

การโคลนยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน

Cloning of anthocyanin-biosynthesis genes from
butterfly pea flowers



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

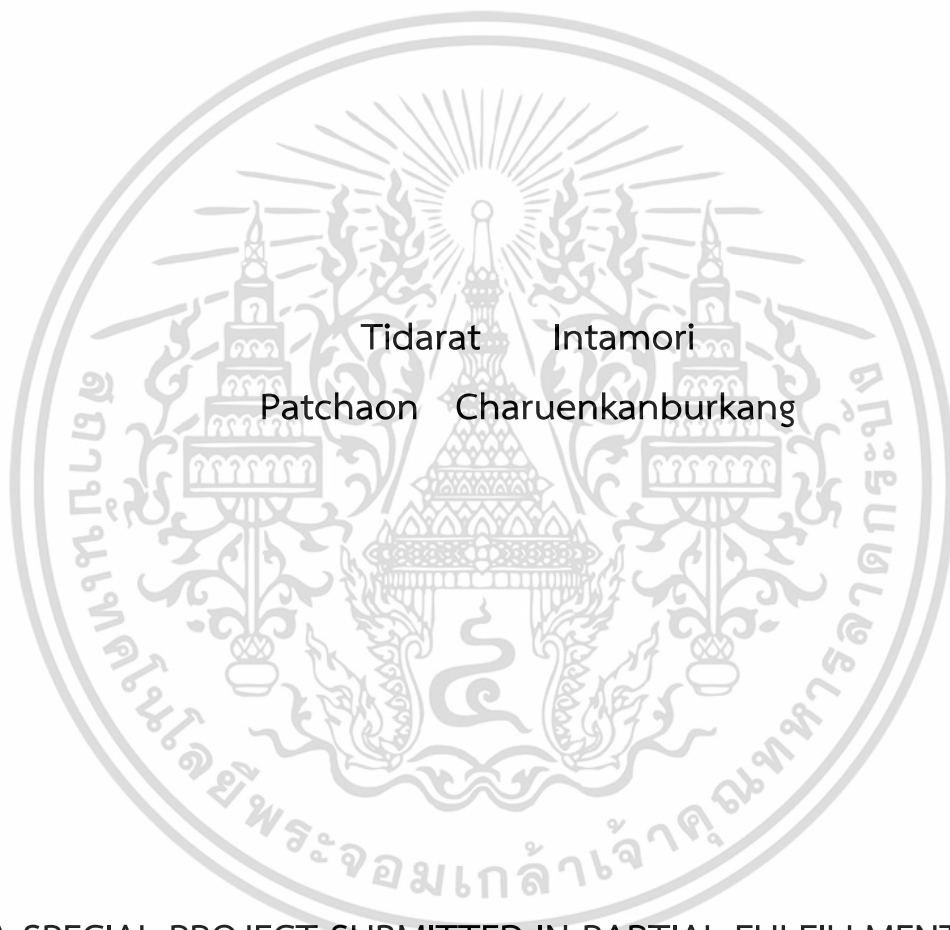
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2565 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cloning of anthocyanin-biosynthesis genes from butterfly pea flowers



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY) DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การโคลนยีนในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน
Cloning of anthocyanin-biosynthesis genes from
butterfly pea flowers

ชื่อนักศึกษา นางสาวธิดารัตน์ อินทโมรี รหัสนักศึกษา 62050501
นางสาวพัชอร เจริญก้านบัวกาง รหัสนักศึกษา 62050520

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2565

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ประธานกรรมการ	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
ผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	กานต์ วงศาริยะ
รศ.ดร. โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	โชคชัย

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การโคลนยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธิดารัตน์ อินทโมรี รหัสนักศึกษา 62050501 นางสาวพัชอร เจริญก้านบัวทาง รหัสนักศึกษา 62050520
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

บทคัดย่อ

Clitoria ternatea L. หรือ “อัญชัน” (Butterfly pea) เป็นพืชที่ปลูกได้ทั่วไปในเขตร้อน นิยมปลูกเป็นไม้ประดับตามรั้ว ซึ่งดอกอัญชันมีสารที่สำคัญ คือ แอนโทไซยานิน โครงการพิเศษนี้มีจุดประสงค์เพื่อให้ทดสอบหาระยะการพัฒนาของดอกอัญชันที่เหมาะสมต่อการนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin และทดสอบหาลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin (ที่ยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank) ทั้งหมด 7 ยีน ได้แก่ยีนที่มีลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ทั้งหมด 6 ยีน คือ *F3'5'H*, *3GT*, *DFR*, *CHI*, *CHS* และ *ANS* และ (ยีนที่ไม่มีลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank) ได้แก่ *F3H* ผลการทดลองพบว่า ในระยะ S1, S2 และ S3 ยีนที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้ง 3 ระยะ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ *3GT*, *DFR* และ *CHI* ซึ่งระยะที่มีการแสดงออกของยีนน้อยที่สุดคือระยะ S2 ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส มีไพรเมอร์ที่ขึ้นแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้ง 3 ระยะ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ CtCHI และ CtCHS ระยะที่มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดคือระยะ S2 สุดท้ายที่อุณหภูมิ 52 และ 54 องศาเซลเซียส ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ *F3H-F2/R2* แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ Ct*3'5'H* ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลองรวมถึงทุกระยะการพัฒนาดอกอัญชันด้วย

คำสำคัญ : *Clitoria ternatea*, anthocyanin, การแสดงออกของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Cloning of anthocyanin-biosynthesis genes from butterfly pea flowers		
Students	Miss Tidarat Intamori	Student ID	62050501
	Miss Patchaon Charuenkanburkang	Student ID	62050520
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
School	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2565		
Advisor	Asst.Prof.Dr. Chokchai Kittiwongwattana		

Abstract

Clitoria ternatea L. also known as (Butterfly pea), is a plant commonly grown in the tropics, it is commonly planted as an ornamental plant along the fence. In which the butterfly pea flower contains an important substance, anthocyanin, the project This special purpose is to test the developmental stage of butterfly pea flowers suitable for study. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis and sequencing of genes. Associated with the synthesis of anthocyanin for which data are not currently available in the Genbank database, all 7 primers were used. Genes There are 6 genes in the Genbank database: *F3' 5'H*, *3GT*, *DFR*, *CHI*, *CHS* and *ANS*. The primers not in the Genbank database were F3H. The results showed that at a temperature of 55°C in stages S1, S2 and S3 primers showing identical DNA bands in all 3 stages obtained from The DNA amplification was *3GT*, *DFR* and *CHI*, with the least gene expression being the stage. R2 at 54 °C, all 3 phases of the same primers were added. The amount of DNA was *CtCHI* and *CtCHS*. The stage with the highest gene expression was the final S2 stage. Temperatures of 52 and 54 °C, primers showing DNA bands obtained from DNA amplification. was F3H-F2/R2, indicating that the primer *CtF3' 5'H* did not show DNA bands at all experimental temperatures. Including all stages of development of butterfly pea flowers.

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
Keywords: *Clitoria ternatea*, anthocyanin, gene expression
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาคำปรึกษาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่ได้ให้ข้อคิดเกี่ยวกับการทำงานวิจัย และเสนอแนวทางวิธีการทำและวิธีการแก้ปัญหาต่างๆในระหว่างการทำโครงการพิเศษนี้ ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล และผศ.ดร.กานต์ วงศาริยะ คณะกรรมการในการสอบโครงการพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาเพื่อให้ข้อเสนอแนะที่มีประโยชน์ในการทำโครงการพิเศษเล่มนี้ ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวที่คอยสนับสนุน คอยช่วยเหลือในทุกด้าน และยังให้ความรักและกำลังใจเสมอมา

ธิดารัตน์ อินทโมรี
พัชอร เจริญก้านบัวงาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
คำย่อ/สัญลักษณ์	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	1
1.3 ขอบเขต	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของดอกอัญชัน (<i>Clitoria ternatea</i> L.)	3
2.2 สารแอนโทไซยานิน.....	4
2.2.1 การสังเคราะห์ ternatins.....	6
2.3 Reverse transcription.....	8
2.4 การแสดงออกของยีน (Gene expression)	8
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	12
3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา.....	12
3.2 โพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	12
3.2.1 การออกแบบโพรเมอร์ที่มีในฐานข้อมูล NCBI.....	12
3.3 การสกัด RNA จากตัวอย่างดอกอัญชันสีม่วง.....	13
3.4 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ.....	14
3.5 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา Reverse transcription.....	14
3.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน <i>F3H</i>	16
3.8 การเพิ่มปริมาณ DNA ของยีน <i>F3H</i> ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	16
3.9 การทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	19
4.1 ลักษณะตัวอย่างดอกอัญชันสีม่วง.....	19
4.2 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ.....	19
4.3 ผลการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ด้วยเทคนิค PCR.....	21
4.3.1 ที่อุณหภูมิตั้งที่ 55 องศาเซลเซียส.....	21
4.3.2 ที่อุณหภูมิตั้งที่ 54 องศาเซลเซียส.....	22
4.4 ผลการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>F3H</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	23
4.3.3 ที่อุณหภูมิตั้งที่ 52 และ 54 องศาเซลเซียส.....	23
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	27
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	26
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	26
เอกสารอ้างอิง.....	28
ภาคผนวก.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ไพรเมอร์ที่มีในฐานข้อมูล Genbank	12
1.2 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Reverse transcription.....	14
1.3 องค์ประกอบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR.....	15
1.4 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR.....	16
1.5 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ของ Gradient temperature PCR.....	17
1.6 ค่าความเข้มข้นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 230 นาโนเมตร ของอาร์เอ็นเอสกัดที่ได้จากดอกอัญชันที่ระยะการพัฒนาน้ำทั้ง 3 ระยะ.....	20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 ดอกอัญชัน.....	3
1.2 กระบวนการ Reverse transcription.....	5
ตัวอย่างดอกอัญชันสีม่วงตัวอย่างดอกอัญชันสีม่วงระยะ S1, S2 และ S3 ตามลำดับ	
S1=ระยะตาดอกขนาดเล็ก, S2=ระยะเริ่มออกดอก และ S3=ระยะดอกบานออก	
แถบสีขามีขนาดเท่ากับ 2 เซนติเมตร	19
1.3 RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะ	
1: ระยะ S1, 2: ระยะ S2 และ 3: ระยะ S3	20
1.4 ลายพิมพ์ cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ของระยะ S1, S2 และ S3	
ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส.....	21
1.5 ลายพิมพ์ cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ของระยะ S1, S2 และ S3	
ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส.....	22
1.6 ลายพิมพ์ cDNA ของระยะ S1, S2 และ S3	
1-4=อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส และ 6-9=อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
PCR	Polymerase Chain Reaction
cDNA	Complementary DNA
TBE	Tris-Borate EDTA
MgCl ₂	Magnesium Chloride
T _m	Melting Temperature
dNTP	Deoxynucleotides
ANS	Leucoanthocyanidin dioxygenase
3GT	UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase
CHS	Chalcone Synthase
CHI	Chalcone Isomerase
F3H	flavanone 3-hydroxylase
DFR	dihydroflavanol 4-reductase
F3'5'H	Flavonoid 3',5'-hydroxylase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อัญชัน (Butterfly pea) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ (*Ciltroria ternatea* L.) ปลูกได้ทั่วไปในเขตร้อน นิยมปลูกเป็นไม้ประดับตามรั้ว ซึ่งดอกอัญชันมีสารที่สำคัญ คือ แอนโทไซยานิน

