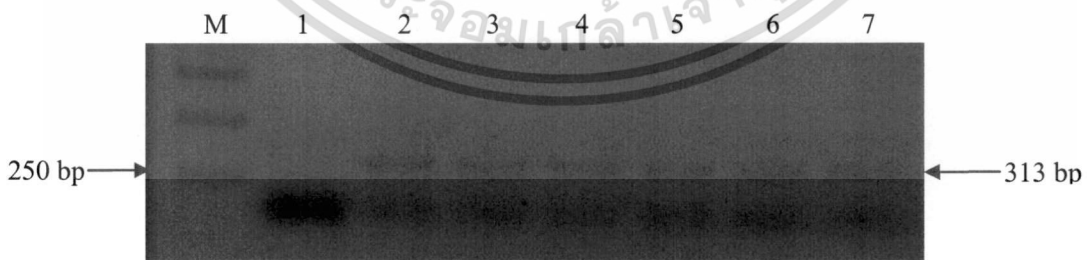
ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด pJA8-4'CGT ด้วยไพรเมอร์ F-IntronpJA8 และ R-IntronpJA8 ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ intron บนพลาสมิด pJAWOHL8 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และทิศทางของชิ้นส่วนยีน 4'CGT ในพลาสมิด pJA8-4'CGT พบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT ในพลาสมิด pJA8-4'CGT เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4'CGT ของลินม้งกร ตำแหน่งที่ 1,062 ถึง 1,374 (EF650015.1) และพบว่าชิ้นส่วนของยีน 4'CGT อยู่ขนาดทั้ง 2 ข้างของ intron ในพลาสมิด pJA8-4'CGT ในทิศทาง sense และ antisense (ภาพที่ 4.7) จากนั้นนำพลาสมิด pJA8-4'CGT ถ่ายโอนเข้าสู่โกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ด้วยวิธีการ electroporation



ภาพที่ 4.7 แผนภาพพลาสมิด pJA8-4'CGT แสดงตำแหน่งโปรโมเตอร์ F-IntronpJA8 และโปรโมเตอร์ R-IntronpJA8 และตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III และ *Xba* I (ดัดแปลงจาก Pillman. 2009)

4.2.4 ผลการตรวจสอบการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่โอรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เมื่อถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่โอรแบคทีเรียแล้ว ทำการตรวจสอบโคลนเดี่ยวด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับโปรโมเตอร์ F-EcoRI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI จากการใช้โคลนโอรแบคทีเรียเป็นต้นแบบ พบขึ้นดีเอ็นเอขนาด 313 คู่เบส จากโคลนที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8-4'CGT (ภาพที่ 4.8)



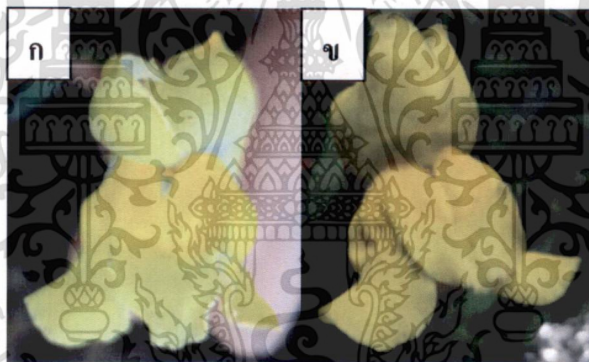
ภาพที่ 4.8 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pJA8-4'CGT ในโอรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 จำนวน 6 โคลน (2-7) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ร่วมกับโปรโมเตอร์ F-EcoRI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) และ negative control (1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.5 ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกกลี้นม้งกรด้วยวิธีการ Agro-infiltration

4.2.5.1 ลักษณะกลีบดอกกลี้นม้งกรภายหลังการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT

หลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT เข้าสู่กลีบดอกกลี้นม้งกรพันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลือง นาน 3 วัน ด้วยวิธีการ infiltration จำนวน 2 ต้น โดยต้นที่ 1 ถ่ายโอน 3 ดอก ต้นที่ 2 ถ่ายโอน 4 ดอก ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอกที่ได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด (ภาพที่ 4.9) จากนั้นนำกลีบดอกกลี้นม้งกรที่ไม่ได้รับและได้รับพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT ไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

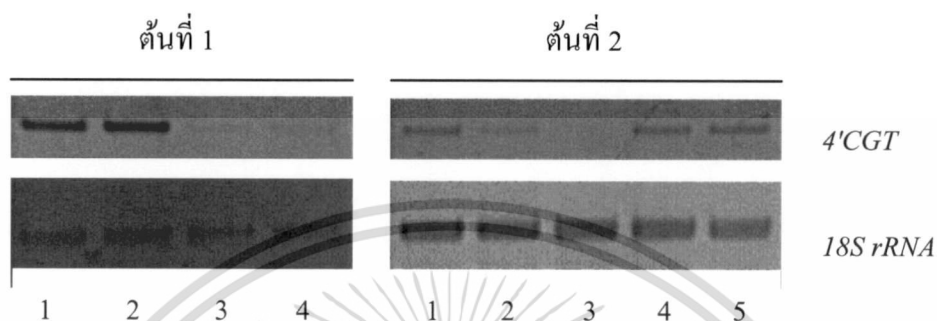


ภาพที่ 4.9 ดอกกลี้นม้งกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะเป็นเวลา 3 วัน (ก) เปรียบเทียบกับดอกกลี้นม้งกรที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-4'CGT (ข)

4.3.5.2 การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

ปรับ cDNA เริ่มต้นที่ได้จากกลีบดอกของกลี้นม้งกรที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือพลาสมิด pJA8-4'CGT ให้มีความเข้มข้นเท่ากัน โดยเปรียบเทียบจากความเข้มข้นแถบดีเอ็นเอของยีน 18S rRNA บนเจลที่ใช้เป็นยีนอ้างอิง (ภาพที่ 4.10) จากนั้นใช้ cDNA ที่ผ่านการปรับความเข้มข้น

ให้เท่ากันแล้วเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เพื่อตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT*



ภาพที่ 4.10 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลิ้นมังกรที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 (1) และกลีบดอกที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-*4'CGT* (2-4 สำหรับต้นที่ 1, 2-5 สำหรับต้นที่ 2) และมียีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

ผลจากปฏิกิริยา semi-quantitative PCR เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* โดยเปรียบเทียบจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอบนเจล จากการทดลองในดอกลิ้นมังกรพันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลืองจำนวน 2 ต้น ต้นที่ 1 ทำการถ่ายโอน 3 ดอก ต้นที่ 2 ทำการถ่ายโอน 4 ดอก พบว่าในต้นที่ 1 มีจำนวน 1 ดอก ที่มีปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* มากที่สุดในกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) ด้วยวิธีการ infiltration แต่การแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลิ้นมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJA8-*4'CGT* ลดลงอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pJAWOHL8 (control) การทดลองในต้นที่ 2 จำนวน 4 ดอก พบว่ามีปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ลดลงจำนวน 2 ดอก ในขณะที่อีก 2 ดอก มีระดับการแสดงออกของยีน *4'CGT* ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับดอกที่ถ่ายพลาสมิด pJAWOHL8 เมื่อเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ระหว่างดอกที่มีปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ลดลง กับดอกที่มีปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ไม่เปลี่ยนแปลง พบว่าดอกที่มีการแสดงออกของยีน *4'CGT* ลดลงอยู่ที่ 57.14 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนดอกทั้งหมดที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-*4'CGT*

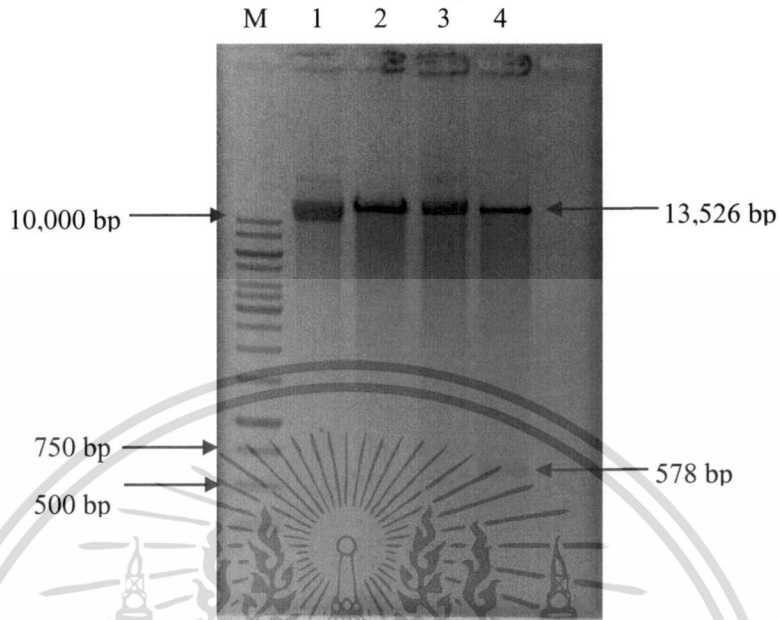
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การถ่ายยีน 4'CGT เข้าสู่แบคทีเรียโดยใช้อะโครแบคทีเรียเป็นพาหะและการยิงอนุภาค

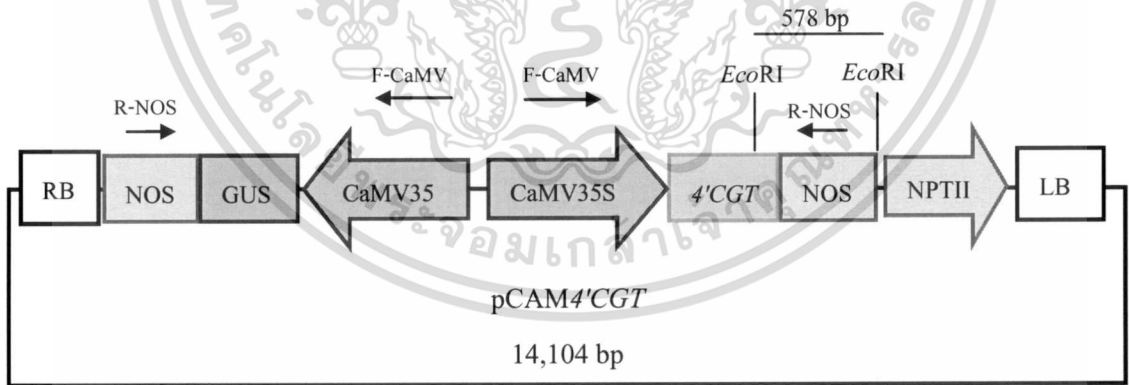
4.3.1 การตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT

สังเคราะห์ยีน 4'CGT ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์คู่กับไพรเมอร์ F-BamHI-4'CGT และ R-4'CGT-SacI ซึ่งออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4'CGT ใน cDNA ของลิ้นมังกร ขนาด 1,374 คู่เบส จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์เชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T เพื่อสร้างพลาสมิด pTZ4'CGT แล้วถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ คัดเลือกโคโลนีที่ได้ นำส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน 4'CGT ในพลาสมิด pTZ4'CGT เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4'CGT ของลิ้นมังกร (EF650015.1) 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตัดยีน 4'CGT ภายในพลาสมิด pTZ4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Sac I เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCAMBIA2301CHS ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Bam HI และ Sac I เพื่อแยกชิ้นยีน CHS ขนาด 322 คู่เบส ออกจากพลาสมิด จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณภายในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α มาสกัดพลาสมิดตามวิธีการในข้อ 3.2.2.2 เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Eco RI พบแถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 578 คู่เบส โดยตัดในยีน 4'CGT และบริเวณเทอร์มินเนเตอร์ และ 13,526 คู่เบส ในขณะที่การตัด pCAMBIA2301CHS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Eco RI ได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวมีขนาดประมาณ 13,050 คู่เบส (ภาพที่ 4.11) ผลการตรวจสอบแสดงว่าชิ้นส่วนของยีน CHS ได้ถูกตัดออกจากพลาสมิด pCAMBIA2301 และมียีน 4'CGT เชื่อมต่อกับพลาสมิด pCAMBIA2301 (ภาพที่ 4.12) แทนที่ยีน CHS จึงนำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์อะโครแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ในลำดับต่อไป