ปัจจุบันมีดอกอัญชันหลายสีที่เราพบเห็นได้ เช่น สีม่วง สีขาว สีฟ้า และสีชมพู เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการศึกษาสีของดอกอัญชันเพียงสีเดียวคือสีม่วง เราจึงศึกษาการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินซึ่งเป็นเม็ดสีที่ทำให้เกิดความแตกต่างของสีดอกอัญชัน แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) เป็นสารรงควัตถุ (Pigment) ที่ให้เกิดสีต่างๆ พิษสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยมีวิถีการสังเคราะห์ที่ประกอบด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีหลายขั้นตอน ในแต่ละขั้นตอนมีเอนไซม์ที่แตกต่างกันเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารจนเกิดเป็น anthocyanin ซึ่งเป็นชนิดของแอนโทไซยานินที่พบในดอกอัญชัน ดังนั้นแล้วเซลล์ของดอกอัญชันจึงต้องมีการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนเหล่านี้อาจเกิดขึ้นในระยะการพัฒนารูปของดอกอัญชันที่แตกต่างกัน ดังนั้นจุดประสงค์ของโครงการพิเศษนี้จึงเป็นการศึกษาหาระยะการพัฒนาของดอกอัญชันที่พบการแสดงออกของยีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์สาร anthocyanin นอกจากนี้การสืบค้นข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบว่ายังขาดข้อมูลลำดับเบสของยีนบางยีนในวิถีการสังเคราะห์ anthocyanin ดังนั้นแล้วจุดประสงค์อีกข้อหนึ่งของโครงการพิเศษนี้จึงเป็นการทดลองโคลนและหาลำดับเบสของยีนสังเคราะห์ anthocyanin อื่นๆ ที่ยังไม่มีในฐานข้อมูล GenBank ข้อมูลที่ได้มานี้จะช่วยให้สามารถนำไปศึกษาทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเกิดสีของดอกอัญชันสายพันธุ์ที่มีดอกสีแตกต่างกันต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อทดสอบหาระยะการพัฒนาของดอกอัญชันที่เหมาะสมต่อการนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin

1.2.2 เพื่อทดสอบหาลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin ที่ยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนสังเคราะห์ anthocyanin จำนวน 6 ยีน ได้แก่ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ Flavonoid 3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*), UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (*3GT*), dihydroflavanol 4-reductase (*DFR*), Chalcone
เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isomerase (*CHI*), Chalcone Synthase (*CHS*) และ Leucoanthocyanidin dioxygenase (*ANS*) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank

1.3.2 ทดสอบการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนสังเคราะห์ anthocyanin จาก cDNA ของดอกอัญชันที่อยู่ในระยะการพัฒนาที่แตกต่างกัน 3 ระยะ

1.3.3 ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอของยีนสังเคราะห์ anthocyanin ที่ยังไม่มีในฐานข้อมูล GenBank อย่างน้อย 1 ยีน และหาลำดับเบสของยีนดังกล่าว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบระยะการพัฒนาดอกอัญชันที่เหมาะสมต่อการนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ anthocyanin

1.4.2 ทราบลำดับเบสของยีนสังเคราะห์ anthocyanin เพิ่มเติมจากยีนอื่นๆ ที่มีข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของดอกอัญชัน

Clitoria ternatea L. หรือ ดอกอัญชัน (รูปที่ 2.1) เป็นแหล่งของ polyacylated anthocyanins จำนวนมากและมีความเสถียรสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ non-acylated anthocyanins สามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารแต่งสีผสมอาหารได้ (Buchweitz et al., 2012; Marpaung et al., 2019) เช่นเดียวกับแอนโทไซยานินทุกชนิด โดยสีของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันจะเปลี่ยนไปตามค่า pH ที่ pH ต่ำกว่า 3.2 มีสีแดง ตั้งแต่ pH 3.2 ถึง 5.2 สีจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงิน จาก pH 5.2 จนถึง pH 8.2 มีสีฟ้าอ่อน และจาก pH 8.2 ถึง 10.2 สีจะเปลี่ยนจากสีฟ้าอ่อนเป็นสีเขียวเข้ม (Escher et al., 2020a) โดยการเปลี่ยนแปลงสีสามารถอธิบายได้จากการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลของแอนโทไซยานินพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นในสภาวะที่เป็นกลาง ทั้ง H^+ และ OH^- โดย flavylium ion ทำให้เกิดสีแดง, quinoidal base ที่เป็นกลางทำให้เกิดสีน้ำเงิน และสีเขียวเกิดจาก ionic chalcone (Liu et al., 2014) ใน non-acylated anthocyanins นั้น เมื่อ pH เพิ่มขึ้น flavylium ion จะเปลี่ยนแปลงเป็น carbinol pseudo base ที่ไม่มีสี แต่ในแอนโทไซยานินของดอกอัญชันนั้นมี acyl groups เพื่อป้องกันการ hydrolysis ของ flavylium ion ไปเป็นรูปแบบ carbinol pseudo base ที่มีความเสถียรต่ำและเกิดเป็นสีน้ำเงินของ quinoidal แทน ซึ่งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ต่ำกว่าในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนหรือในสภาวะที่เป็นกลาง (Bridle and Timberlake, 1997) เพราะฉะนั้นแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันสีน้ำเงินสามารถนำมาใช้เป็นสารให้สีน้ำเงินในระบบอาหารที่เป็นกรดและกลาง



รูปที่ 2.1 ดอกอัญชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ประโยชน์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ที่มา: <https://aroi-mark.com/archives/1675>)

2.2 สารแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่พบในพืชทั้งในดอกและในผล ให้สีแดง น้ำเงิน ม่วง ละลายน้ำได้ดี ปัจจุบันนี้แอนโทไซยานินจัดเป็นรงควัตถุที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นส่วนมาก เนื่องจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ปัจจุบันมีการค้นพบแอนโทไซยานินมากกว่า 300 ชนิดจากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ได้พบกว่า 7,000 ชนิด (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2553) ดังนั้นจึงพบได้ในพืชหลากหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็น ข้าวเหนียวดำ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ลูกหว้า ข้าวโพดสีม่วง กะหล่ำปลีม่วง กระเจี๊ยบ ดอกชบาแดง เป็นต้น ซึ่งลักษณะสีที่ปรากฏของแอนโทไซยานินในพืชก็แตกต่างกัน การสกัดเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในกระบวนการนำกลับมาของสารสำคัญจากพืช (Jeyaraj et al., 2020) โดยจุดประสงค์ในการเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสมคือเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดกับสารประกอบที่มีความเข้มข้นสูง เนื่องจากแอนโทไซยานินมีความไวต่อความร้อน, แสง, กรด และด่าง การเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสมมีผลต่อปริมาณของแอนโทไซยานินสูงสุดโดยที่ไม่มีการสลายตัว (Chandrasekhar et al., 2012; Jeyaraj et al., 2020) เมื่อพิจารณาถึงวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย, ประเภทของตัวทำละลาย, สารตั้งต้น ประกอบด้วย อัตราส่วนตัวทำละลาย, อุณหภูมิในการสกัด, เวลาในการสกัด และเวลาในการแช่มีผลต่อผลผลิตที่ได้จากการสกัดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TAC) ของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน (Rocha et al., 2020) การเลือกตัวทำละลายควรพิจารณาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดแอนโทไซยานิน เพราะฉะนั้นเมื่อสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันเพื่อใช้กับอาหาร ควรหลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นอันตราย (Khoo et al., 2017; Chemat et al., 2019) มีงานวิจัยหลายงานวิจัยที่ใช้การสกัดด้วยแอลกอฮอล์ เช่น, 37% เอทานอล (Jaafar et al., 2020), 50% เอทานอล (Pham et al., 2019), 50% เมทานอล (Shen et al., 2019)] เพื่อสกัดสารแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน อย่างไรก็ตาม FDA (2018) ได้จัดให้เมทานอลเป็นตัวทำละลายประเภทที่ 2 ซึ่งมีความเป็นพิษโดยธรรมชาติ และเอทานอลเป็นตัวทำละลายประเภทที่ 3 ซึ่งควรกำจัดโดยการผลิตตามหลักปฏิบัติ (GMP) และข้อกำหนดด้านคุณภาพอื่นๆ น้ำกลั่นคือตัวทำละลายที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดแอนโทไซยานินสำหรับการใช้ในด้านอาหารเพราะน้ำอาจถูกพิจารณาว่าเป็นตัวทำละลายไม่มีพิษ, ไม่ติดไฟ และเป็น green solvent ราคาไม่แพง (Chemat et al., 2019) ดังนั้นการวิจัยนี้สนใจเกี่ยวกับการสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันด้วยน้ำ

Saptarini and Suryasaputra (2018) พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดแอนโทไซยานินจาก ดอกอัญชันที่สกัดโดยใช้น้ำที่ pH 1 นั้นสูงกว่าที่ใช้น้ำที่ pH 2 ปรากฏว่า pH ของน้ำที่ใช้ในการสกัดนั้นมีผลต่อ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (TAC) ของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน Kang et al. (2021) ได้เสนอแนะว่าประสิทธิภาพการสกัดสูงขึ้นต่อเมื่อใช้ตัวทำละลายที่เป็นกรดมากขึ้นคือแอนโทไซยานินมีความเสถียรสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ในการศึกษาบางงานวิจัยใช้ขั้นตอนการแช่ก่อนการสกัดแอนโทไซยานิน อย่างไรก็ตาม Shen et al. (2019) ได้อธิบายไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไว้ว่าไม่จำเป็นต้องแช่เมื่อสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันโดยใช้น้ำ โดยการแช่จะลดค่า TAC ของสารสกัดแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ จาก 58.2 ถึง 39.9 ไมโครกรัม เมื่อนำกลีบมาแช่ในน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญใน TAC ของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันเมื่อแช่นาน 6 และ 12 ชั่วโมง สาเหตุของการลดลงของ TAC เนื่องจากการแช่อาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ hydrolysis ของแอนโทไซยานินเมื่อมีโมเลกุลของน้ำมากขึ้น (Matsufuji et al., 2007; Marpaung et al., 2017) เพราะฉะนั้นการสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันด้วยน้ำอาจสามารถทำได้โดยไม่ต้องมีขั้นตอนการแช่ทำให้เป็นประโยชน์ต่อปัจจัยด้านเวลาในระหว่างกระบวนการสกัด