นำดีเอ็นเอสายผสม pCAM4'CGT เข้าสู่เซลล์อะโครแบคทีเรียด้วยวิธี electroporation นำโคโลนีเดียวที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหาร YM ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-CaMV และ R-NOS (ตารางภาคผนวกที่ 1) ที่ออกแบบจากตำแหน่งของโปรโมเตอร์ CaMV 35S และเทอร์มินเนเตอร์ NOS สำหรับขับเคลื่อนชิ้นยีน 4'CGT และยีน GUS ภายหลังจากตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีขนาดประมาณ 2,200 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของยีน GUS และขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของยีน 4'CGT ที่มีส่วนของตำแหน่งโปรโมเตอร์ CaMV 35S และเทอร์มินเนเตอร์ NOS เพิ่มเข้ามาอีก 134 คู่เบส (ภาพที่ 4.13)

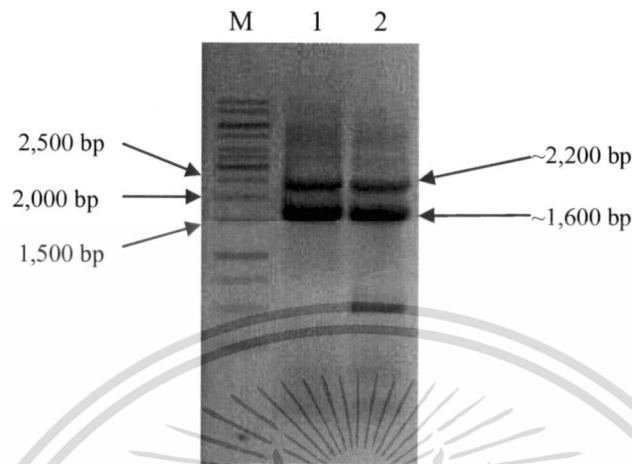


ภาพที่ 4.11 ผลการตรวจสอบพลาสมิด pCAM4'CGT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (4) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) พลาสมิด pCAMBIA2301*CHS* ที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (1) พลาสมิด pCAM*CHS* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (2) และพลาสมิด pCAM4'CGT ที่ไม่ได้ตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ (3)



ภาพที่ 4.12 แผนภาพพลาสมิด pCAM4'CGT ที่มีชิ้นส่วนของยีน 4'CGT ขนาด 1,374 คู่เบส แทรกอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



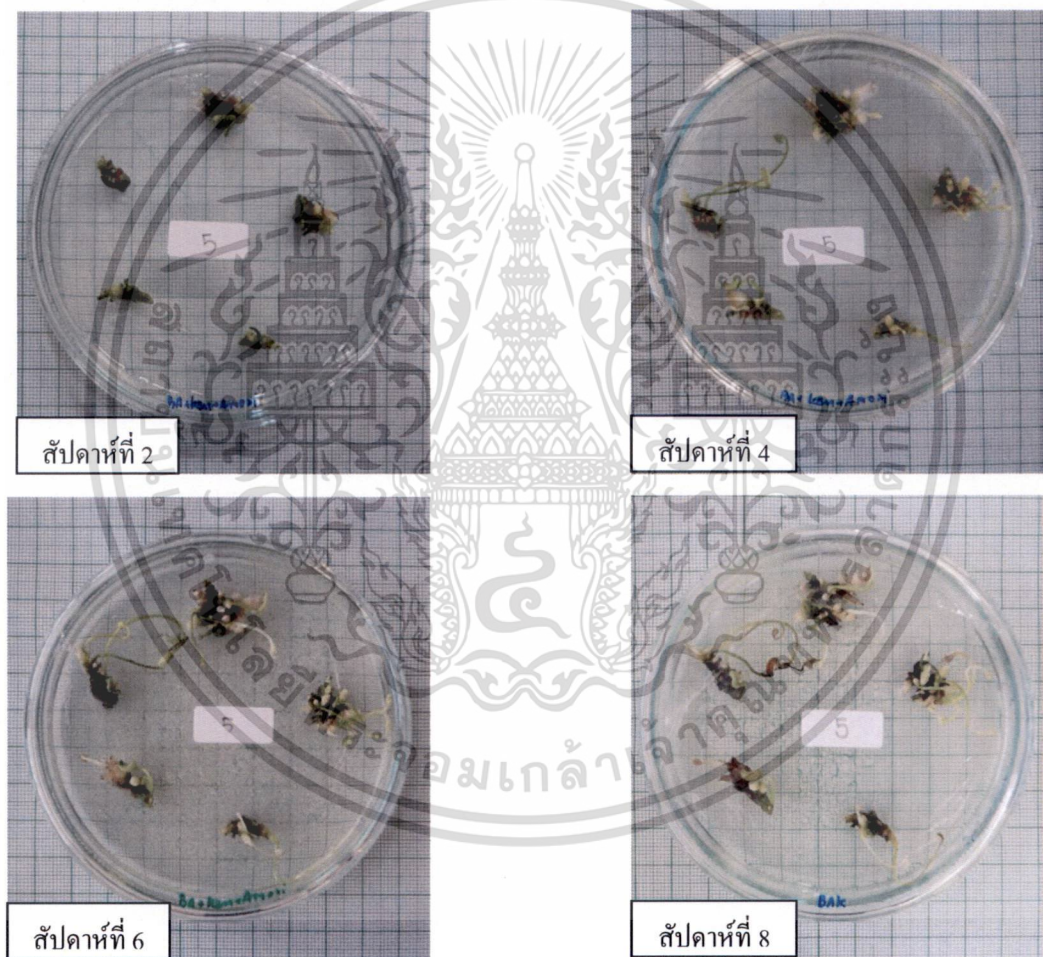
ภาพที่ 4.13 ผลการตรวจสอบโคลนนิ่งที่ 1 (1) และโคลนนิ่งที่ 2 (2) ของเซลล์อะโกรแบคทีเรียที่เตรียมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-CaMV และ R-NOS เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M)

4.3.2 การเจริญเติบโตของ shoot cluster ที่ถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะและการตรวจสอบการแสดงออกยีน *4'CGT*, *CHS*, *F3H*, *GUS* และ *NPTII*

พลาสมิด *pCAM4'CGT* ได้ถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวง โดยนำ shoot cluster เลี้ยงร่วมกับเซลล์อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด *pCAM4'CGT* ในอาหารเหลว MS ที่มีสารอะซิโตไซริงโคน ความเข้มข้น 100 μM จากนั้นเจือจางความเข้มข้นของเซลล์อะโกรแบคทีเรียเป็น 1:10 ด้วยอาหารเหลว MS แช่ร่วมกันเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้าย shoot cluster ลงบนอาหารแข็ง MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะม็อกซิซิลลิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร shoot cluster ของบัวหลวงที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 442 ชิ้น แบ่งเป็นครั้งที่ 1 จำนวน 100 ชิ้น ครั้งที่ 2 จำนวน 100 ชิ้น ครั้งที่ 3 จำนวน 95 ชิ้น ครั้งที่ 4 จำนวน 63 ชิ้น และครั้งที่ 5 จำนวน 84 ชิ้น โดยครั้งที่ 1-3 ไม่พบต้นบัวหลวงที่รอดชีวิต ส่วนครั้งที่ 4 พบต้นบัวหลวงที่รอดชีวิตโดยเปลี่ยนอาหารและบันทึกการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 4.14) พบว่า shoot cluster ของบัวหลวงสามารถพัฒนาเป็นยอดใหม่เพิ่มขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 12 โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ย 5 ยอด โดยหลังจากสัปดาห์ที่ 12 ขนาดยอดเฉลี่ยมีแนวโน้มลดลงและเมื่อ shoot cluster มีอายุ 14 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าจำนวนยอดเฉลี่ยได้ลดลงเหลือ 2.52 ยอด เนื่องจากชิ้นส่วนตายหรือยอดตาย เมื่อศึกษาขนาดชิ้นส่วนเฉลี่ยพบว่าชิ้นส่วน shoot cluster มีขนาดเพิ่มมากขึ้นจนถึงสัปดาห์ที่ 12 มีขนาดเฉลี่ย 1.49 เซนติเมตร โดยหลังจากสัปดาห์ที่ 12 การเจริญเติบโตมีแนวโน้มลดลงเหลือ 1.34 เซนติเมตร และเมื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ shoot cluster หลังจากการถ่ายยีน พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 ถึง 6 โดย shoot cluster มีอัตราการรอดชีวิตที่ 96.82 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นในสัปดาห์ที่ 8, 10, 12 และ 14 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 88.88, 82.53, 44.44 และ 36.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย shoot cluster ที่ตายจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้มทั่วชิ้นส่วน (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.14 การเจริญเติบโตของ shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหารคัดเลือกลายหลังการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะครั้งที่ 4 เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 จำนวนยอดเฉลี่ย ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ shoot cluster บนอาหาร MS ที่มี BA 50 ไมโคร โมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะม็อกซิซิลลิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ครั้งที่ 1-5

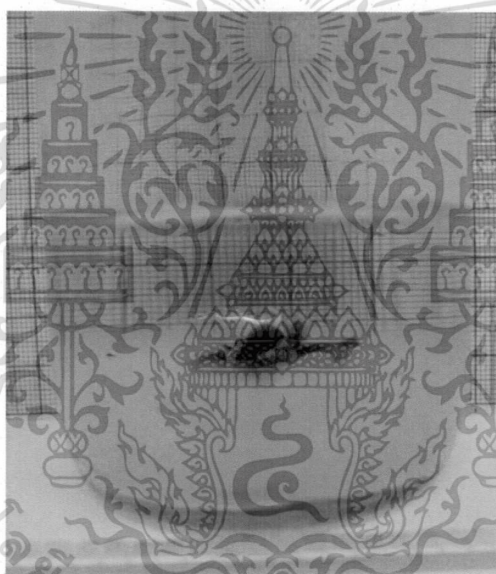
		ชั้นส่วน shoot cluster หลังการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรีย อายุ (สัปดาห์)		
		4	8	12
ครั้งที่ 1	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชั้น (ยอด)	2.45±1.21	2.74±1.46	2.73±1.48
	ขนาดเฉลี่ยของ shoot cluster (ซ.ม.)	1.03±0.27	1.11±0.32	1.12±0.33
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	60	54	52
ครั้งที่ 2	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชั้น (ยอด)	2.44±1.25	2.67±1.36	2.66±1.38
	ขนาดเฉลี่ยของ shoot cluster (เซนติเมตร)	1.06±0.26	1.12±0.30	1.12±0.31
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	59	52	50

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) จำนวนยอดเฉลี่ย ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิตและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ shoot cluster บนอาหาร MS ที่มี BA 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะม็อกซิซิลลิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะครั้งที่ 1-5

		ชิ้นส่วน shoot cluster หลังการถ่ายยีนแบบอะโกรแบคทีเรีย อายุ (สัปดาห์)						
		2	4	6	8	10	12	14
ครั้งที่ 3	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น (ยอด)	2.53±1.13	2.52±1.13	2.58±1.08	2±0.83	1.93±0.89	2.04±1.09	1.5±0.05
	ขนาดเฉลี่ยของ shoot cluster (ซ.ม.)	0.81±0.23	0.81±0.23	0.82±0.24	0.93±0.34	1.10±0.42	1.01±0.46	0.8±0.46
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	100	100	88.42	54.73	33.68	22.10	6.31
ครั้งที่ 4	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น (ยอด)	3.32±1.22	3.63±1.46	4.18±1.68	5.01±2.38	5.15±2.51	5.00±2.13	2.52±1.05
	ขนาดเฉลี่ยของ shoot cluster (ซ.ม.)	0.96±0.22	1.15±0.31	1.23±0.34	1.47±0.44	1.48±0.45	1.49±0.45	1.34±0.41
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	96.82	96.82	96.82	88.88	82.53	44.44	36.50
ครั้งที่ 5	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น (ยอด)	3.11±1.13	3.94±1.64	3.95±1.61	3.90±1.63	3.95±1.5	6.58±1.23	2.63±1.12
	ขนาดเฉลี่ยของ shoot cluster (ซ.ม.)	0.89±0.30	1.13±0.40	1.12±0.40	1.12±0.43	1.16±0.45	1.12±0.41	1.05±0.40
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	100	82.14	72.61	61.90	53.57	48.80	48.80

4.3.2.1 การเจริญเติบโตของ shoot cluster บั้วหลวง ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยสารปฏิชีวนะกานามัยซินบนอาหารชักนำสูตร MS

นำ shoot cluster ที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 23 ชิ้น มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ โดยเติมอาหารเหลว MS ร่วมด้วย พบว่ามีชิ้นส่วนที่มีการแตกยอดเพิ่มขึ้นเพียง 1 ต้น ภายใน 2 สัปดาห์ โดยมียอดเพิ่มขึ้นเพียง 1 ยอด ในขณะที่ชิ้นอื่นๆ ยอดเริ่มมีสีน้ำตาลคล้ำ และตาย (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.15 shoot cluster ของบั้วหลวงบนอาหารชักนำสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ อายุ 16 สัปดาห์

4.3.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT, GUS และ NPTII หลังจากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ

หลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT เข้าสู่ shoot cluster ของต้นบั้วหลวง โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ ภายหลังจากคัดเลือก shoot cluster บนอาหาร MS ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับอะม็อกซิซิลลินความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 14 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนใบของต้นบัวหลวงจำนวน 5 ต้น แบ่งเป็นบัวหลวงปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 2 ต้น และบัวหลวงที่รอดชีวิตจากการเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกจำนวน 3 ต้น มาสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-Bam HI-4'CGT และ R-4'CGT –Sac I (ตารางผนวกที่ 1) พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 นิวคลีโอไทด์ จากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 3 ต้น คือต้นที่ 19, 29 และ 43 จากทั้งหมดที่สุ่มมาตรวจสอบ 3 ต้น (ภาพที่ 4.16) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* และ *NPTII* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-gusA และ R-gusA สำหรับยีน *GUS* ไพรเมอร์ F-NPTII และ R-NPTII สำหรับยีน *NPTII* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 นิวคลีโอไทด์ สำหรับยีน *GUS* (ภาพที่ 4.16) และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ สำหรับยีน *NPTII* (ภาพที่ 4.16) จากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้ง 3 ต้นที่สุ่มมาตรวจสอบ



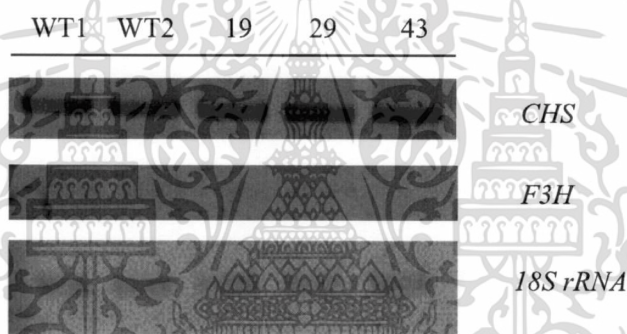
ภาพที่ 4.16 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT*, *GUS* และ *NPTII* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT โดยใช้เชื้อโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ (19, 29 และ 43) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) และต้นบัวหลวงปกติ (1 และ 2)

4.3.2.3 การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ภายหลังการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT เข้าสู่ shoot cluster นำไปมาสกัดอาร์เอ็นเอตามข้อที่ 3.2.3.7.2 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์ cDNA ตามข้อที่ 3.2.1.4 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาและอุณหภูมิ ปรับปริมาณความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นด้วยยีน *18S rRNA* ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยไพรเมอร์ CHSF และไพรเมอร์ CHSR และการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยไพรเมอร์ F3H_SenseF และไพรเมอร์ F3H_STOP จากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนและไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT โดยพบว่าบัวหลวงที่นำมาตรวจสอบทั้ง 3 ต้นมีการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* และพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ (ภาพที่ 4.17)



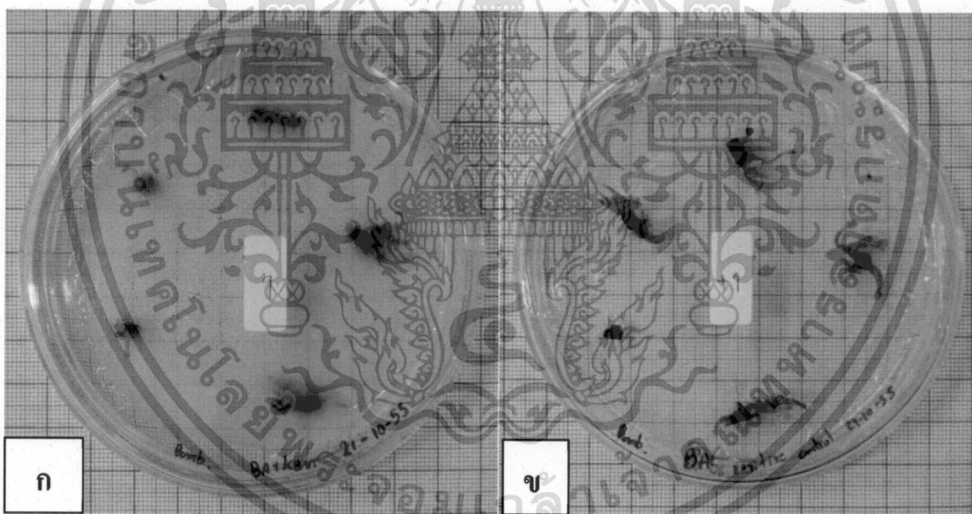
ภาพที่ 4.17 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT (ต้นที่ 19, 29 และ 43) โดยใช้อะโกรีแบคทีเรียเป็นพาหะ โดยเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ (WT1 และ WT2) และมียีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

4.3.3 การเจริญเติบโตของ shoot cluster ที่ถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคและการตรวจสอบการแสดงออกยีน 4'CGT, *CHS*, *F3H*, *GUS* และ *NPTII*

4.3.3.1 การคัดเลือก shoot cluster ของบัวหลวงบนอาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

ใช้ shoot cluster ของบัวหลวงในการทดลองทั้งหมด 274 ต้น แบ่งเป็นครั้งที่ 1 จำนวน 110 ต้น ครั้งที่ 2 จำนวน 82 ต้น และครั้งที่ 3 จำนวน 82 ต้น โดยเปลี่ยนอาหารและบันทึกการเจริญเติบโตทุก 2 สัปดาห์ พบว่าในการถ่ายยีนครั้งที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยง shoot cluster ของบัวหลวงบน

อาหาร MS ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ยอดของ shoot cluster ไม่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินส่งผลให้ shoot cluster ของบัวหลวงไม่มีการเจริญเติบโตและเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซึ่งมีจำนวนยอดเฉลี่ยลดลงจาก 2.78 ยอด เหลือ 1.58 ยอด ในสัปดาห์ที่ 16 (ภาพที่ 4.18) เมื่อศึกษาขนาดชิ้นส่วนเฉลี่ยพบว่าชิ้นส่วน shoot cluster มีขนาดเพิ่มขึ้นโดยสัปดาห์ที่ 6 มีขนาดชิ้นส่วนเฉลี่ย 1.17 เซนติเมตร และขนาดของชิ้นส่วนเฉลี่ยลดลงเหลือ 1.13 เซนติเมตรในสัปดาห์ที่ 8 และในสัปดาห์ที่ 16 พบว่าขนาดชิ้นส่วนเฉลี่ยอยู่ที่ 0.46 เซนติเมตร เมื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของชิ้นส่วน shoot cluster หลังจากการถ่ายยีน พบว่าชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยในสัปดาห์ที่ 16 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 35.45 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) ส่วนการถ่ายยีนครั้งที่ 2 ไม่พบต้นที่รอดชีวิต ในขณะที่ครั้งที่ 3 ต้นบัวหลวงยังไม่มีการเจริญเติบโตของใบเพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน



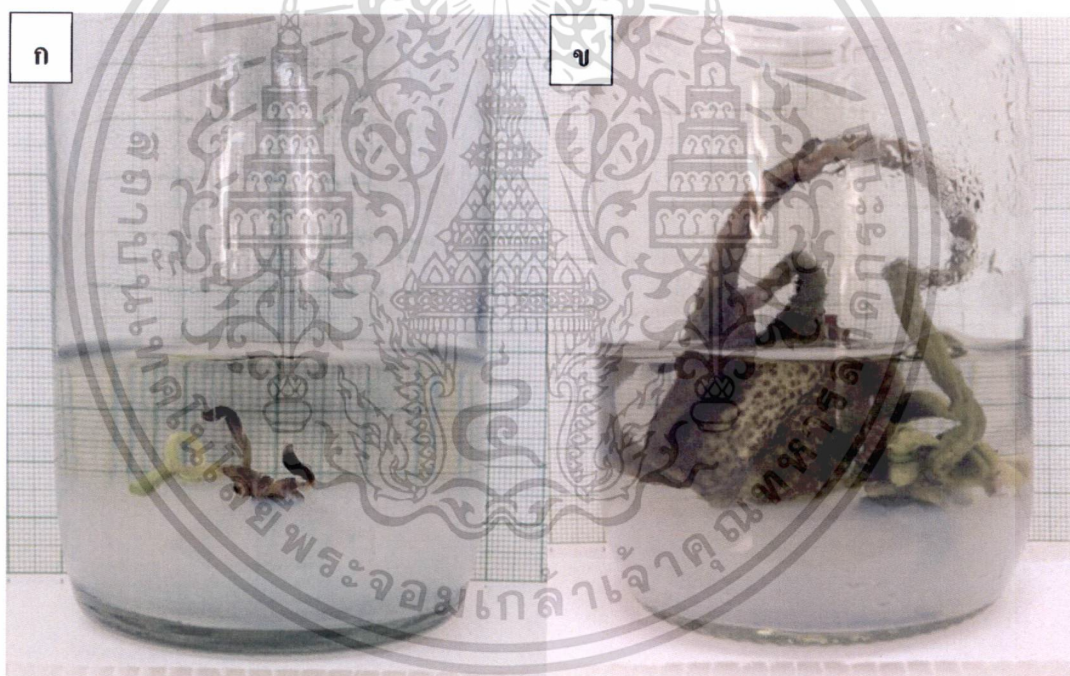
ภาพที่ 4.18 การเจริญเติบโตของ shoot cluster ของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT แบบการยิงอนุภาคครั้งที่ 1 (ก) และ shoot cluster ของบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT (ข)

ตารางที่ 4.2 จำนวนยอดเฉลี่ย ขนาดของ shoot cluster เฉลี่ย จำนวน shoot cluster ที่รอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ shoot cluster หลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาคบนอาหาร MS และ BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ กานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

		ชิ้นส่วน shoot cluster หลังการถ่ายยีนแบบการยิงอนุภาค อายุ (สัปดาห์)							
		2	4	6	8	10	12	14	16
ครั้งที่ 1	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น (ยอด)	2.78±1.49	2.45±1.20	2.8±1.46	2.77±1.41	2.74±1.39	2.72±1.42	2.65±1.41	1.58±1.04
	ขนาดเฉลี่ยของ shoot cluster (ซ.ม.)	0.99±0.31	1.05±0.27	1.17±0.30	1.13±0.32	1.12±0.32	1.12±0.33	1.12±0.33	0.46±0.36
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	63.63	60	56.36	53.63	51.88	52.72	52.72	35.45
ครั้งที่ 2	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น (ยอด)	2.88±1.50	2.35±1.22	2.35±1.22	2±1.18	2.14±1.19	2.14±1.19	2.14±1.19	2.14±1.19
	ขนาดเฉลี่ยของ shoot cluster (ซ.ม.)	0.73±0.31	0.83±0.22	0.83±0.22	0.84±0.26	0.92±0.31	0.92±0.31	0.92±0.31	0.92±0.31
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	54.87	47.56	47.56	41.46	41.46	41.46	41.46	41.46
ครั้งที่ 3	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น (ยอด)	2.90±1.51	2.41±1.33	2.57±1.45	2.89±1.47	3.03±1.40	3.03±1.42	3±1.46	2.92±1.51
	ขนาดเฉลี่ยของ shoot cluster (ซ.ม.)	0.74±0.29	0.83±0.23	0.86±0.24	0.9±0.24	0.97±0.25	1.03±0.24	1.07±0.27	1.03±0.26
	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต	53.65	47.56	40.24	35.36	31.70	31.70	31.70	31.70