เมื่อพิจารณาถึงสารตั้งต้น ได้แก่ อัตราส่วนตัวทำละลาย 1:20 (กรัมต่อมิลลิลิตร) ถูกรายงานโดย Chusak et al. (2018) และ Ahmad et al. (2020) ว่าเป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุดสำหรับการสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน ซึ่งปริมาตรของน้ำที่ใช้สำหรับการสกัดเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากตัวทำละลายที่มีน้อยจะไม่สามารถสกัดแอนโทไซยานินจากกลีบดอกอัญชันได้ในปริมาณที่เพียงพอ และในส่วนของน้ำที่เกินมาจะใช้พลังงานมากขึ้นในการระเหยออกไป โดยอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส และเวลาที่ใช้ในการสกัดประมาณ 20-60 นาที ถือว่าเป็นอุณหภูมิและเวลาในการสกัดที่เหมาะสมที่สุดของการสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน เพราะว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นและระยะเวลาในการสกัดที่นานขึ้นอาจส่งผลให้แอนโทไซยานินเสียหายได้ (Loypimai et al., 2016; Aprodu et al., 2020) อุณหภูมิสูงและระยะเวลาในการสกัดนานมีผลเสียทำให้สิ้นเปลืองพลังงานที่ใช้ไป ปัจจัยการสกัดส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันอีกด้วย โดย Shen et al. (2019) ได้แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้สกัดและระยะเวลาการแช่เมื่อสกัด อย่างไรก็ตาม 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่ใช้น้ำกลั่นในการสกัดโดยไม่ต้องแช่ (10.9 mM Trolox equivalents (TE)/g dry basis) และหลังจากแช่เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (11.7mM TE/g dry basis) การแช่ในน้ำนานถึง 24 ชั่วโมง ช่วยลดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่สกัดด้วยน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ (9.45mM TE/g dry basis) (Shen et al., 2019) นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่สกัดด้วย 50% เมทานอล (12.2 mM TE/g dry basis) พบว่า DPPH ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่สกัดโดยใช้น้ำกลั่นที่เวลาในการแช่ 0 ชั่วโมง (10.9 mM TE/g dry basis) ในขณะเดียวกัน Jeyaraj et al. (2021) พบว่าในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและการสกัดด้วย 50% เอทานอล ที่ทดสอบโดยใช้ DPPH และ ferric พบว่าช่วยลดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันสีน้ำเงินสามารถสกัดได้โดยใช้น้ำกลั่นและใช้เอกสารนี้เป็นสารแต่งสีสำหรับธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ดังนั้นเมื่อสกัดสารแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันเพื่อใช้ในตำรับอาหารจึงควรสกัดด้วยน้ำร้อนกับระยะเวลาในการสกัดที่สั้นกว่าครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายจะใช้ตัวทำละลาย เวลา พลังงานความร้อนมากกว่า และมีข้อเสียหลายประการ เพื่อทำการพิสูจน์การสกัดด้วยตัวทำละลายและเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด จึงมีการสำรวจเทคนิคการสกัดแบบไม่ธรรมดาหลายวิธี Ultrasonication เป็นหนึ่งในเทคนิคดังกล่าว ในการสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลตัวทำละลายและตัวอย่างในการแตกตัวของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช ช่วยอำนวยความสะดวกในการเคลื่อนย้ายไปยังตัวทำละลายโดยรอบ (Chemat et al., 2011) มีการศึกษาการสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์กับน้ำ พบว่าการสกัดด้วยน้ำกับคลื่นอัลตราซาวด์ให้สารสกัดแอนโทไซยานินที่ดีกว่า 246.48% เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเอทานอล จากการศึกษาดังกล่าว TAC ของสารสกัดดอกอัญชันสีน้ำเงิน (1.126 mg delphinidin-3-O-glucoside equivalent/g) ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกับคลื่นอัลตราซาวด์มีค่าสูงกว่า (0.325 mg delphinidin-3-O-glucoside equivalent/g) ที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล (Gwee and Chong, 2015) โดย Marsin et al. (2020) ใช้คลื่นไมโครเวฟในการสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน แต่ค่า TAC ของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่ได้จากการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟไม่ได้แสดงค่าที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า TAC ของสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อนในการศึกษาโดย Ahmad et al (2563) ดังนั้นการใช้การสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันด้วยคลื่นอัลตราซาวด์จึงมีแนวโน้มนำไปใช้สำหรับด้านอาหารได้ เมื่อสกัดแอนโทไซยานินจากกลีบดอกอัญชันโดยใช้น้ำ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่ละลายได้ในน้ำจะถูกสกัดออกมาพร้อมกันด้วย ดังนั้น สารประกอบเหล่านี้อาจมีส่วนช่วยให้คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพอาจส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (Jeyaraj et al., 2020) สารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่ได้จากการสกัดโดยใช้วิธีอัลตราซาวด์แสดงให้เห็นถึงกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระของ DPPH เมื่อเทียบกับสารสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล (Gwee and Chong, 2015) จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในการตรวจสอบผลกระทบของเทคโนโลยีจากการสกัดแบบใหม่อื่นๆ เช่น การแปรรูปด้วยความดันสูง การสกัดด้วยน้ำ เป็นต้น เพื่อสกัดสารแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน

2.2.1 การสังเคราะห์สาร ternatins

กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานินเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (Tanaka et al., 2009) การสังเคราะห์แอนโทไซยานินมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone 3-hydroxylase (F3H), flavonoid 3'-hydroxylase (F3' H), flavonoid 3',5' -hydroxylase (F3' 5' H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS), glycosyltransferase (GT), and acyltransferase (AT) anthocyanin ถูกสังเคราะห์ขึ้นในไซโทพลาซึมของเซลล์ แล้วส่งไปยังแวคิวโอลการขนส่งของแวคิวโอลเกิดขึ้นในหลาย pathway ซึ่งรวมถึงเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมที่ได้มาจากถุงเรติคูลัมและตัวขนส่งที่คล้ายกลูตาไรโอนที่จับกับโทโนพลาสต์ Stransferase (Collings, 2019) แอนโทไซยานินที่มีกรดเป็น

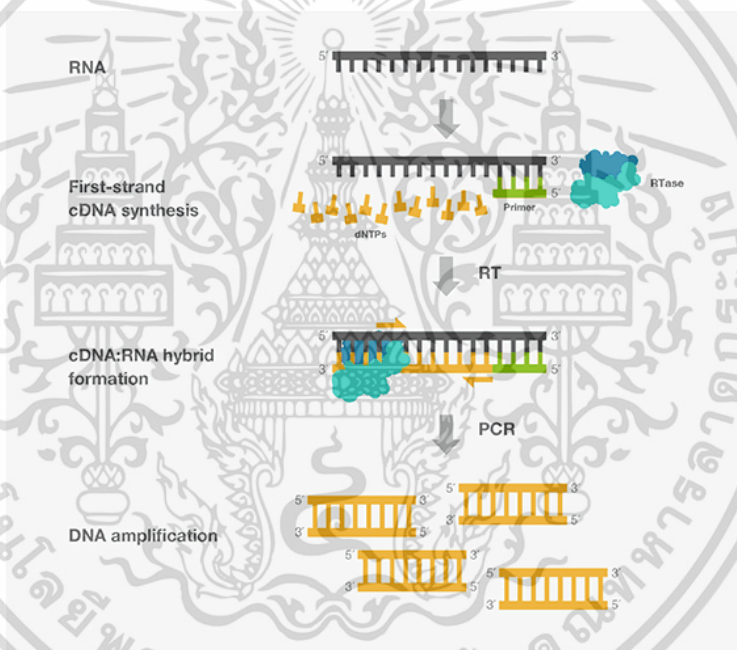
องค์ประกอบที่เร่งปฏิกิริยาโดย acyltransferase (ATs) และการตัดแปลงแอนโทไซยานินขั้นสุดท้ายเกิดขึ้นหลังจากถูกย้ายไปยังแควิวอล (Lu et al., 2021) จากการศึกษาโดย Kogawa et al. (2007a) และ Tanaka et al. (2009) พบว่าในการสังเคราะห์ ternatins ชั้นแรกเริ่มจากการสร้างของ delphinidin-3-O- β -glucoside และจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโดย glucosylation และ acylation สำหรับการสังเคราะห์ delphinidin-3-O- β -glucoside, 4-coumaroyl-CoA และ malonyl-CoA ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นการสังเคราะห์ naringenin และ chalcone จากสารตั้งต้นทั้งสองถูกใช้เป็นตัวกลาง โดยเอนไซม์ CHS ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ จากนั้น naringenin chalcone จะถูกแยกออกจาก CHI ไปเป็น naringenin จากนั้น naringenin จะถูกเปลี่ยนไปเป็น dihydrokaempferol โดยเอนไซม์ F3H Dihydrokaempferol จะถูกแปลงเป็น dihydromyricetin โดยทั้งเอนไซม์ F3' 5' H และ F3' H เป็นเอนไซม์ที่มีผลทำให้แอนโทไซยานินมีความหลากหลายโดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง B-ring hydroxylation ซึ่งมีผลต่อสีของแอนโทไซยานิน (Liu et al., 2018) ดังนั้น F3' 5' H จึงส่งผลโดยตรงต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินสีน้ำเงินในดอกอัญชันสีน้ำเงิน เนื่องจากการเกิด hydroxylation ของ B-ring จะไปเปลี่ยนสีแอนโทไซยานินไปทางสีน้ำเงิน (Togami et al., 2006) จากนั้น dihydromyricetin ถูกเปลี่ยนไปเป็น leucodelphinidin ซึ่งไม่มีสี โดยเอนไซม์ DFR และ delphinidin ตามลำดับ โดยเอนไซม์ ANS (Kogawa et al., 2007a) หมู่ glucosyl ถูกเติมให้กับ delphinidin โดยแอนโทไซยานิน 3-O-glucosyltransferase (3GT) เพื่อสร้าง delphinidin-3-O- β -glucoside โดย Kogawa et al. (2007a) ได้ระบุว่ามีการเพิ่มหมู่ glucosyl อื่นใน B-ring ของ delphinidin 3-O- β -glucoside malonylation ของ delphinidin 3-O- β -glucoside เท่านั้น ดังนั้น delphinidin 3-O- β -glucoside จึงเป็น malonylated เมื่อมี anthocyanidin 3-O-glucoside 6''-O-malonyltransferase (A6'' MaT) จากนั้น glucose สองโมเลกุลจะถูกเติมลงใน delphinidin 3-O-(6''-O-malonyl)- β -glucoside ตำแหน่งแรกตั้งแต่ 3' ไปตำแหน่ง 5' (Kazuma et al., 2004) glycosylation นี้มีสื่อกลางโดยแอนโทไซยานิน 3',5'-O-glucosyltransferase (UA3' 5' GT) ในสองขั้นตอนต่อมา (Kogawa et al., 2007b) โมเลกุลนี้เรียกว่า delphinidin 3-O-(6''-O-malonyl)- β -glucoside-3',5'-di-O- β -glucoside และสามารถเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า ternatin C5. Ternatin C5 เป็น ternatin อย่างง่าย ternatin อีก 14 ชนิดถูกสังเคราะห์โดยการเพิ่มหมู่ acyl และ glucosyl ไปยัง ternatin C5 ต่อข้างหน้าโมเลกุลของ acyltransferases (ATs) และ glucosyltransferases (GTs) นอกจากนี้ acyltransferases (AT) ยังมีบทบาทสำคัญที่ส่งผลให้เกิดสีน้ำเงินและความเสถียรของ ternatin เนื่องจาก polyacylation ของ ternatin ที่มีหมู่ p-coumaroyl ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินเป็นบริเวณสีน้ำเงินเนื่องจากการสร้างเม็ดสีร่วมภายในโมเลกุลระหว่าง acyl moieties และ ระหว่าง acyl moieties กับ anthocyanins chromophore (Honda and Saito, 2002) นอกจากนี้ polyacylation ที่ตำแหน่ง 3' ของแอนโทไซยานินยังส่งผลให้มีสีน้ำเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่สู่สาธารณะเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Lu et al., 2021) นี้คือเหตุผลหลักที่ทำให้ ternatin มีความเสถียรสูง เนื่องจาก ternatin ส่วนใหญ่มี polyacylated ที่ตำแหน่ง 3' ดังนั้นเมื่อศึกษาการสังเคราะห์ ternatin, hydroxylation, glycosylation และ acylation ทั้งหมดนี้จึงถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินสีน้ำเงินในกลีบดอกอัญชัน