4.3.3.2 การเจริญเติบโตของ shoot cluster บั้วหลงหลังจากการถ่ายยีน

นำ shoot cluster ที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกบนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มี BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์ โดยเติมอาหารเหลว MS ร่วมด้วย โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ พบว่ามีต้นบั้วหลงที่สามารถรอดชีวิตได้หลังจากเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จำนวน 9 ต้น โดยในจำนวน 9 ต้น มีเพียงต้นเดียวที่มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าการแตกยอดใหม่ในสัปดาห์ที่ 32 จำนวน 1 ยอด มีขนาด 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.19) จากนั้นนำต้นบั้วหลงที่ผ่านการคัดเลือกไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT*, *GUS*, *NPTII*, *CHS* และ *F3H* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

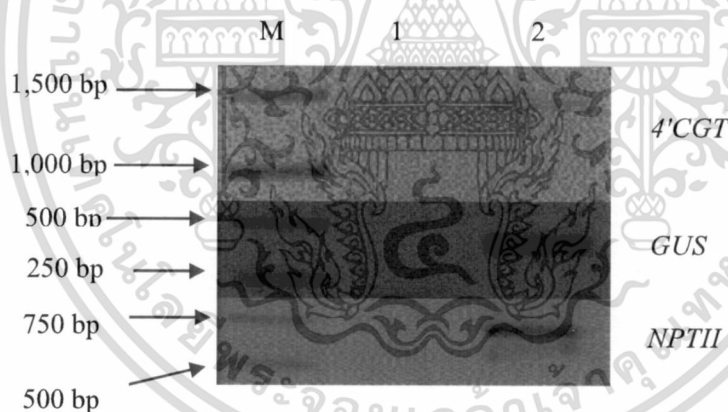


ภาพที่ 4.19 ต้นบั้วหลงที่ได้รับการถ่ายยีนแบบการยิงอนุภาค อายุ 32 สัปดาห์ (ก) และ 40 สัปดาห์ (ข) บนอาหาร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.54 ไมโครโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT*, *GUS* และ *NPTII* หลังการถ่ายยีนด้วยวิธีการยิงอนุภาค

ภายหลังการคัดเลือกต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายพลาสมิด *pCAM4'CGT* บนอาหาร MS ที่มีกานามัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ นำชิ้นส่วนใบของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนและรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกจำนวน 1 ต้น มาสกัดอาร์เอ็นเอแล้วทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-Bam HI-4'CGT และ R-4'CGT-Sac I (ตารางผนวกที่ 1) พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 คู่เบสในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* (ภาพที่ 4.20) และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F-gusA และ R-gusA สำหรับยีน *GUS* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส (ภาพที่ 4.20) และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPTII* โดยใช้ไพรเมอร์ F-NPTII และ R-NPTII สำหรับยีน *NPTII* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส ในขณะที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ cDNA จากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 4.20)



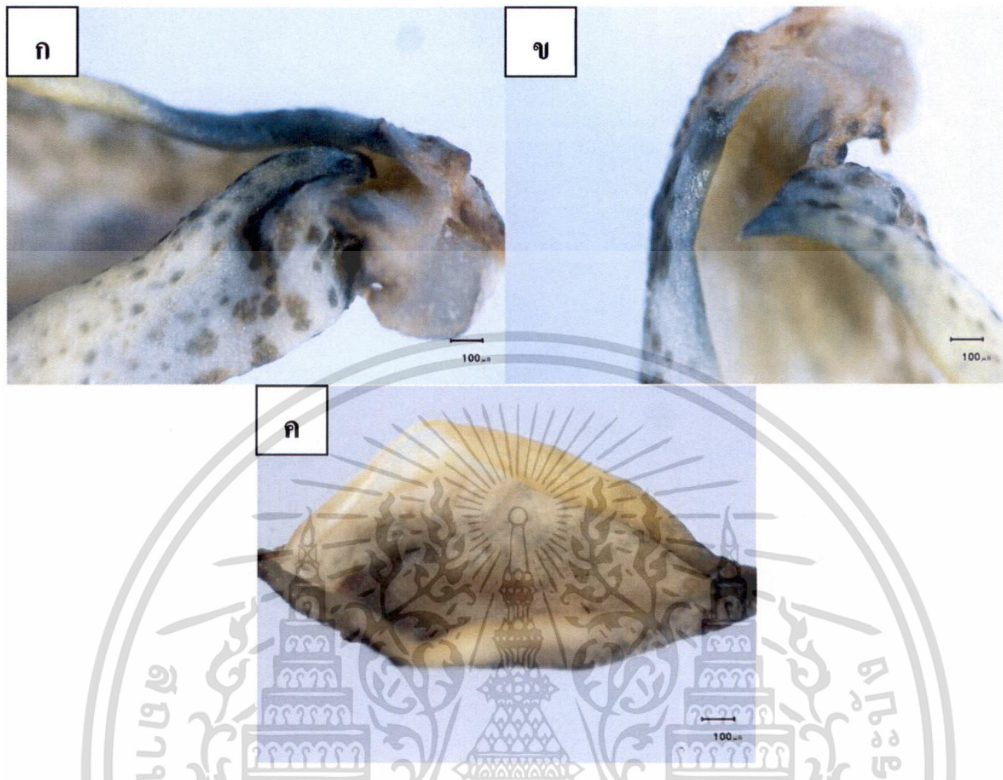
ภาพที่ 4.20 ผลการสังเคราะห์ยีน *4'CGT*, *GUS* และ *NPTII* ด้วยเทคนิค RT-PCR จาก cDNA ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* ด้วยวิธีการยิงอนุภาคครั้งที่ 1 (2) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (M) และต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* (1)

4.3.3.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ของต้นบัวหลวงพันธุ์ปุณทริกที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* ด้วยวิธี *GUS* histochemical assay

ในการตรวจสอบผลการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* สามารถตรวจสอบได้โดยศึกษาการแสดงออกของยีน *GUS* ซึ่งเป็นยีนรายงานผล โดยหลังจากนำใบและก้านใบของบัวหลวงพันธุ์ปุณทริก อายุ 36 สัปดาห์ ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* ด้วยวิธีการยิงอนุภาคและผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่มีการเติมสารปฏิชีวนะมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี *GUS* histochemical assay พบว่าชิ้นส่วนใบของบัวหลวงพันธุ์ปุณทริกที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* แสดงการติดสีน้ำเงินเป็นบางส่วนที่บริเวณของใบ ในขณะที่ต้นบัวหลวงพันธุ์ปุณทริกปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* ไม่พบการติดสีน้ำเงินในทุกบริเวณของใบ (ภาพที่ 4.21) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าใน shoot cluster ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* ด้วยวิธีการยิงอนุภาคมีการทำงานของยีน *GUS* ซึ่งเป็นยีนรายงานผล

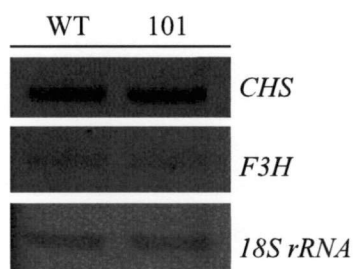
4.3.3.5 การติดตามปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR

ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* เข้าสู่ shoot cluster ของบัวหลวง นำใบจากต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* ด้วยวิธีการยิงอนุภาคมาสกัดอาร์เอ็นเอและทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ส่วนผสมของปฏิกิริยาและอุณหภูมิตามที่ 3.2.3.4.3 ปรับปริมาณความเข้มข้นของ cDNA ให้เท่ากันโดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง ผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์พบการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ในตัวอย่าง cDNA จากบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนและไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* โดยการแสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* นั้นไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* (ภาพที่ 4.22)



ภาพที่ 4.21 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ของชิ้นส่วนใบ (ก และ ข) ของต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* ด้วยวิธีการยิงอนุภาคเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนใบ (ค) ของต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT*

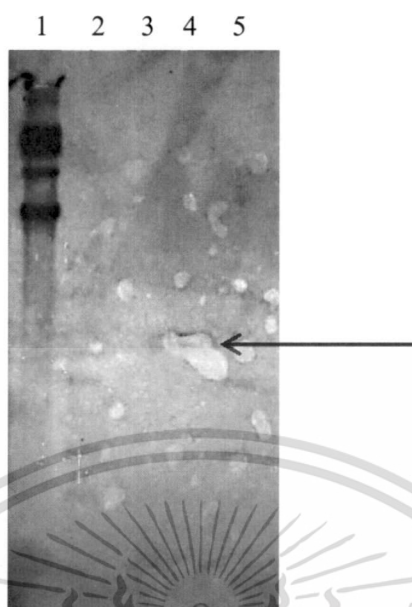
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *F3H* ในต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'*CGT* (ต้นที่ 101) ด้วยวิธีการยิงอนุภาค โดยเปรียบเทียบกับต้นบัวหลวงปกติ (WT) และยีน *18S rRNA*

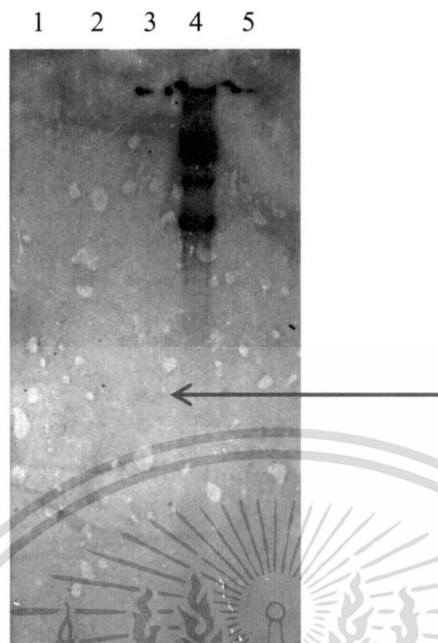
4.3.3.6 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน 4'*CGT* และยีน *GUS* ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Southern blot hybridization

ในการตรวจสอบพืชที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถทำได้ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization เพื่อยืนยันว่าในโครโมโซมพืชมียีน 4'*CGT* และยีน *GUS* ที่ถ่ายเข้าสู่ต้นบัวหลวง โดยเตรียมดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนก้านใบและใบพืชมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Bam* HI ร่วมกับ *Eco* RI และใช้ digoxigenin-labeled 4'*CGT* probe และ digoxigenin-labeled *GUS* probe เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน 4'*CGT* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอ (ตำแหน่งลูกศรสีแดง) ขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI ร่วมกับ *Eco* RI ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAM4'*CGT* (ภาพที่ 4.23) โดยขนาดของดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI บริเวณยีน 4'*CGT* และตำแหน่งตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะบนโครโมโซมของบัวหลวง ส่วนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI นั้น ไม่พบแถบดีเอ็นเอ



ภาพที่ 4.23 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,500 คู่เบส (ตำแหน่งลูกศรสีแดง) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (2 และ 5) ดีเอ็นเอบับหวางที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (3) และดีเอ็นเอบับหวางที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Eco* RI (4) โดยมีพลาสมิด pCAM4'*CGT* (1) เป็น positive control

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอ (ตำแหน่งลูกศรสีแดง) ในต้นบับหวางที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยพลาสมิด pCAM4'*CGT* เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.24) โดยมีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส แสดงให้เห็นว่ายีน *4'CGT* และยีน *GUS* นั้นได้สอดแทรกเข้าไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอในโครโมโซมของต้นบับหวางที่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 4.24 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบแถบดีเอ็นเอขนาด 3,000 คู่เบส (ตำแหน่งลูกศรสีแดง) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (2 และ 5) ดีเอ็นเอบัลลงที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (3) และดีเอ็นเอบัลลงที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Eco* RI (4) โดยมีพลาสมิด pCAM4'CGT(1) เป็น positive control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การแสดงออกของยีน 4'CGT ในกลีบดอกกลีบมังกรสีต่างๆ

การศึกษาการแสดงออกของยีน 4'CGT ในดอกกลีบมังกรพันธุ์ Pixie Bells ดอกสีเหลือง สีชมพู สีม่วง และ สีขาว และ พันธุ์ Cameo ดอกสีส้มและแดงด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์สหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) พบว่าดอกกลีบมังกรแต่ละสีที่นำมาศึกษามีระดับการแสดงออกของยีน 4'CGT ที่แตกต่างกัน โดยพบว่าในดอกสีเหลืองมีปริมาณการแสดงออกของยีน 4'CGT มากที่สุด รองลงมาคือดอกสี ส้ม แดง ขาว ชมพู และพบการแสดงออกน้อยที่สุดในดอกสีม่วง ทั้งนี้เนื่องมาจากในแต่ละสีดอกมีเอ็นทีควบคุมการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันเช่น ในดอกสีแดงหรือสีส้มยีนที่มีบทบาทสำคัญคือ *DFR* ซึ่ง Nakatsuka *et al.* (2007) ได้ศึกษาการผลิตดอกยาสูบสีแดงโดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *FLS* และ *F3'H* ของดอกยาสูบสีชมพู ด้วยเทคนิค RNAi ร่วมกับการถ่ายยีน *DFR* ที่ได้จากเยอร์บีร่าเพื่อให้มีการสะสมสาร pelargonidin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานินและสามารถผลิตดอกยาสูบสีส้มได้ แสดงให้เห็นว่ายีน *DFR* มีบทบาทสำคัญในการผลิตดอกไม้ในกลุ่มดอกสีส้ม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tsuda *et al.* (2004) ที่ศึกษาการผลิตดอกพิทูเนียสีส้มโดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'H* ด้วยเทคนิค RNAi ในดอกสีแดงที่มีการสะสมสาร cyanidin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน และเมื่อถ่ายยีน *DFR* ที่ได้จากกุหลาบเพิ่มเข้าไปพบว่าได้ดอกยาสูบสีส้ม แสดงให้เห็นว่ายีน *F3'H* มีบทบาทสำคัญในการผลิตดอกไม้ในกลุ่มดอกสีแดงรวมถึงในกลุ่มดอกสีชมพูด้วย รายงานของ Ueyama *et al.* (2002) พบว่าเมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3'5'H* ในดอกแวมยุราพันธุ์ summerwave blue ที่เป็นดอกสีม่วง ทำให้ได้ดอกแวมยุราสีชมพูอ่อนและเมื่อนำต้นแวมยุราดอกสีชมพูอ่อนมาถ่ายยีน *F3'H* ซึ่งได้ดอกแวมยุราสีชมพูเข้ม สำหรับดอกสีม่วงเป็นดอกที่มีการสะสมแอนโทไซยานินชนิด delphinidin ที่เป็นผลผลิตจากยีน *F3'5'H* โดย Katsumoto *et al.* (2007) พบว่าการถ่ายยีน *F3'5'H* จาก *viola* คู่กับการยับยั้งยีน *DFR* ในดอกกุหลาบสามารถทำให้ดอกกุหลาบมีการผลิตสาร delphinidin มากขึ้นและมีสีดอกกุหลาบที่เปลี่ยนไปทางสีม่วงมากขึ้น ส่วนในดอกสีขาวพบว่ายีน *CHS* นั้นมีบทบาทสำคัญโดยมีรายงานของ Van Der Krol *et al.* (1990) ที่รายงานผลการยับยั้งยีน *CHS* ในดอกยาสูบจากเดิมที่เป็นดอกสีชมพูและเมื่อยับยั้งยีน *CHS* ด้วยเทคนิค antisense สามารถทำให้เกิดดอกยาสูบสีขาวได้ แสดงให้เห็นว่ายีน *CHS* มีบทบาทสำคัญที่ทำให้ดอกไม้เป็นสีขาวได้ ในขณะที่ยีน 4'CGT มีบทบาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำคัญในการสังเคราะห์สารในกลุ่มออโรนที่ให้โทนสีเหลืองในกลีบดอกลินมังกร ซึ่ง Ono *et al.* (2006) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของดอกแวมยูราจากดอกสีม่วงที่มีการสะสมสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน และให้โทนสีม่วง ภายหลังการยับยั้งยีน *DFR* ควบคู่กับการถ่ายยีน *4'CGT* และ *AS* พบว่าดอกแวมยูรา มีการเปลี่ยนแปลงจากดอกสีม่วงเป็นดอกสีเหลืองสดทั้งดอก ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีน *4'CGT* จึงมีผลต่อการสังเคราะห์สารสีภายในเซลล์ จากการทดลองสามารถพบระดับการแสดงออกของยีน *4'CGT* ได้มากที่สุด ในดอกสีเหลือง

5.2 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลินมังกรสีเหลืองพันธุ์ Pixie Bells ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi)

ยับยั้งการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค RNAi ภายหลังจากการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 หรือ pJA8-*4'CGT* เข้าสู่กลีบดอกลินมังกร พบว่ากลีบดอกลินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-*4'CGT* ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีดอก อาจเนื่องจากยีนที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงสีดอกเป็นยีนที่ทำงานร่วมกันกับยีนอื่น (multiple genes) ในกระบวนการสังเคราะห์สารสี (Ono *et al.* 2006) ดังนั้นการยับยั้งการแสดงออกของยีน *4'CGT* เพียงยีนเดียวอาจยังไม่เพียงพอต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *4'CGT* ในกลีบดอกลินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-*4'CGT* พบว่าดอกลินมังกรที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJA8-*4'CGT* จำนวน 3 ดอก จากทั้งหมด 7 ดอก ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *4'CGT* ทั้งนี้อาจเกิดจากการรบกวนบริเวณ *attL* ระหว่างทำปฏิกิริยา LR และมีผลต่อการเกิดโครงสร้าง hairpin RNA ภายในเซลล์พืช (Helliwell and Waterhouse. 2003) ในขณะที่อีก 4 ดอก มีการแสดงออกของยีน *4'CGT* ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pJAWOHL8 ทั้งนี้เกิดจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *4'CGT* ด้วยกระบวนการ RNAi จากการถ่ายยีนด้วยวิธี Agro-infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะในกลีบดอกลินมังกร ซึ่งการทดลองยับยั้งการแสดงออกของยีนประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น Hoffmann *et al.* (2006) ได้ศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* ด้วยเทคนิค RNAi แบบชั่วคราวด้วยวิธี Agro-infiltration เข้าสู่ผลสตอเบอร์รี่ พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *CHS* ลดลงและกิจกรรมการทำงานของยีน *CHS* ก็ลดลงด้วย Shang *et al.* (2007) ได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CHS* และยีน *Roseal* ซึ่งเป็นยีนทำหน้าที่ transcription factor ด้วยเทคนิค RNAi ในตาดอก ลินมังกรโดยวิธีการยิงอนุภาค (particle bombardment) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร Murashige and Skoog (MS) ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าตาดอกที่เจริญบนอาหาร MS ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 8 วัน เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกลินมังกรจากสีแดงเป็นสีขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การแสดงออกของยีน 4'CGT ในบัวหลวงพันธุ์ปลูกทรานส์เจนิก ภายหลังจากถ่ายยีน 4'CGT โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะและการยิงอนุภาค

การถ่ายโอนยีน 4'CGT เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ปลูกทรานส์เจนิกโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะโดยคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะม็อกซิซิลลิน ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีนได้เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR แต่พบการปนเปื้อนของเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ขึ้นพืชแม้ว่าตามรายงานของ สุภาภรณ์ และคณะ (2547) พบว่าอ็อกเมนดิน ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียได้ 100 เปอร์เซ็นต์ก็ตาม ในการทดลองนี้สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียของต้นบัวหลวงถ่ายยีนได้ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของวิลาสินี ลิทธิทรัพย์ (2554) ที่ใช้สารปฏิชีวนะซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 และพบว่าชิ้นส่วนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 15.55 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเพียง 2 ต้นที่พบเจอยีน *DFR GUS* และ *NPTII* ในขณะที่ต้นบัวหลวงหยุดการเจริญเติบโต ไม่มีการสร้างใบใหม่จึงไม่สามารถนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี *GUS* histochemical assay ได้ ทั้งนี้ต้นบัวหลวงถูกเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นเวลานานเกินไป อาจมีผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งส่งผลกระทบต่อเซลล์จึงทำให้เซลล์พืชไม่มีการเพิ่มจำนวน (Miki and McHuge, 2004) และอาจมีผลให้อัตราการพัฒนาเป็นยอดของชิ้นพืชลดลงได้ โดยที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเกิดยอดลดลงกว่าครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ได้ใส่สารปฏิชีวนะ (Ling *et al.* 1998) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกต้นถ่ายยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจะเพิ่มมากขึ้นหากนำชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีนมาเลี้ยงบนอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ เพื่อลดการตายของชิ้นส่วนที่ยังมีขนาดเล็ก (Gondo *et al.* 2009) เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน 4'CGT ในบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR พบว่าต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับและที่ได้รับ การถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT มีการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ยีน 4'CGT *GUS* และ *NPTII* นั้นสามารถตรวจพบได้เฉพาะในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pCAM4'CGT เท่านั้น โดยในงานวิจัยของ Ono *et al.* (2006) ได้ถ่ายยีน 4'CGT แบบ overexpression เข้าสู่ดอกแวมยูราพบว่าองค์ประกอบฟลาโวนอยด์เช่น แอนโทไซยานินและฟลาโวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ต้องอาศัยยีน *F3H* ในการสังเคราะห์นั้นยังคงมีการแสดงออกปกติซึ่งไม่แตกต่างกับดอกแวมยูราที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *4'CGT*

การถ่ายโอนยีน *4'CGT* เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์ปลูกทริกด้วยวิธีการยิงอนุภาค สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในต้นบัวหลวงที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 4.44 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* และตรวจสอบการแสดงออกของยีน *F3H* และ *CHS* พบว่ามีการแสดงออกไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดและต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* ในขณะที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* *GUS* และ *NPTII* ได้เฉพาะในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* เท่านั้น เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี GUS histochemical assay พบการติดสีฟ้าจางที่ชิ้นส่วนใบและก้านของบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* เพียงบางบริเวณของเนื้อเยื่อซึ่งอาจเกิดจากกิจกรรมการทำงานของยีน *GUS* ต่ำเนื่องจากเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *pCAM4'CGT* มีจำนวนยีน *GUS* น้อย ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ β -glucuronidase ออกมาอย่าง X-Gluc ได้น้อย (Gago *et al.* 2011)

เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *4'CGT* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,500 นิวคลีโอไทด์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Eco* RI โดยตำแหน่งของ *Bam* HI ตัดบริเวณของยีน *4'CGT* และอาจจะมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bam* HI หรือ *Eco* RI ภายในโครโมโซมของบัวหลวงทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,000 นิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *GUS* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 นิวคลีโอไทด์ โดยมีตำแหน่งของ *Bam* HI ตัดบริเวณของยีน *4'CGT* และอีกตำแหน่งอาจจะมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bam* HI หรือ *Eco* RI อยู่ภายในโครโมโซมของบัวหลวง ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 นิวคลีโอไทด์ แสดงให้เห็นว่าทั้งยีน *4'CGT* และ *GUS* ได้เข้าไปเชื่อมต่อกายในโครโมโซมของต้นบัวหลวง

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในดอกส้มมังกรีส้ม ชมพู แดง ขาว ม่วง และ เหลือง พบว่าในดอกสีเหลืองมีปริมาณการแสดงออกของยีน *4'CGT* มากที่สุดรองลงมาคือ ส้ม แดง ขาว ชมพู และพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* น้อยที่สุดในดอกสีม่วง