2.3 Reverse transcription

การสร้างสาย complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธี reverse transcription (RT) (รูปที่ 2.2) โดยใช้ RNA เป็นต้นแบบ หรือการทำอีกสายขึ้นมาคู่กับ RNA นั้นเองเพื่อให้เป็นสายคู่ที่จะเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ได้ โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งการสร้างสาย cDNA จะใช้ primer ที่เป็น oligo-dT, random hexamer หรือ gene specific primer ก็ได้ จากนั้นจึงนำสาย cDNA ที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่ขั้นตอน PCR ต่อไป



รูปที่ 2.2 กระบวนการ Reverse transcription

(ที่มา: microbiologynotes.org/reverse-transcription-polymerase-chain-reaction-rt-pcr/)

2.4 การแสดงออกของยีน

การแสดงออกของยีนเกิดจากกระบวนการถ่ายทอดข้อมูลจาก DNA ไปยัง RNA เรียกว่าการถอดรหัส (Transcription) ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ DNA เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ RNA ซึ่งกระบวนการ Transcription นั้นประกอบไปด้วยกระบวนการที่สำคัญ 3 ขั้นตอนคือ Initiation, Elongation และ Termination โดยภายหลังจากมีการถอดรหัสแล้วก่อนจะมีการแปลรหัส (Translation) ไปเป็นโปรตีน จะมีกระบวนการเปลี่ยนแปลง RNA ที่สังเคราะห์ได้รวมทั้งมีกลไกในไม่ช้ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การควบคุมการแสดงออกของยีน โดยที่กระบวนการ ลอกรหัส การเปลี่ยนแปลง RNA และการควบคุมการแสดงออกของยูคาริโอตจะมีกลไกที่ซับซ้อนกว่าโปรคาริโอต ซึ่งประกอบด้วยยีนโครงสร้าง (structural gene) และยีนควบคุม (regulatory gene) โดยการแสดงออกของยีนจะมีการแสดงออกได้มากน้อยเร็วหรือช้า อาจขึ้นอยู่กับความแตกต่างขององค์ประกอบของยีนที่มีอยู่ในสายพันธุ์พืชที่ทนทานและอ่อนแอเช่นลำดับของนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนที่แตกต่างกัน ความแตกต่างกันของส่วนโปรโมเตอร์ หรือความแตกต่างกันของ transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนนั้นๆ ดังนั้น การทราบระดับการแสดงออกของยีนจะทำให้เข้าใจถึงกระบวนการทำงานของพืชที่ทนทานหรืออ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมชนิดนั้นๆ ได้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตัวอย่างงานวิจัยที่ทำการโคลนยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน เช่นงานวิจัยของ กุหลาบ และคณะ (2557) ตัวอย่างดอกอัญชันและพืทูเนียในระยะเริ่มเกิดสีน้ำเงินและใช้ยีนที่สำคัญในสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ *F3'5'H* ซึ่งทำที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ผลการทดลองการโคลนยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพืทูเนียสีน้ำเงินนั้น พบว่ามีการแสดงออกของยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพืทูเนีย ซึ่งยีนที่โคลนได้มีขนาด 1739 bp และ 1852 bp ตามลำดับ

การโคลนยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินนั้นถูกนำมาศึกษาในพืชชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่นการโคลนยีนจากดอกไฮเดรนเยีย เช่น การโคลนยีนและการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน *HymMYB2* ใน *Hydrangea macrophylla* ในงานวิจัยของ Peng Jiqing et al. (2021) ได้นำ *Hydrangea macrophylla* ที่เป็นหมันของไฮเดรนเยียแมคโครฟิลลาพันธุ์ 'Forever Summer' (สีน้ำเงิน), 'Fendai' (สีแดง) และ 'Emile Mouillere' (สีขาว) ใน S1, S2, S3 และ S4 มาทำการทดลองผลการทดลองพบว่า ยีน *HymMYB2* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR ขึ้นแถบเดียวที่ 1,000 bp และการแสดงออกของ *HymMYB2* เพิ่มขึ้นก่อนแล้วค่อยลดลงตามการพัฒนาของดอกที่เป็นหมันในพันธุ์ไฮเดรนเยียสีน้ำเงิน สีขาว และสีแดง ซึ่งการศึกษาผลของ *HymMYB2* ต่อยีนโครงสร้างในการสังเคราะห์ทางชีวภาพของแอนโทไซยานินใน *hydrangea* ยีนที่สำคัญได้แก่ *ANS*, *BZ1*, *C3' 5' H*, *CHS* (chalcone synthase), *CYP75B1* (flavonoid 30 - monooxygenase), *DFR* และ *F3H* พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *ANS*, *C3' 5' H*, *CYP75B1*, *DFR* และ *F3H* ทั้งหมดมีค่าสูงสุดในช่วงที่ดอกบานเต็มที่ (S3)

งานวิจัยของ Han et al. (2020) ศึกษาการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และแอนโทไซยานินในกลีบดอก *Malus hupehensis* โดยเก็บรวบรวมระยะการพัฒนาของดอก *Malus hupehensis* มาทั้งหมด 5 ระยะ คือ S1 คือ ระยะตาขนาดเล็ก, S2

คือ ระยะตาขนาดใหญ่, S3 คือ ระยะเริ่มออกดอก, S4 คือ ระยะดอกบานออก และ S5 คือ ระยะดอกบานอย่างสมบูรณ์ ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ *PAL*, *FHT*, *CHS*, *CHI*,

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FHT, DFR, FLS, ANS และ *UFGT* จากการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน *CHS, CHI, F3H, DFR* และ *ANS* มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดใน S2 เพราะดอกใน S2 มีกลีบดอกที่เป็นสีแดงซึ่งในกลีบดอกที่เป็นสีแดงนั้นจะไปสอดคล้องกับระดับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยพบว่าระดับการสังเคราะห์ของแอนโทไซยานินนั้นสูงสุดในระยะ S2 ซึ่งมีกลีบดอกสีแดง

งานวิจัยของ Hui et al. (2022) ศึกษาการระบุ 7 ยีนโครงสร้างที่สำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของกลีบดอก *Hydrangea macrophylla* โดยนำกลีบเลี้ยงของดอก *Hydrangea macrophylla* มาทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ‘Bailmer’, ‘Duro’ และ ‘Saxon Kleiner Winterberg’ ซึ่งผลการทดลองพบว่าจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินแสดงให้เห็นว่าระดับการแสดงออกของ *HmCHS1* แสดงออกสูงที่สุดในกลีบเลี้ยงและแสดงออกต่ำที่สุดในรากและลำต้น โดย *HmCHS1* มีการแสดงออกในกลีบเลี้ยงสีชมพูของ ‘Bailmer’ และ ‘Duro’ มากกว่ากลีบเลี้ยงสีขาวของ ‘Saxon Kleiner Winterberg’ ส่วนยีน *HmCHI* นั้นมีการแสดงออกมากที่สุดในกลีบเลี้ยงของ ‘Bailmer’ และ ‘Duro’ ต่อมา ยีน *HmF3H3* มีการแสดงออกสูงที่สุดในกลีบเลี้ยงของ ‘Bailmer’ แต่ถ้าเป็น ‘Duro’ จะแสดงออกที่รากสูงที่สุด ส่วนระดับการแสดงออกของ *HmF3H1* ในกลีบเลี้ยงสีชมพูสูงกว่ากลีบเลี้ยงสีขาว ถ้าเป็นยีน *HmF3’H1* และ *HmF3’H2* ซึ่งระดับการแสดงออกของ *HmF3’H1* ในกลีบเลี้ยงสีชมพูของทั้งสองสายพันธุ์คือ ‘Bailmer’ และ ‘Duro’ สูงกว่ากลีบเลี้ยงสีขาวของ ‘Saxon Kleiner Winterberg’ แต่ระดับการแสดงออกของ *HmF3’H2* ในกลีบเลี้ยงสีชมพูของ ‘Duro’ ต่ำกว่ากลีบเลี้ยงสีขาวของ ‘Saxon Kleiner Winterberg’ ต่อมา ยีน *HmDFR1* มีการแสดงออกสูงที่สุดในกลีบเลี้ยงของ ‘Bailmer’ แต่ต่ำกว่าในรากและลำต้นของ ‘Duro’ ส่วน *HmDFR2* มีการแสดงออกสูงที่สุดในกลีบเลี้ยงของ ‘Bailmer’ และ ‘Duro’ สุดท้ายยีน *HmANS1, HmANS2* และ *HmANS3* มีการแสดงออกในกลีบเลี้ยงของ ‘Bailmer’ และ ‘Duro’ เท่านั้น แต่ *HmANS3* มีการแสดงออกในกลีบเลี้ยงสูงกว่าในส่วนอื่นรวมถึงมีการแสดงออกสูงกว่ากลีบเลี้ยงสีขาวของ ‘Saxon Kleiner Winterberg’ ดังนั้นยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในกลีบเลี้ยง ได้แก่ *HmCHS1, HmCHI, HmF3H1, HmF3’H1, HmF3’5’H, HmDFR2* และ *HmANS3*

งานวิจัยของ Zhao et al. (2015) ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในทับทิมสีแดง (Hongbaoshi) และสีขาว (Shuijingtian) โดยได้นำทับทิมสีแดงและสีขาวมาทั้งหมด 8 ระยะ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการโคลนยีนแล้ววิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินทั้งหมด 6 ยีน ที่นำมาโคลนยีนในทับทิมสีแดงและสีขาวได้แก่ *ANS, CHS, CHI, F3H, DFR, UFGT* และ *MYB* ปรากฏว่า มีการแสดงออกของยีนทั้งหมด 5 ยีน ในทับทิมสีแดงและสีขาวได้แก่ยีน *PgCHS, PgCHI, PgF3H, PgDFR* และ *PgUFGT* ซึ่งจะแสดงออกสูงสุดที่ 2 ระยะ ในระหว่างการพัฒนาผลช่วงระยะแรกและระยะที่

ผลไม่สุก โดยยีน *PgANS* มีการแสดงออกในทับทิมสีแดงซึ่งการแสดงออกของยีน *PgANS* นั้นมีการไม่เท่ากันใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงออกที่เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เหมือนกับระยะเวลาพัฒนาของทับทิมสีแดง แต่ไม่มีการแสดงออกในทับทิมสีขาว ส่วน *PgMYB* มีการแสดงออกทั้งในทับทิมสีแดงและสีขาว แต่จะแสดงออกสูงสุดที่ระยะ S3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