ผลการศึกษาหน้าที่ของยีน *4'CGT* แบบชั่วคราวด้วยเทคนิค RNAi โดยการถ่ายยีนในกลีบดอกส้ม มังกร พันธุ์ Pixie Bells ด้วยวิธีการ infiltration โดยมีอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ GV3101 เป็นพาหะ ภายหลังการถ่ายยีนเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีในกลีบดอกส้มมังกร์ทั้ง 7 ดอกที่ ทำการศึกษา แต่ในกลีบดอกส้มมังกร์ที่ได้รับการถ่ายไอออนเวคเตอร์ pJAWOHL8 (control) มีปริมาณการ แสดงออกของยีน *4'CGT* มากที่สุด และพบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ลดลงอย่างมากในกลีบดอกส้ม มังกรที่ได้รับการถ่ายไอออนเวคเตอร์ pJA8-*4'CGT* จำนวน 4 ดอก ในขณะที่อีก 3 ดอก ปริมาณการ แสดงออกของยีน *4'CGT* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลีบดอกที่ได้รับการถ่ายไอออน เวคเตอร์ pJAWOHL8 (control)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *4'CGT* ในบัวหลวงพันธุ์ปทุมธานี ที่ได้รับการถ่ายยีนโดย ใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะและใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถให้ต้นที่รอดชีวิตบน อาหารคัดเลือก จำนวน 3 และ 1 ต้น ตามลำดับ โดยต้นบัวหลวงที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาคมี การแสดงออกของยีน *4'CGT*, *GUS* และ *NPTII* เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ส่วนปริมาณการ แสดงออกของยีน *CHS* และ *F3H* ในต้นบัวหลวงที่ได้รับการถ่ายยีน *4'CGT* พบว่าปริมาณการแสดงออก ของยีน *CHS* และ *F3H* ไม่แตกต่างจากต้นบัวหลวงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อนำใบและก้านใบมา ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GUS* ด้วยวิธี GUS histochemical assay สามารถตรวจพบสีน้ำเงินบริเวณ ก้านใบและใบในบางบริเวณ ขณะที่การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *4'CGT* และ *GUS* ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่าสามารถตรวจพบยีน *4'CGT* และ *GUS* ที่แทรกอยู่ภายในโครโมโซมของบัว หลวงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- กนกวรรณ จารุกัจจา และพิมาน โภคาทรัพย์. 2552. “การยับยั้งอาร์เอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้.” วารสารไทยเกษตรศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. 4(2) : 262-271.
- คำพร รัตนสุด. 2553. วิศวกรรมเมแทบอลิซึมของสีดอกไม้. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 38(2) : 171-181.
- จริงแท้ ศิริพานิช. 2541. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชมพูนุช พรเจริญพ และณัฐกานต์ สุโกมล. 2546. “การศึกษาการโคลนยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินจาก cDNA ของอะราบิดอปซิส.” วิทยานิพนธ์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชัชวรงค์ ไชยปัญญา. 2555. “การโคลนยีน flavanone 3-hydroxylase (F3H) จากปทุมชาติ (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) และอุบลชาติ (*Nymphaea* spp.) และการสร้างดีเอ็นเอสายผสมเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค RNA interference.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ณรงค์ โฉมเฉลา. 2550. “บัวพื้นเมืองของไทย.” วารสารไม้ประดับ. 32(2) : 14-15.
- นงนุช จงจิระศิริ. 2522. “การผลิตเมล็ดพันธุ์ snapdragon.” วิทยานิพนธ์ สาขาวิชาพืชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิติศาสตร์ อารมณดี. 2549. พรรณไม้งามในสวนศิลป์. กรุงเทพฯ: มายแมงค็อก. 160 หน้า
- พัชรี บุญศิริ, เปรมใจ อารีจิตราอนุสรณ์, อุบล ชาอ่อน และปิติ ชูจิตต์. 2551. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 5. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น และเสริมลาภ วสุวัต. 2547. บัวประดับในประเทศไทย 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. เนชั่นบุ๊คส์ : กรุงเทพฯ.
- มณีนี ธีรารักษ์. 2550. “การผลิตไม้ดอกสีเหลืองโดยการเปลี่ยนวิธีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์.” วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 25 : 95-102.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- วาสนา มิตรานนท์. 2527. “การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวสกุลบัวหลวง (*Nelumbo Adans.*) ในประเทศไทย.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิลาสินี ลีทวีทรัพย์. 2554. “การถ่ายยีน antisense ของ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) เข้าสู่บัวหลวงพันธุ์บุณฑริก โดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- แหววไว รัตนสาขา. 2511. “การใช้ gibberellic acid กับช่อดอกกลีมนังกรในระยะเวลาการเจริญต่างๆกัน.” วิทยานิพนธ์ แผนกวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 34 หน้า.
- ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม. 2552. พันธุวิศวกรรม : วิธีการและการประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 284 หน้า.
- สุภาภรณ์ เอี่ยมแข่ง, ปัทมา สีน้าเงิน และอรพรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. “ผลของสารปฏิชีวนะ Timetin และ Augmentin ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Agrobacterium tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ.” ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. กรุงเทพฯ : คณะเกษตร.
- สุนนทิพย์ บุญนาค และ เนริสา คุณประทุม. 2540. “อิทธิพลของ Timentin, Cefotaxime และ Carbenicillin ต่ออัตราการเจริญของแคลัสต์ตัวพุ่ม และความสามารถในการกำจัด *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105.” วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 25(3) : 201-207.
- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 258 หน้า.
- เสริมลาภ วสุวัต. 2547. บัวไม้ดอกไม้ประดับ. กรุงเทพมหานคร : อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
- อัญญา บุญชด, พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2544. “ปัจจัยสำคัญและประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโรงงานพันธุ์วี เอฟ 134-1-1.” ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. กรุงเทพฯ : คณะเกษตร. 365-371.
- อ้อมบุญ ถ้วนรัตน์. 2536. การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- Anonymous. n.d. [Online]. Available : http://www.virtualflowers.com.au/annuals_snapdragon.asp
- Anonymous. n.d. [Online]. Available : http://www.thaiwater lily.com/show_page.php?topic_id=144&auto_id=4&TopicPk=
- Anonymous. n.d. [Online]. Available : <http://dna-rna.net/2011/08/25/rna-interference>

- Basile, A., S. Sorbo, J.A. López-Sáez and C.R. Cobianchi. 2003. "Effect of seven pure flavonoids from mosses on germination and growth fo *Tortula muralis* HEDW. (Bryophyta) and *Raphanus sativus* L. (Magnoliphyta)." **Phytochemistry**. 62 : 1145-1152.
- Boase, M. R., D. H. Lewis, K. M. Davies, G. B. Marshall, D. Patel, K. E. Schwinn and S. C. Deroles. 2010. "Isolation and antisense suppression of *flavonoid 3', 5'-hydroxylase* modifies flower pigments and colour in cyclamen." **BMC Plant Biology**. 10(107).
- Britsch, L., J. Dedio, H. Saedler and D. Forkman. 1993. "Molecular characterization of flavanone 3 β -hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues." **European Journal of Biochemistry**. 217 : 745-754.
- Buathong, R., K. Saetiew, S. Phansiri, N. Parinthawong and Sumay Arunyanart. 2013. "Tissue culture and transformation of the antisense *DFR* gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) through particle bombardment." **Scientia Horticulturae**. 161 : 216-222.
- Cavalcanti, R.N., D.T. Santos and M.A.A. Mrireles. 2011. "Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanin in model and food systems-An overview." **Food Research International**. 44 : 499-509.
- Dai S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R. N. Beachy and C. Fauquet. 2001. "Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment." **Molecular Breeding**. 7(1) : 25-33.
- Davies, K.M. 2004. **Plant Pigment and Their Manipulation**. Oxford : Blackwell publishing Ltd.
- Davies, K.M., G.B. Marshall, J.M. Bradley, K.E. Schwinn, S.J. Bloor, C.S. Wiefield and C.R. Martin. 2006. "Characterisation of aurone biosynthesis in *Antirrhinum majus*." **Physiologia Plantarum**. 128 : 593-603.
- Deroles, S.C., K.M. Davies., G.B. Spiller and S.J. Bloor. 2000. "Modification of chalcone biosynthesis in *Petunia hybrida*." **Acta Horticulturae**. 508 : 29-37.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl. 2001. "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." **Nature**. 411 : 494-498.

- Faize, M., L. Faize and L. Burgos. 2010. "Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation." **BioMedCentral Biotechnology**. 10(53).
- Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E. 2001. "Characterization and measurement of anthocyanin by UV-visible spectroscopy." **Current Protocol in Food Analytical Chemistry**. New York : John Wiley & Son.F1.2.1-F1.2.13. [online]. Available : <http://www.nshvtv.org/ebook/molbio/Current%20Protocols/CPFAC/faf0102.pdf>. 5/5/54.
- Gago, J., J. Grima-Pettenati and P.P. Gallego. 2011. "Vascular-specific expression of GUS and GFP reporter genes in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Albariño) conferred by the EgCCR promoter of *Eucalyptus gunnii*." **Plant Physiology and Biochemistry**. 49 (4) : 413-419.
- Gondo T., J. Matsumoto, S. Tsuruta, M. Yoshida, A. Kawakami, F. Terami, M. Ebina, T. Yamada and R. Akashi. 2009. "Particle inflow gun-mediated transformation of multiple-shoot clumps in rhodes grass (*Chloris gayana*)." **Journal Plant Physiology**. 166 (4) : 435-441.
- Hajian, B., K. Piri, S. Nazeri and H. Ofoghi. 2011. "Agrobacterium-mediated transfer of β -glucuronidase gene (*gusA*) to water mint (*Mentha aquatica* L.)." **Journal of Medicinal Plants Research**. 5(5) : 842-847.
- Hartley, J.L., G.F. Temple and M.A. Brasch. 2000. "DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination." **Genome Research**. 10 : 1788-1795.
- Heilersig, H.J.B., A. Loonen, M. Bergervoet, A.M.A. Wolters and R.G.F. Visser. 2006. "Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats." **Plant Molecular Biology**. 60(5) : 647-62.
- Helliwell, C. and Waterhouse, P. 2003. "Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants." **Academic Press**. 30(4) : 289-295.
- Hoffmann, T., G. Kalinowski and W. Schwab. 2006. "RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis." **The Plant Journal**. 48(5) : 818-826.
- Jordheim, M., O.M. Andersen, C. Nozzolillo and V.T. Amiguet. 2009. "Acylate anthocyanin in florescence of spider flower (*Cleome hassleriana*)." **Phytochemistry**. 70 : 740-745.

- Kamiishi, Y., M. Otani, H. Takagi, D.S. Han, S. Mori, F. Tatsuzawa, H. Okuhara, H. Kobayashi and M. Nakano. 2011. "Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene." **Molecular Breeding**. 30(2) : 671-680.
- Karimi, M., D. Inzé and A. Depicker. 2002. "GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." **Trends Plant Science**. 7(5) : 193-195.
- Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T.A. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K. Yonekura-Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G.Q. Tao, N.S. Nehra, C.Y. Lu, B.K. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J.G. Mason and Y. Tanaka. 2007. "Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin." **Plant and Cell Physiology**. 48(11) : 1589-1600.
- Lea, P.J. and R.C. Leegood. 1999. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. England : John Wiley & Son.
- Ling, H.Q., D. Kriseleit and M.W. Ganai. 1998. "Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)." **Plant Cell Reports**. 17 : 843-847.
- Macrae, I.J., K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. Brooks, W.Z. Cande, P.D. Adams and J.A. Doudna. 2006. "Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer." **Science**. 311 : 195-198.
- Matsumoto, K., G.B. Cabral, J.B. Teixeira and D.C. Monte. 2009. "*Agrobacterium*-mediated transient expression system in banana immature fruits." **African Journal of Biotechnology**. 8(17) : 4039-4042.
- Mccauley R.A. and A.C.C. Palomec. n.d. "**CTAB/Chloroform-isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol**." [Online]. available : http://faculty.forlewis.edu/mccauley_r/Ecol_mol/CTAB_DNA_Extraction.doc
- Miki B. and S. McHugh. 2004. "Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety." **Journal Biotechnology**. 107(3) : 193-232.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture." **Physiologia Plantarum**. 15 : 473-497.