เก็บรวบรวมดอกอัญชันสีม่วงที่มีระยะการพัฒนาดอกที่แตกต่างกัน 3 ระยะ โดยใช้ขนาดของดอกเป็นข้อกำหนดระยะการพัฒนา

3.2 ไพโรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

ไพโรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 7 คู่ ซึ่ง 6 คู่ นั้นมีในฐานข้อมูล ได้แก่ Flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H), UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (3GT), dihydroflavanol 4-reductase (DFR), Chalcone Isomerase (CHI), Chalcone Synthase (CHS) และ Leucoanthocyanidin dioxygenase (ANS) และอีก 1 ไพโรเมอร์ นั้นไม่มีในฐานข้อมูล

3.2.1 การออกแบบไพโรเมอร์ที่มีในฐานข้อมูล Genbank

ไพโรเมอร์ทั้ง 6 คู่ นั้นเป็นไพโรเมอร์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Genbank โดยลำดับกรดอะมิโนของพืชที่ใช้คือ *Clitoria ternatea* L. จากนั้นนำไปออกแบบไพโรเมอร์ โดยไพโรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ได้แก่ Flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H), UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (3GT), dihydroflavanol 4-reductase (DFR), Chalcone Isomerase (CHI), Chalcone Synthase (CHS) และ Leucoanthocyanidin dioxygenase (ANS) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไพโรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

Primer name	Primer sequence (5'--->3')	Tm	%GC	Product size
Ct3GT-F	ATGGAAAACACCAAGCATGTCG	58	45	1341
Ct3GT-R	TTAGCTACAAGAAATCACTTCAAC	53	33	
CtANS-F	ATGGGGAGTGAGGGTATTCG	57	55	1065
CtANS-R	TCATTTTGGGAGAGCTTCCTG	56	48	
CtCHI-F	ATGGCAACGCCGTGGTCCTT	64	60	660
CtCHI-R	TCACTTGTCAGTATCACCACC	55	48	

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

Primer name	Primer sequence (5'--->3')	Tm	%GC	Product size
CtCHS-F	ATGGTCAGTGTGGAAGATCCG	58	48	1170
CtCHS-R	TTAGGCAGCAACACTGTGGAG	59	52	
CtDFR-F	ATGGATTCAGCAGCTGAAGTGG	59	50	1020
CtDFR-R	TTATTCGTTCTGTTGCCATTAAG	57	42	
CtF3'5'H-F	ATGTTCTTCTAAGAGAAATTGG	52	35	1572
CtF3'5'H-R	TTAGGAATTAATAACATTGTAAGC	49	25	

3.3 การสกัด RNA จากตัวอย่างดอกอัญชันสีม่วง

เตรียมตัวอย่างดอกอัญชัน 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองเทไนโตรเจนเหลวลงไปแล้ว บดให้ละเอียด จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัด Plant total RNA mini kit (Favorgen, Taiwan) จากนั้นเติม FARB buffer 500 ไมโครลิตร (เพิ่ม B-ME) นำมาเขย่าให้เข้ากันโดยการ vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวาง Filter Column ลงใน Collection tube นำส่วนผสมใส่ลงใน Filter column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บส่วนใสที่อยู่เหนือตะกอนใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ ทั้ง Filter column และ Collection tube จากนั้นเติมเอทานอล 70% RNase-free 1 ปริมาตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยการ vortex จากนั้นวาง FARB mini column ลงใน Collection tube อันใหม่ ใส่ส่วนผสมลงใน FARB mini column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้ววาง FARB mini column ลงใน Collection tube อันเดิม ทำซ้ำอีกครั้ง (ส่วนผสมตัวอย่างที่เหลือ) เติม Wash buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงใน FARB mini column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้ววาง FARB mini column ลงใน Collection tube อันเดิม แล้วเติมสารละลาย DNase 1 ที่ปราศจาก RNase 60 ไมโครลิตร ลงใน FARB mini column แล้ววางไว้บน benchtop เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม Wash buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงใน FARB mini column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง วาง FARB mini column ลงใน Collection tube เติม จากนั้นเติม Wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงใน FARB mini column แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง วาง FARB mini column ลงใน Collection tube อันเดิม ทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำ FARB mini column ใส่ลงใน Elution tube จากนั้นเติม ddH₂O ที่ปราศจาก RNase 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลางแผ่นกรองของ FARB mini column เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 18,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อแยกอาร์เอ็นเอออกมา แล้วนำอาร์เอ็นเอไปเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ RNA ที่สกัดได้ ไปสังเคราะห์เป็น cDNA ต่อ โดยใช้เทคนิค reverse transcription

3.4 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยการทำเทคนิคเจลอิลีกโทรโฟริซิส ใช้เจลอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีจะต้องไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือสารปนเปื้อนอื่น ๆ และวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมแบบนาโน (Nano drop) โดยใช้สารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้จากดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่างสารละลายอาร์เอ็นเอ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีค่าการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 230 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 2.0 ถึง 2.2

3.5 การสังเคราะห์ cDNA ด้วยปฏิกิริยา Reverse transcription

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะ จากนั้นเตรียมองค์ประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยา Reverse transcription ดังตารางที่ 3.2 โดยทำ master mix ด้วยการนำ water, 5X iscript buffer, Oligo dT และ iscript RT ผสมส่วนผสมทั้ง 3 อย่าง ลงในหลอดทดลอง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงในเครื่อง Spin Down จากนั้นนำอาร์เอ็นเอทั้ง 3 ระยะ ใส่ลงในหลอดทดลองโดยแต่ละระยะจะใช้หลอดทดลอง 1 หลอด รวมทั้งหมด 3 หลอด แล้วนำ master mix ใส่ในหลอดทดลองทั้ง 3 หลอด แล้วนำไปทำปฏิกิริยา Reverse transcription ในเครื่อง Thermal Cycler ซึ่งอุณหภูมิที่และเวลาที่ใช้คือ 42 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง, 85 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของปฏิกิริยา reverse transcription

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
RNA (100 mg/ul)	10 ul
5x iscript buffer	4 ul
Oligo dT	2 ul
Iscrip RT	1 ul
Water	3 ul
รวม	20 ul

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่าการใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์ anthocyanin ด้วยเทคนิค PCR

นำไพรเมอร์คู่ F,R ของยีนที่มีลำดับเบสในฐานข้อมูลคือ ANS, 3GT, DFR, CHI, CHS และ F3'5'H และนำ cDNA ของตัวอย่างดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยเตรียมองค์ประกอบสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
1. Water	11.5
2. 10X buffer	2.00
3. dNTP	2.00
4. MgCl ₂	0.4
5. DNA Taq polymerase	0.1
6. Primer F	1.00
7. Primer R	1.00
8. cDNA	2.00
ปริมาตรรวมทั้งหมด	20.00

ทำ master mix ก่อน ด้วยการนำ water, 10X buffer, MgCl₂ และ dNTP ผสมส่วนผสมทั้ง 4 อย่างลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำ cDNA ทั้ง 3 ระยะ ใส่ลงในหลอดทดลองโดยแต่ละระยะจะใช้หลอดทดลอง 6 หลอด รวมทั้งหมดจะมี 18 หลอด แล้วนำ primer F,R ใส่ลงในหลอดทดลองที่ได้ใส่ cDNA ไปเมื่อข้างต้นแล้ว จากนั้นนำ master mix ที่เตรียมไว้แล้วไปใส่ DNA Taq polymerase แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงในเครื่อง Spin Down เพื่อให้สารผสมตกมาอยู่ก้นหลอดทดลอง แล้วนำ master mix ใส่ในหลอดทดลองทั้ง 18 หลอด แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal Cycler ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน แสดงดังตารางที่ 3.4 และทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตรวจสอบชิ้น DNA ที่เพิ่มปริมาณได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยาในแต่ละขั้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	
Annealing	55	30 วินาที	39
Extension	72	1 นาที 30 วินาที	
Final Extension	72	5 นาที	1

ทดลองปรับอุณหภูมิขั้น Annealing เป็น 54 องศาเซลเซียส และตรวจสอบขั้น DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.7 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *F3H*

ไพรเมอร์ที่ไม่มีในฐานข้อมูลใช้ 1 คู่ ได้แก่ flavanone 3-hydroxylase (*F3H*) ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยค้นหาลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ของพืชชนิดอื่นที่ใกล้เคียงหลาย ๆ ชนิด โดยต้องหาลำดับกรดอะมิโน *F3H* ของพืชชนิดอื่นถึงจะทราบลำดับเบสของ *F3H* ในอัญชัน ซึ่งจะใช้ฐานข้อมูล GenBank ในการหาลำดับกรดอะมิโนของพืชชนิดอื่นที่อยู่ใน family เดียวกับ *Clitoria ternatea* L. ซึ่งพืชชนิดอื่นที่หามาได้ ได้แก่ *Glycine max* (Soy bean), *Glycine soja*, *Spatholobus suberectus*, *Cajanus cajan*, *Vigna radiata* var. *radiata*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna angularis* และ *Vigna unguiculata* แล้วนำลำดับกรดอะมิโนหาได้นำไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีนในพืชชนิดอื่นที่หามาได้แล้วนำลำดับเบสที่หาได้นำมาเทียบกันเพื่อหาบริเวณที่อนุรักษ์ด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณที่อนุรักษ์ จากนั้นเมื่อออกแบบไพรเมอร์โดยการคัดเลือกจากลำดับเบสที่เป็นบริเวณที่อนุรักษ์แล้วจะนำลำดับเบสที่คัดเลือกไปตรวจสอบว่าตำแหน่งของลำดับเบสที่คัดเลือกมามีค่า GC content (ค่า GC ควรจะอยู่ที่ 50-60%) Melting Temperature (T_M) ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้หรือไม่ โดยจะใช้โปรแกรม Oligo Calc

3.8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค PCR

โดยนำไพรเมอร์คู่ F,R ที่ไม่มีในฐานข้อมูลที่ออกแบบได้คือ *F3H* และ cDNA ของดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยเตรียมองค์ประกอบ

สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.3 ทำ master mix ก่อน ด้วยการนำ water, 10X buffer, MgCl₂ และ dNTP ผสมส่วนผสมทั้ง 4 อย่างลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำ cDNA ทั้ง 3 ระยะเวลา ใส่ลงในหลอดทดลองโดยใส่ cDNA ทั้ง 3 ระยะเวลารวมกัน รวมทั้งหมดจะมี 8 หลอด แล้วนำไพรเมอร์คู่ F,R ใส่ลงในหลอดทดลองที่ได้ใส่ cDNA ไปเมื่อก่อนหน้านี้แล้ว จากนั้นนำ master mix ที่เตรียมไว้ไปใส่ DNA Taq polymerase แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงในเครื่อง Spin Down เพื่อให้สารผสมตกมาอยู่ก้นหลอดทดลอง แล้วนำ master mix ใส่ในหลอดทดลองทั้ง 8 หลอด จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง Thermal Cycler ซึ่งอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอน แสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยาในแต่ละขั้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	
Annealing	52,54	30 วินาที	39
Extension	72	1 นาที 30 วินาที	
Final Extension	72	5 นาที	1