- Nakamura, N., M. Fukuchi-Mizutani, K. Miyazaki, K. Suzuki and Y. Tanaka. 2006. "RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression." **Plant Biotechnology**. 23 : 13–17.
- Nakatsuka, T., Y. Abe, Y. Kakizaki, S. Yamamura and M. Nishihara. 2007. "Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes." **Plant Cell Reports**. 26(11) : 1951-1959.
- Nakatsuka, T., K.I. Mishiba, Y. Abe, A. Kubota, Y. Kakizaki, S. Yamamura and M. Nishihara. 2008. "Flower color modification of gentian plants by RNAi-mediated gene silencing." **Plant Biotechnology**. 25 : 61-68.
- Nishihara, M., T. Nakatsuka and S. Yamamura. 2005. "Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene." **Federation of European Biochemical Societies**. 579(27) :6074-6078.
- Okinaka, Y., Y. Shimada, R. N. Shimada, M. Ohbayashi, S. Kiyokawa and Y. Kikuchi. 2003. "Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 67(1) : 161-165.
- Ono, E., M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukai, K. Yonekura-Sakkibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2006. "Yellow flowers generated by expression of the aurones biosynthetic pathway." **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 103(29) : 11075-11080.
- Patel, J.M. 2008. "A review of potential health benefits of flavonoids." **Lethbridge Undergraduate Research Journal**. 3: 1718-8482.
- Patton, A.J. 2000. "Gateway Cloning Technology." [Online]. available : www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring2000/patton/gateway.htm.
- Pillman, K. 2009. "Transcription factors involved in cold response in plants." Thesis School of Agriculture, Food and Wine Discipline of Plant and Pest Science The University of Adelaide.
- Rhimi, A., M. Hernould and M. Boussaid. 2007. "*Agrobacterium*-mediated transformation of Tunisian *Cucumis melo* cv. maazoun." **African Journal of Biotechnology**. 6(18) : 2162-2165.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. New York : Cold spring harbor laboratory.
- Seitz, C., C. Eder, B. Deiml, S. Kellner, S. Martens and G. Forkmann. 2006. "Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase in the asteraceae family." **Plant Molecular Biology**. 61(3) : 365-381.
- Shang, Y., K.E. Schwinn, M.J. Bennett, D.A. Hunter, T.L. Waugh, N.N. Pathirana, D.A. Brummell, P.E. Jameson and K.M. Davies. 2007. "Methods for transient assay of gene function in floral tissues." **Plant Methods**. 3 : 1.
- Small, I. 2007. "RNAi for revealing and engineering plant gene functions." **Current Opinion in Biotechnology**. 18 : 148-153.
- Stiles, E.A., N.B. Cech, S.M. Dee and E.P. Lacey. 2006. "Temperature-sensitive anthocyanin production in flowers of *Plantago lanceolata*." **Physiologia Plantarum**. 54 : 733-749.
- Tanaka, Y., S. Tsuda and T. Kusumi. 1998. "Metabolic engineering to modify flower color." **Plant Cell Physiology**. 39 : 1119-1126.
- Tanaka, Y., N. Sasaki and A. Ohmiya. 2008. "Biosynthesis of plant pigment: Anthocyanin, betalains and carotenoids." **The Plant Journal**. 54: 733-749.
- Tsuda, S., Y. Fukui, N. Nakamura, Y. Katsumoto, K. Yonekura-Sakakibara, M. Fukuchi-Mizutani, K. Ohira, Y. Ueyama, H. Ohkawa, T.A. Holton, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2004. "Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering." **Plant Biotechnology**. 21 : 377-386.
- Ueyama Y., K. Suzuki, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, K. Miyazaki, H. Ohkawa, T. Kusumi and Y. Tanaka. 2002. "Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating the expression of these genes." **Plant Science**. 163 : 253-263.
- Van Der Krol A.R., L.A. Mur, M. Beld, J.N. Mol and A.R. Stuitje. 1990. "Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression." **Plant Cell**. 2(4) : 291-299.
- Xu, R and Q.Q. Li. 2008. "Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway[®] TOPO vector system." **Plant Method**. 4(4).

Zottini, M., E. Barizza, A. Costa, E. Formentin, C. Ruberti, F. Carimi and F.L. Schiavo. 2008.

“Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells.” **Plant Cell**. 27(5) : 845–853.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียมสารละลาย

1.1) 50X TAE buffer (Tris-acetate) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tris-borate	242	กรัม
Acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	700	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที Acetic acid เป็นกรดเข้มข้น ควรใส่ถุงมือกันกรด และเตรียมภายในตู้ดูดควัน

1.2) 10X loading buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

0.25 %	Bromophenol blue
30 %	Glycerol
60 mM	EDTA

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3) Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Ethidium bromide ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรให้เข้ากัน เก็บสารละลายในขวดแก้วทึบแสง Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือในการเตรียม

1.4) 1 M isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG)

IPTG	2	กรัม
น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร

ละลาย IPTG ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (X-gal)

X-gal	20	มิลลิกรัม
Dimethylformamide	400	ไมโครลิตร

ละลาย X-gal ใน Dimethylformamide ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เก็บในหลอดที่ห่อด้วยกระดาษอะลูมิเนียม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.6) X-galuc buffer

0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.0)	10	มิลลิลิตร
0.1 M Potassium ferricyanide	0.1	มิลลิลิตร
20 mM Potassium ferrocyanide	0.5	มิลลิลิตร
0.2 M Na_2EDTA	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	8.4	มิลลิลิตร

กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บไว้ในที่มืด 4 องศาเซลเซียส

1.7) X-galuc substrate

5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Glucuronidase	5	มิลลิกรัม
Dimethylformamide	50	ไมโครลิตร
X-galuc buffer	8	มิลลิลิตร
Triton-X 100	2	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาทดสอบกับเนื้อเยื่อ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

1.8) Infiltration buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

50 mM	MES (pH 5.6)
2 mM	Na_3PO_4
0.5%	Glucose
100 μM	Acetosyringone

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นมาเจือ จากนั้นนำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บในหลอดที่ห่อด้วยกระดาษอะลูมิเนียม

1.9) 50 mM MES monohydrate (pH 5.6) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

MES monohydrate	1.952	กรัม
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ละลาย MES monohydrate ในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 5.6 ด้วยสารละลาย 5 M KOH ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.10) 5 M KOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

KOH	28.05	กรัม
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.11) 20 mM Na₃PO₄ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Na ₃ PO ₄	0.76	กรัม
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ละลาย Na₃PO₄ ในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.12) 100 mM Acetosyringone ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

Acetosyringone	0.0196	กรัม
Dimethylsulfoxide	1	มิลลิลิตร

ละลาย Acetosyringone ใน Dimethylsulfoxide (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

1.13) 20 % Glucose ปริมาตร 60 มิลลิลิตร

Glucose	2.16	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	50	มิลลิลิตร

ละลาย Glucose ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 60 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อนำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.14) 1 M Sorbitol

Sorbitol	18.2	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ละลาย Sorbitol ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.15) 20x SSC

Trisodium citrate	88.23	กรัม
NaCl	175.32	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7.8 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.16) Depurination buffer

Hydrochloric acid	5.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	494.5	มิลลิลิตร

1.17) Denaturation buffer

NaCl	43.83	กรัม
NaOH	10	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.18) Neutralization buffer

NaCl	43.83	กรัม
Tris-base	30.25	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.19) Low stringency

20x SSC	10	มิลลิลิตร
20x SDS	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	89.5	มิลลิลิตร

1.20) Medium stringency

20x SSC	5	มิลลิลิตร
20x SDS	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	94.5	มิลลิลิตร

1.21) Washing buffer

1M Maleic acid	50	มิลลิลิตร
5M NaCl	15	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และเติม Tween 20 1.5 มิลลิลิตร

1.22) Maleic acid buffer

1M Maleic acid	50	มิลลิลิตร
5M NaCl	15	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

1.23) Detection buffer

1M Tris-base	50	มิลลิลิตร
5M NaCl	15	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 9.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

1.24) 10x Blocking reagent

Blocking reagent	1	กรัม
Maleic acid buffer	10	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.25) Blocking solution

10x Blocking reagent	10	มิลลิลิตร
Maleic acid buffer	90	มิลลิลิตร

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1) Luria-Bertani agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast-extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2) Luria-Bertani broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	10	กรัม
Yeast-extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3) Yeast Extract Phosphate agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Bacto-Trypton	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.4) Yeast Extract Phosphate broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Bacto-Trypton	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.5) Yeast Extract Mannitol agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Mannitol	10	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.5	กรัม
$MgPO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.6) Yeast Extract Mannitol broth ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Mannitol	10	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.5	กรัม
$MgPO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ค่า 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สารเคมีสำหรับการเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ (Sambrook and Russell. 2001)

3.1) 100 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

$CaCl_2$	1.12	กรัม
น้ำกลั่น	70	มิลลิลิตร

ละลาย $CaCl_2$ ในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

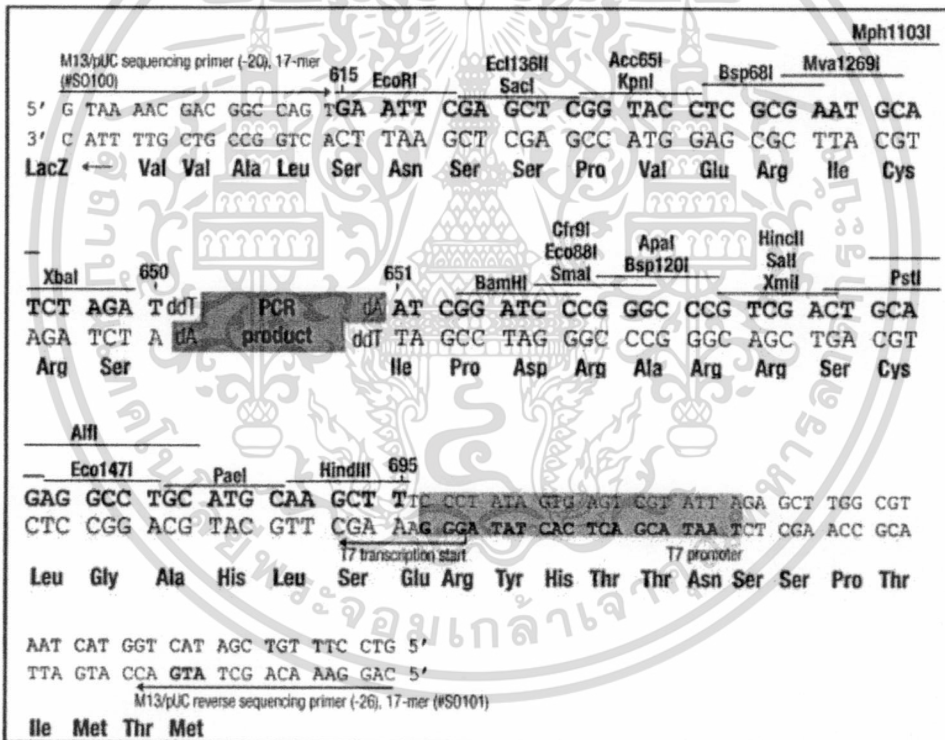
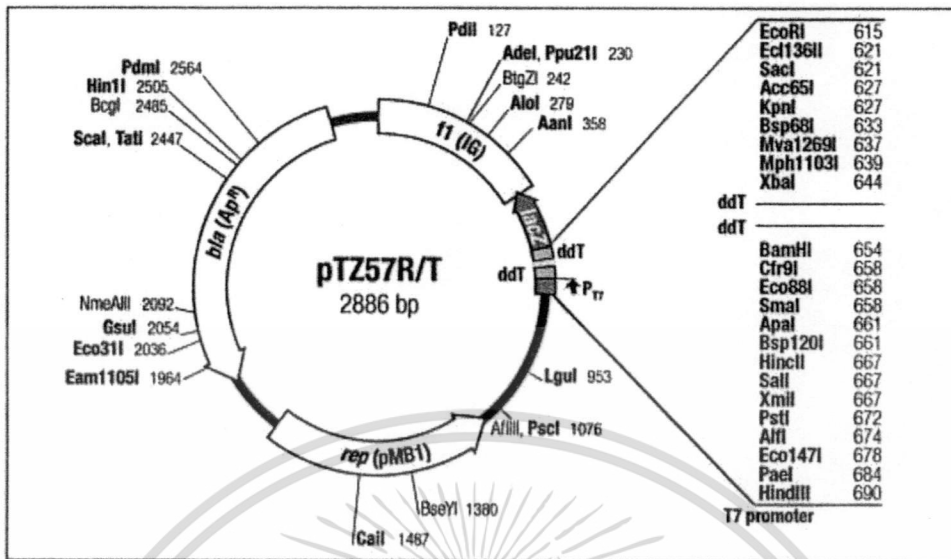
3.2) 20% Glycerol : 50 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Glycerol	20	มิลลิลิตร
100 mM $CaCl_2$	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

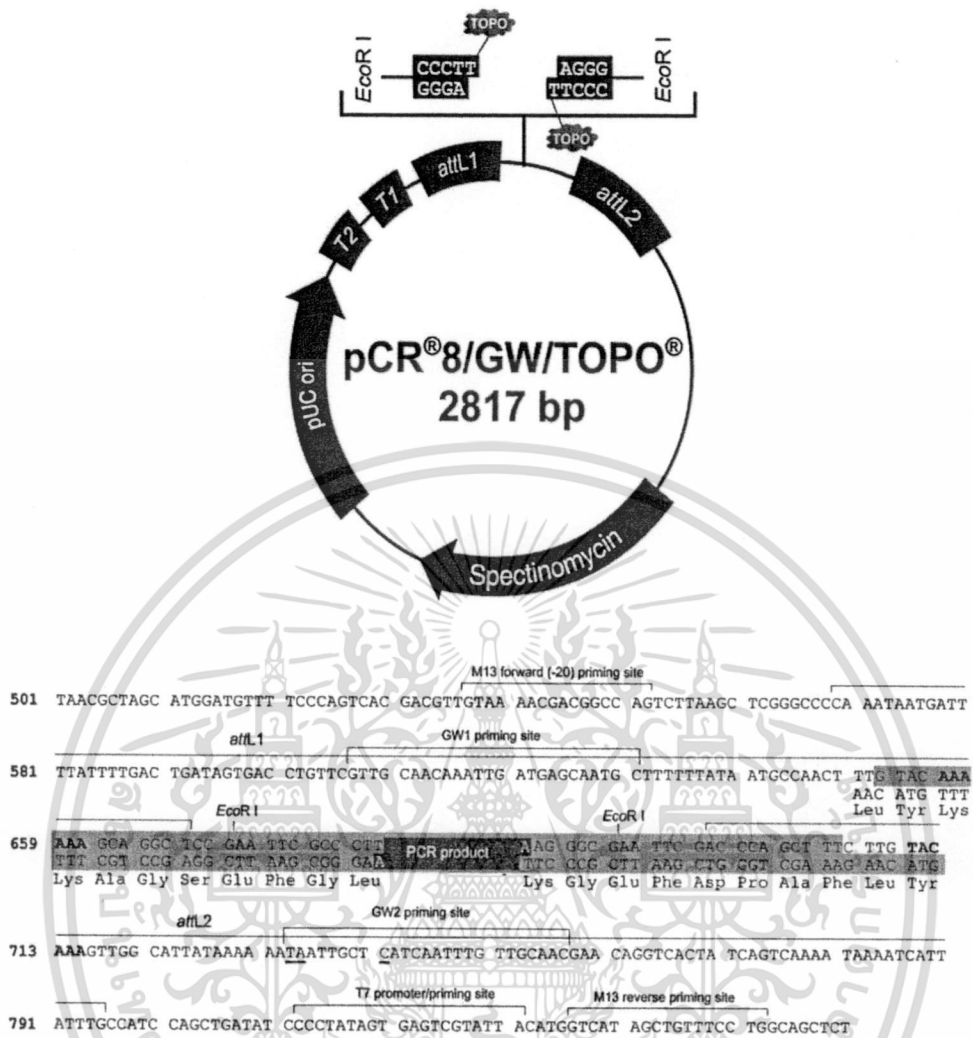


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

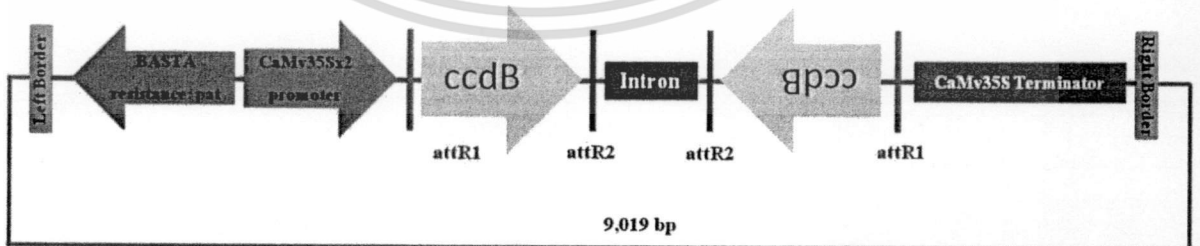


ภาพผนวกที่ 1 แผนที่ของพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



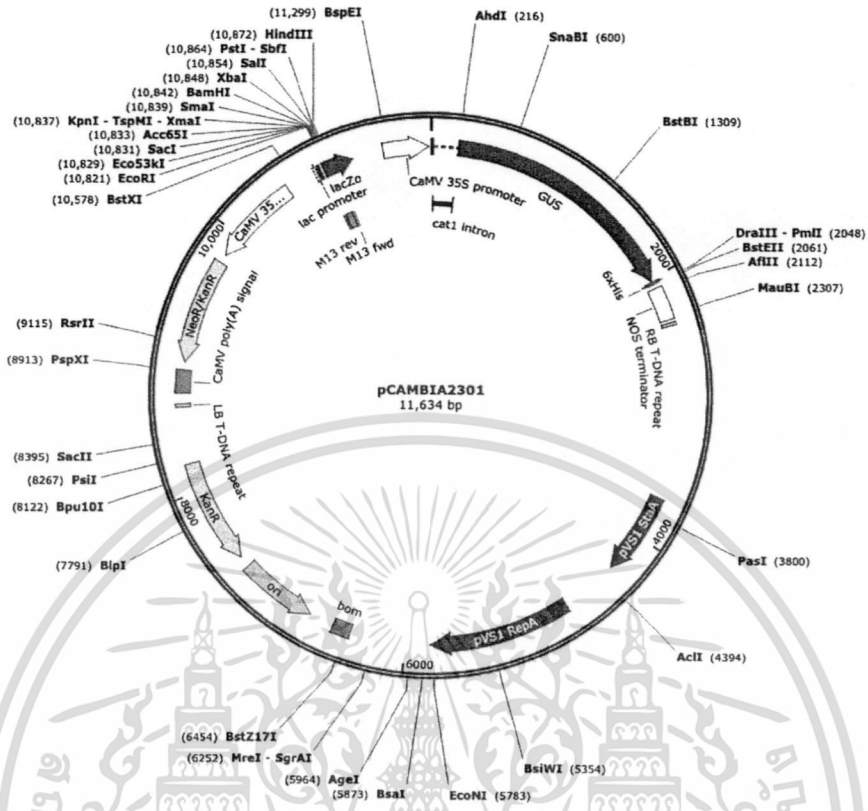
ภาพผนวกที่ 2 แผนที่ของพลาสมิด pCR8 (Invitrogen, USA)



ภาพผนวกที่ 3 แผนที่ของพลาสมิด pJAWOHL8 (ดัดแปลงจาก Pillman, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

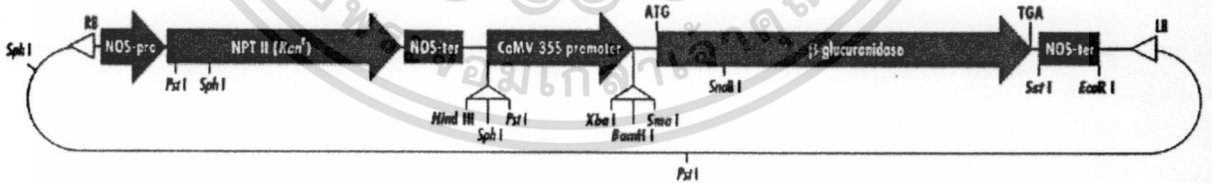
Created with SnapGene®



ภาพผนวกที่ 4 แผนที่ของพลาสมิด pCAMBIA2301

ที่มา

www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors/pCAMBIA2301



pBI121

Sma I
TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamHI

from Clontech catalogue 1996 / 97

ภาพผนวกที่ 5 แผนที่ของพลาสมิด pBI121 (Clontech, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน

ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
18-SF	CCA TGA TAT TCG GCA AGC AGG CAT
18-SR	ATC CAT CAT GGC TGA TGC AAT GCG
Oligo-dt	TTT TTT TTT TTT TTT TTT
F-BamHI-4'CGT	CGG ATC CAT GGG AGA AGA ATA CAA GAA AAC
F-EcoRI-4'CGT	TGG GTG GAA TTC TGT TCT TG
R-4'CGT -SacI	TCG AGC TCT TAA CGA GTG ACC GAG TTG ATG AA
CHSF	GAG AAG CTC CGG TTC GAC AT
CHSR	TAG TTC ACC ACC ATC TTC TGG
F3H SenseF	GAG AAG CTC CGG TTC GAC AT
F3H stop	TCA GGC CAG AAT TTC ATT GA
F-NPTII	GGC TCG AAG ACG ATC AGA TAC CG
R-NPTII	GTA CAA AGG GCA GGG ACG TAG TCA A
F-gusA	ATT GAT GAA ACT GCT GCT GTC GGC
R-gusA	ACG CGG TGA TAC ATA TCC AGC CAT
F-CaMV	AGG GAT GAC GCA CAA TCC CAC T
R-NOS	TCG CAA GAC CGG CAA CAG GA
F-IntronpJA8	GGG TCA ACG GTT TCA AAG AGA G
R-IntronpJA8	CTC TCT TTG AAA CCG TTG ACC C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ง
ชนิดของพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อพลาสมิด	ที่มาของพลาสมิด	ดีเอ็นเอที่แทรก		ยีนคัดลอก		เซลล์เจ้าบ้าน	สถานที่เก็บ
		ยีน	ขนาด (คู่เบส)	แบคทีเรีย	พืช		
pTZ-4'CGT	pTZ57R/T	4'CGT	1,374	แอมพิซิลิน	-	<i>E. coli</i> DH5 α	-80°C
pCR8-4'CGT	pCR8	4'CGT	313	สเปคโตรไมซิน	-	<i>E. coli</i> DH5 α	-80°C
pJA84'CGT	pJAWOHL8	4'CGT	313	แอมพิซิลิน	basta	<i>E. coli</i> DH5 α	-80°C
pJAWOHL8	pJAWOHL8	-	-	แอมพิซิลิน	basta	<i>E. coli</i> DH5 α	-80°C
pCAM4'CGT	pCAMBIA2301	4'CGT	1,374	กานามัยซิน	กานามัยซิน	<i>E. coli</i> DH5 α	-80°C

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายวรวุฒิ เอี่ยมมงคลการ
วัน เดือน ปีเกิด	2 กรกฎาคม พ.ศ. 2529
ที่อยู่ปัจจุบัน	33 ซอยรามคำแหง 54 แขวงหัวหมาก เขตบางกะปิ กทม 10240
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2551 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อมพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และทุนสนับสนุนทำเล่มวิทยานิพนธ์จากบัณฑิตศึกษาวิทยาลัย
ผลงานทางวิชาการ	วรวุฒิ เอี่ยมมงคลการ, กัญจนา แซ่เตียว, สุเมธ อรัญนารถและนงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2555. “การสร้าง DNA สายผสมของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase จาก snapdragon (<i>Antirrhinum majus</i>) เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนด้วยเทคนิค RNA interference”. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 43 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน 2555.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้