ตรวจผลการทดลองด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส การคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะนำไปใช้สังเคราะห์ ดีเอ็นเอควรเป็นไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน จากนั้นนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้มาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ กับ cDNA ของดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะเวลา

3.9 การทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ซึ่งผงอะกาโรส ปริมาณ 0.1 กรัม หรือ 0.2 กรัม นำมาละลายใน 1X TBE buffer ปริมาตร 15 มิลลิลิตร หรือ 25 มิลลิลิตร ด้วยไมโครเวฟ เมื่อผงอะกาโรสละลายหมดแล้ว ทิ้งไว้ให้พอรุ่งใส่น้ำย้อมเจล NEO green ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรต่อเจล 15 มิลลิลิตรหรือ 1 ไมโครลิตรต่อเจล 25 มิลลิลิตร เทเจลลงในถาดเจลแล้วเสียบหัวเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดดีเอ็นเอ วางถาดเจลไว้ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อแผ่นเจลแข็งตัวให้ดึงหัวออกแล้วนำถาดเจลใส่ลงใน Electrophoresis Chamber ที่มีเอกสารนี้ 1X TBE buffer นำดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม (loading dye) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไมโครลิตร หยอดลงไปในกลุ่มเจล และนำ DNA Marker ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอดลงไปในกลุ่ม

แรกของเจล จากนั้นต่อ Electrophoresis Chamber เข้ากับตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า ปล่อยกระแสไฟฟ้า จากตัวจ่ายกระแสไฟฟ้า 130 โวลต์ต่อเจล 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที หรือ 140 โวลต์ต่อเจล 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลมาสองดูแถบดีเอ็นเอ ใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและ ถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลอิเล็กทรอนิกส์



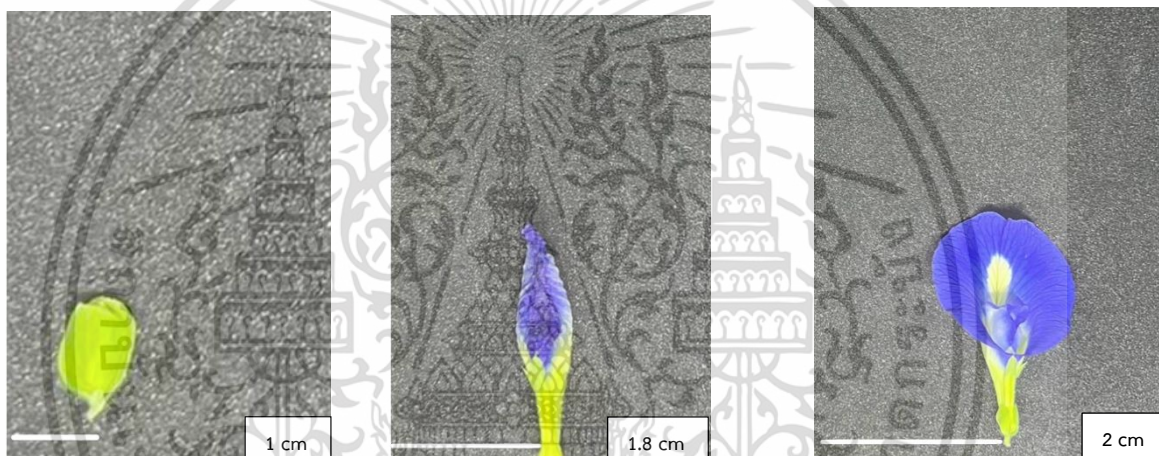
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ลักษณะตัวอย่างดอกอัญชัน

จากการเก็บรวบรวมดอกอัญชันสีม่วงที่ระยะการพัฒนาทั้ง 3 ระยะ อธิบายได้เป็น ระยะ S1 คือระยะตาขนาดเล็ก มีสีเขียว, ระยะ S2 คือระยะเริ่มออกดอก กลีบดอกมีสีม่วงมากกว่าระยะ S1 และระยะ S3 คือระยะดอกบานออก กลีบดอกมีสีม่วงชัดเจนมากกว่าระยะ S1 และ S2



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างดอกอัญชันสีม่วงระยะ S1, S2 และ S3 ตามลำดับ

S1=ระยะตาดอกขนาดเล็ก, S2=ระยะเริ่มออกดอก และ S3=ระยะดอกบานออก
แถบสีขาว S1 มีขนาดเท่ากับ 1 เซนติเมตร, แถบสีขาว S2 มีขนาดเท่ากับ 1.8 เซนติเมตร และ แถบสีขาว S3 มีขนาดเท่ากับ 2 เซนติเมตร

4.2 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ

นำดอกอัญชันมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุด FavorPrep™ Plant Total RNA MiNi Kit จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบหาค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000c โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260นาโนเมตรต่อ 230 นาโนเมตร ดังตารางที่ 4.1 พบว่า อาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ 96.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 1777.96 นาโนกรัมต่อเอกลสารนี้ไมโครลิตร และค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง 2.01 ถึง 2.83 แสดงให้เห็นว่า

อาร์เอ็นเอของดอกอัญชันในระยะ S1 มีการปนเปื้อนของโปรตีน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมนั้นควรอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 2.2 และอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 230 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.12 ถึง 2.2 แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอของดอกอัญชันในระยะ S2 และ S3 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.91 และ 1.12 ตามลำดับแสดงให้เห็นว่าอาจมีสิ่งเจือปนเนื่องจากอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 230 นาโนเมตร ควรอยู่ในช่วง 2.0 ถึง 2.2 เมื่อนำอาร์เอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพด้วยการทำเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดีแล้วได้ขึ้นอาร์เอ็นเอที่ชัดเจน



รูปที่ 4.2 RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะ
1: ระยะ S1, 2: ระยะ S2 และ 3: ระยะ S3

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 230 นาโนเมตร ของอาร์เอ็นเอสกัดที่ได้จากดอกอัญชันที่ระยะการพัฒนาทั้ง 3 ระยะ

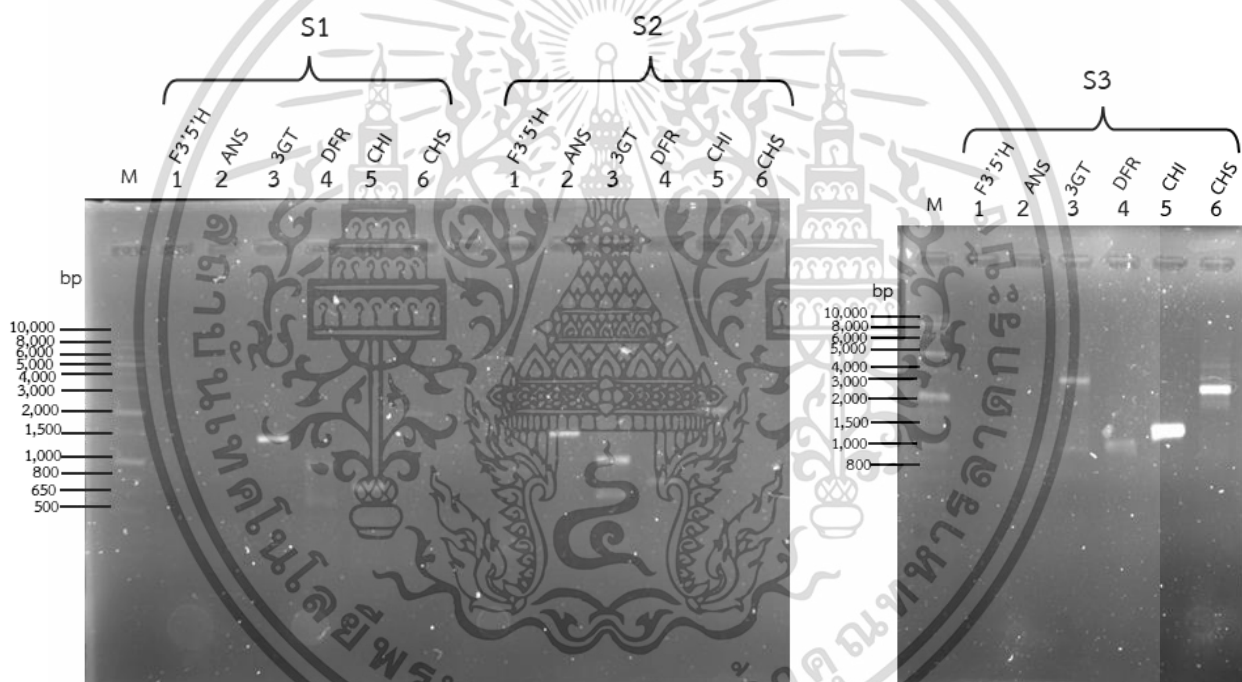
ระยะดอกของ อัญชัน	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 260/230 นาโนเมตร
S1	1777.96	2.83	2.20
S2	96.3	2.01	1.91
S3	106.5	2.07	1.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินด้วยเทคนิค PCR

4.3.1 ที่อุณหภูมิตั้ง 55 องศาเซลเซียส

ในการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ โดยนำ cDNA ของดอกอัญชันแต่ละระยะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงให้เห็นว่าในระยะ S1 มีไพรเมอร์ทั้งหมด 1 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีการแสดงแถบดีเอ็นเอแสดงว่ามีการแสดงออกของยีนและขนาดชิ้นดีเอ็นเอนั้นตรงตามที่ได้คาดไว้ คือ CtCHI มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 660 bp ในระยะ S2 และ S3 พบว่า มีการแสดงออกของยีน แต่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอไม่ตรงตามที่ได้คาดไว้

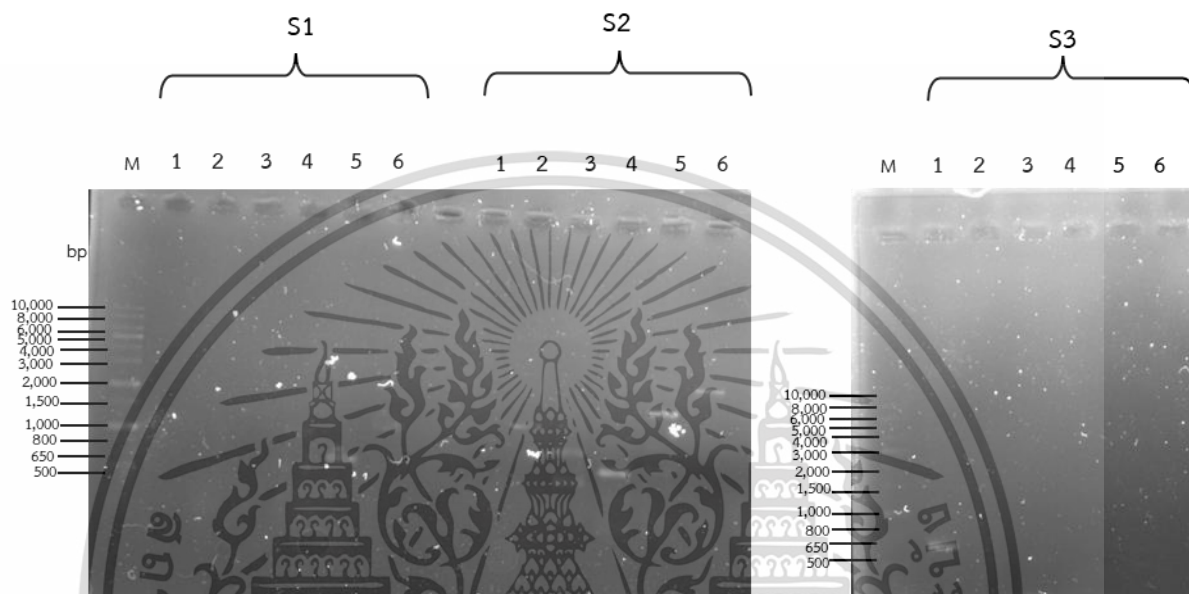


รูปที่ 4.3 ลายพิมพ์ cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ของระยะ S1, S2 และ S3 ที่อุณหภูมิตั้ง 55 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ที่อุณหภูมิต่ำ 54 องศาเซลเซียส

ในการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ โดยนำ cDNA ของดอกอัญชันแต่ละระยะนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงให้เห็นว่า ในระยะ S1, S2 และ S3 มีการแสดงออกของยีนแต่ขนาดขึ้นดีเอ็นเอไม่ตรงตามที่คาดไว้



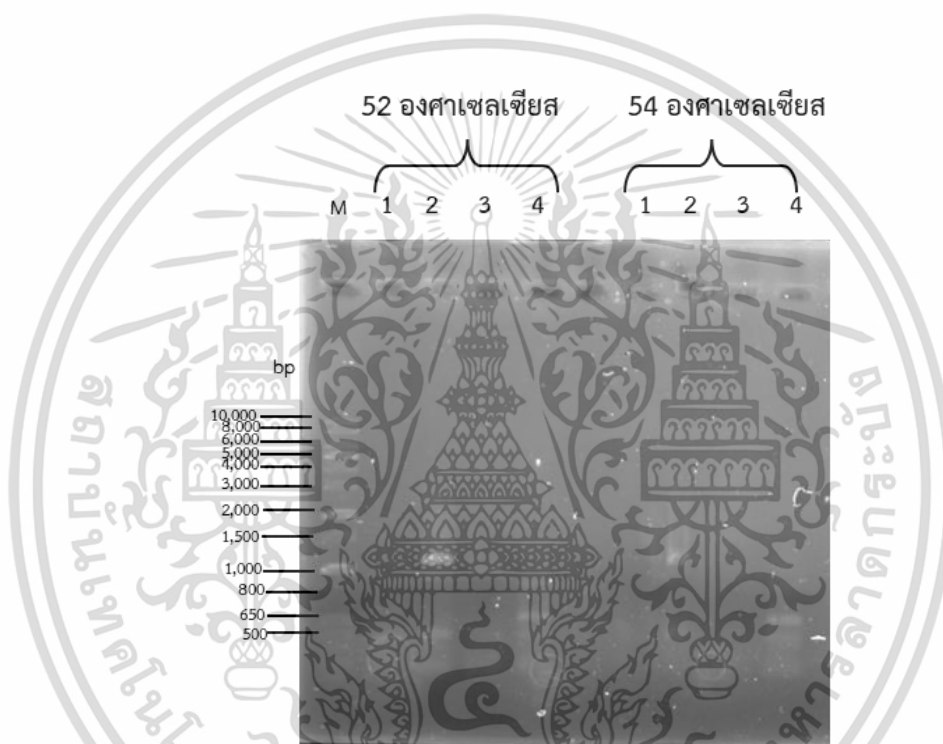
รูปที่ 4.3 ลายพิมพ์ cDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ของระยะ S1, S2 และ S3 ที่อุณหภูมิต่ำ 54 องศาเซลเซียส M=1kb DNA loader, 1=F3'5'H, 2=ANS, 3=3GT, 4=DFR, 5=CHI และ 6=CHS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *F3H* ด้วยเทคนิค PCR

4.4.1 ที่อุณหภูมิตั้ง 52 และ 54 องศาเซลเซียส

ในการคัดเลือกไพรเมอร์ 1 ไพรเมอร์ โดยนำ cDNA ของดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะมารวมกัน แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ CtF3H-F1/R1, CtF3H-F2/R2, CtF3H-F3/R3 และ CtF3H-F4/R4 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิตั้ง 52 องศาเซลเซียส และ 54 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 4.5 มีการแสดงออกของยีนแต่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอไม่ตรงตามที่คาดไว้



รูปที่ 4.5 ลายพิมพ์ cDNA ของระยะ S1, S2 และ S3

M=1kb DNA loader, 1=ไพรเมอร์ CtF3H-F1/R1, CtF3H-F2/R2,

CtF3H-F3/R3 และ CtF3H-F4/R4

เมื่อนำผลการทดลองของโครงการพิเศษนี้มาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของกุหลาบ คงทอง และคณะ (2557) ที่ศึกษาการโคลนยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงิน โดยใช้ยีน *F3'5'H* และใช้ดอกอัญชันร่วมกับพิทูเนียสีน้ำเงินโดยระยะของดอกที่นำมาใช้คือระยะดอกบานออก และอุณหภูมิที่ใช้คือ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่ามีการแสดงออกของยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพิทูเนีย โดยยีน *F3'5'H* ที่โคลนจากดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงินได้นั้น มีขนาด 1739 bp และ 1852 bp แต่ถ้าเป็นการโคลนยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันสีม่วงปรากฏว่าไม่มี

การแสดงออกของยีน *F3'5'H* ในทุกระยะของดอกอัญชันสีม่วง ดังนั้นโครงการงานพิเศษนี้ไม่มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของกุหลาบ และคณะ (2557) เนื่องจากงานวิจัยนี้มีการแสดงออกของยีน *F3'5'H* ในดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงิน แต่ในโครงการงานพิเศษนี้ไม่มีการแสดงออกของยีน *F3'5'H* ในทุกระยะของดอกอัญชันสีม่วงที่นำมาทำการทดลอง

จากการทดลองโครงการงานพิเศษนี้ขึ้นมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Peng et al. (2021) ที่ศึกษาการโคลนยีนและการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน *HymMYB2* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำเงินในดอก *Hydrangea macrophylla* โดยใช้ไพรเมอร์ ANS, BZ1, C3'5'H, CHS (chalcone synthase), CYP75B1 (flavonoid 30 - monooxygenase), DFR และ F3H ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำ cDNA ไปวิเคราะห์แล้วแสดงให้เห็นว่าในดอก *Hydrangea* ที่เป็นหมันจะมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุดที่ระยะดอกบานเต็มที่ซึ่งมากกว่าตาดอกประมาณ 7 เท่า แต่ในตัวอย่างดอก *hydrangea* ที่เป็นหมันทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ระยะดอกบานเต็มที่พบว่า 'Fendai' (สีแดง) มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุดซึ่งสูงกว่า 'Fmile Mouilere' (สีขาว) และ 'Forever Summer' (สีน้ำเงิน) และเมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *ANS*, *DFR*, *C3'5'H* และ *F3H* แสดงออกมากที่สุดในระยะดอกบานเต็มที่ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงการงานพิเศษนี้แล้วในดอกอัญชันมีสารแอนโทไซยานินที่ทำให้เกิดสีในดอกอัญชันเช่นกันโดยการแสดงออกของยีนในดอกอัญชันพบว่าในระยะดอกบานเต็มที่มีการแสดงออกของยีน *Ct3GT*, *CtCHI*, *CtDFR* และ *CtANS* ซึ่งโครงการงานพิเศษนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Peng et al. (2021) และความสัมพันธ์กับปริมาณแอนโทไซยานินได้มีการตั้งสมมติฐานว่า *HymMYB2* อาจควบคุมการเกิดสีของดอกไม้โดยการควบคุมการแสดงออกของ *C3'5'H*, *DFR* และ *ANS* การโคลนยีนและการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน *HymMYB2* ใน *Hydrangea macrophylla*

งานวิจัยของ Han et al. (2020) ศึกษาการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์และแอนโทไซยานินในกลีบดอก *Malus hupehensis* โดยใช้ยีนโครงสร้าง ได้แก่ *PAL*, *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ANS* และ *UFGT* ต่อมายีนควบคุมได้แก่ *R2-R3-MYB*, *bHLH* และ *WD40* จากผลการทดลองเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินแล้วพบว่า ยีน *PAL*, *CHS*, *ANS* และ *FLS* มีการแสดงออกมากที่สุดในระยะ S2 (ระยะตาขนาดใหญ่ มีสีแดง) หลังจากนั้นค่อย ๆ ลดลงซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนสีของดอกไม้ และเห็นได้ชัดว่ายีนมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน แต่ *MYB12* อาจจะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนโครงสร้าง รวมถึงการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอก *M. hupehensis* อีกด้วย แต่การแสดงออกของ *MYB10* มีความสัมพันธ์กับยีนโครงสร้าง (*CHS*, *CHI*, *DFR*, *ANS*) แสดงว่า *MYB10* ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยอาศัยอิทธิพลของการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในดอกไม้ หมายความว่ายีน *MYB12* และ *MYB10* นั้นไปส่งเสริมยีนโครงสร้างส่งผลทำให้แอนโทไซยานินมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะ ที่โครงการงานพิเศษนี้ได้ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลนยีนจะเห็นว่ามี การแสดงออกของยีน *Ct3GT*, *CtCHI*, *CtCHS*, *CtDFR*, *CtANS* และ *CtF3H* พบว่ามีการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในระยะ S2 และ S3 ในระยะ S1 ไม่ค่อยมีการแสดงออกของยีน อาจเกิดจากในระยะ S1 นั้น มีลักษณะเป็นตาดอกขนาดเล็กและมีสีเขียวไม่เหมือนกับระยะ S2 กับ S3 ที่ดอกมีสีม่วง ดังนั้นโครงการพิเศษนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Han et al. (2020) ในเรื่องของการแสดงออกของยีนที่พบว่า การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในดอก *M. hupehensis* และดอกอัญชัน ยีนที่มีการแสดงออกในดอกไม้ทั้ง 2 นั้น ตรงกัน และในระยะของดอกไม้ที่มีการแสดงออกของยีนด้วย รวมถึงเมื่อดอกไม้เปลี่ยนสีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินก็จะมีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน

งานวิจัยของ Hui et al. (2022) ได้ทำการศึกษาการระบุเจ็ดยีนโครงสร้างที่สำคัญในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินของกลีบดอก *Hydrangea macrophylla* โดยนำดอก *Hydrangea macrophylla* มาทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ‘Bailmer’, ‘Duro’ และ ‘Saxon Kleiner Winterberg’ จากผลการทดลองพบว่ายีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมีการแสดงออกในกลีบเลี้ยงสีชมพูของดอก ‘Bailmer’ และ ‘Duro’ มากกว่ากลีบเลี้ยงสีขาวของดอก ‘Saxon Kleiner Winterberg’ ดังนั้นยีนโครงสร้างที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่มีการแสดงออกได้แก่ *HmCHS*, *HmCHI*, *HmF3H*, *HmF3’H*, *HmF3’5’H*, *HmDFR* และ *HmANS* ซึ่งในดอกอัญชันก็มียีนที่มีการแสดงออกคล้ายกับยีนที่มีการแสดงออกในดอก *Hydrangea macrophylla* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ct3GT*, *CtDFR*, *CtCHI*, *CtCHS*, *CtANS* และ *CtF3H* ซึ่งจะเห็นว่าการแสดงออกของยีนนี้อาจขึ้นกับการเปลี่ยนสีของดอกไม้ได้เช่นกัน อย่างในงานวิจัยของ Hui Qi et al. (2022) ดอกที่มีสี จะมีการแสดงออกของยีนสูงกว่าดอกไม้ที่ไม่มีสีหรือสีขาว แสดงว่าดอกไม้ที่มีสีนั้นอาจมีสารแอนโทไซยานินมากกว่าดอกไม้ที่ไม่มีสีหรือสีขาวนั่นเอง

งานวิจัยของ Zhao et al. (2015) ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในทับทิมสีแดง (Hongbaoshi) และสีขาว (Shuijingtian) โดยไพรเมอร์ที่นำโคลนยีนมีทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ ANS, CHS, CHI, F3H, DFR, UFGT และ MYB ผลการทดลองพบว่า เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในทับทิมสีแดงกับสีขาว ซึ่งยีนที่มีการแสดงออกได้แก่ *PgCHS*, *PgCHI*, *PgF3H*, *PgDFR* และ *PgUFGT* โดยยีนทั้ง 5 ยีนนี้มีการแสดงออกสูงสุดที่ 2 ระยะ ในระหว่างการพัฒนาผลทับทิมช่วงระยะแรกและระยะที่ผลทับทิมสุก แต่ *PgANS* นั้นไม่มีการแสดงออกในทับทิมสีขาวแต่มีการแสดงออกในทับทิมสีแดง ส่วน *PgMYB* มีการแสดงออกทั้งในทับทิมสีแดงและสีขาว โดยจะแสดงออกสูงสุดที่ระยะ S3 เมื่อเปรียบเทียบกับโครงการพิเศษนี้แล้วพบว่า ในดอกอัญชันทั้ง 3 ระยะนั้น ยีนที่มีการแสดงออกในระยะการพัฒนาดอกทั้ง 3 ระยะ ได้แก่ *Ct3GT*, *CtDFR*, *CtCHI*, *CtCHS* และ *CtANS* สังเกตได้ว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของสีจะสะท้อนถึงความแตกต่างของปริมาณแอนโทไซยานินนั่นเอง ดังนั้นโครงการพิเศษนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao et al. (2015) ทั้งในด้านการโคลนยีนและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้แบบเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โทไซยานินที่พบว่า ยืนที่สังเคราะห์แอนโทไซยานินนั้นสามารถเกิดการแสดงออกในผลทับทิมได้ โดยที่ ยืนที่แสดงออกในผลทับทิมก็คล้ายกับยืนที่แสดงออกในดอกอัญชันเช่นเดียวกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงการพิเศษนี้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสารแอนโทไซยานินที่ทำให้เกิดสีในดอกอัญชัน โดยศึกษาการแสดงของของดอกอัญชันทั้งหมด 3 ระยะ จากผลการทดลองทดสอบหาลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanin ที่ยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่มีในฐานข้อมูล Genbank มีทั้งหมด 6 คู่ ได้แก่ F3'5'H , 3GT, DFR, CHI, CHS และ ANS ส่วนไพรเมอร์ที่ไม่มีในฐานข้อมูล Genbank ได้แก่ F3H ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในระยะ S1 มีไพรเมอร์ทั้งหมด 1 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีการแสดงแถบดีเอ็นเอแสดงว่ามีการแสดงออกของยีน ได้แก่ *CHI* โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 660 bp ส่วนในระยะ S2 และ S3 พบว่า มีการแสดงออกของยีนแต่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอไม่ตรงตามที่คาดไว้ ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส ในระยะ S1, S2 และ S3 มีการแสดงออกของยีนแต่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอไม่ตรงตามที่คาดไว้ อุณหภูมิ 52 และ 54 องศาเซลเซียส การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ CtF3H-F1/R1, CtF3H-F2/R2, CtF3H-F3/R3 และ CtF3H-F4/R4 ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส และ 54 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของยีนแต่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอไม่ตรงตามที่คาดไว้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 สามารถนำดอกไม้ชนิดอื่นมาทำเทคนิค PCR เพื่อหายีนที่มีผลต่อการแสดงออกของสีในดอกไม้เพิ่มเติมได้

5.2.2 ควบคุมอุณหภูมิการทำ PCR ให้มีหลายอุณหภูมิที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเพื่อดูว่าที่อุณหภูมิไหนมีการแสดงออกของยีนมากที่สุด

5.2.3 ควรรวบรวมพืชตัวอย่างให้มากขึ้นหรือเพิ่มระยะของพืชตัวอย่างในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กุหลาบ คงทอง, ประสาน สืบสุข และจีราพร แก่นทรัพย์. 2557. การโคลนยีน Flavonoid 3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*) จากอัญชันและพิทูเนีย. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชนากานต์ ลักษณะ. 2563. ระดับการแสดงออกของยีน *ScDREB2* ในยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมในสภาพเลียนแบบดินเค็มโซดิก. วิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพาวิทยาเขตสระแก้ว

ธัญพรรณ ฮ่อบรรทัด, ภัทรนันท์ ทวดอาจ และศรีัญญา มณีทอง. 2022. แอนโทไซยานิน-พีชสีม่วง. วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี. มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

Ahmad, A. N., Lim, S. A., and Navaranjan, N. 2020. Development of sago (*Metroxylon sagu*)-based colorimetric indicator incorporated with butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) anthocyanin for intelligent food packaging. *Journal of Food Safety*. 40 : 9.

Aprodu, I., Milea, S. A., Enachi, E., Răpeanu, G., Bahrim, G. E., and St'anciuc, N. 2020. Thermal degradation kinetics of anthocyanins extracted from purple maize flour extract and the effect of heating on selected biological functionality. *Foods*. 9 : 1593.

Bridle, P., and Timberlake, C. (1997). Anthocyanins as natural food coloursselected aspects. *Food Chemistry*. 58 : 103–109.

Buchweitz, M., Nagel, A., Carle, R., and Kammerer, D. R. 2012. Characterisation of sugar beet pectin fractions providing enhanced stability of anthocyaninbased natural blue food colourants. *Food Chemistry*. 132 : 1971–1979.

Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C., and Raghavarao, K. S. M. S. 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*. 90: 615–623.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการในวงจำกัดการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chemat, F., Huma, Z. E., and Khan, M. K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*. 18 : 813–835.
- Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., et al. 2019. Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*. 24 : 3007.
- Collings, D. A. 2019. Anthocyanin in the vacuole of red onion epidermal cells quenches other fluorescent molecules. *Plants*. 8: 596.
- Escher, G. B., Wen, M., Zhang, L., Rosso, N. D., and Granato, D. 2020a. Phenolic composition by UHPLC-Q-TOF-MS/MS and stability of anthocyanins from *clitoria ternatea* L. (butterfly pea) blue petals. *Food Chemistry*. 331 : 127341.
- Gwee, X. F., and Chong, F. C. 2015. Ultrasonic extraction of anthocyanin from *clitoria ternatea* flowers using response surface methodology. *Natural product Research*. 29 : 1485–1487.
- Han, M., Yang, C., Zhou, J., Zhu, J., Meng, J., Shen, T. and Li, H. 2020. Analysis of flavonoids and anthocyanin biosynthesis-related genes expression reveals the mechanism of petal color fading of *Malus hupehensis* (Rosaceae). *Brazilian Journal of Botany*. 43 : 81-89.
- Honda, T., and Saito, N. 2002. Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigments. *Heterocycles*. 56: 633–692.
- Jaafar, N. F., Ramli, M. E., and Salleh, R. M. 2020. Optimum extraction condition of *clitorea ternatea* L. flower on antioxidant activities, total phenolic, total flavonoid and total anthocyanin contents. *Tropical life sciences research*. 31 :

1-17.
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jeyaraj, E. J., Lim, Y. Y., and Choo, W. S. 2020. Extraction methods of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) flower and biological activities of its phytochemicals. *Journal of Food Science and Technology*. 58: 2054–2067
- Jeyaraj, E. J., Lim, Y. Y., and Choo, W. S. 2021. Effect of organic solvents and water extraction on the phytochemical profile and antioxidant activity of *clitoria ternatea* L. flowers. *ACS Food Science and Technology*. 1 : 1567–1577.
- Kang, H. J., Ko, M. J., and Chung, M. S. 2021. Anthocyanin structure and pH dependent extraction characteristics from blueberries (*Vaccinium corymbosum*) and chokeberries (*Aronia melanocarpa*) in Subcritical Water State. *Foods*. 10 : 527.
- Kazuma, K., Kogawa, K., Noda, N., Kato, N., and Suzuki, M. 2004. Identification of delphinidin 3-O-(6-O-malonyl)-beta-glucoside-3'-O-beta-glucoside, a postulated intermediate in the biosynthesis of ternatin C5 in the blue petals of *clitoria ternatea* L. (butterfly pea). *Chemistry and biodiversity*. 1: 1762–1770.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., and Lim, S. M. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*. 61 : 1361779.
- Kogawa, K., Kazuma, K., Kato, N., Noda, N., and Suzuki, M. 2007a. Biosynthesis of malonylated flavonoid glycosides on the basis of malonyltransferase activity in the petals of *clitoria ternatea* L.. *Journal of Plant Physiology*. 164: 886–894.
- Kogawa, K., Kato, N., Kazuma, K., Noda, N., and Suzuki, M. 2007b. Purification and characterization of UDP-glucose: anthocyanin 3O,5O-glucosyltransferase from *clitoria ternatea* L.. *Planta*. 226: 1501–1509.
- Liu, S., Fu, Y., and Nian, S. 2014. Buffering colour fluctuation of purple sweet potato anthocyanins to acidity variation by surfactants. *Food Chemistry*. 162 : 16–21.

- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R. E., Marcelis, L. F. M., Visser, R. G. F., and Bovy, A. 2018. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables. A review. *Frontiers in Chemistry*. 6 : 52.
- Loypimai, P., Moongngarm, A., and Chottanom, P. 2016. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. *Journal of Food Science and Technology*. 53 : 461–470.
- Lu, C., Li, Y., Cui, Y., Ren, J., Qi, F., Qu, J., et al. 2021. Isolation and functional analysis of genes involved in polyacylated anthocyanin biosynthesis in blue senecio cruentus. *Frontiers in Plant Science*. 12: 640746.
- Marpaung, A. M., Andarwulan, N., Hariyadi, P., and Faridah, D. N. 2017. The colour degradation of anthocyanin-rich extract from butterfly pea (*clitoria ternatea* L.) petal in various solvents at pH 7. *Natural Product Research*. 31 : 2273–2280.
- Marpaung, A. M., Andarwulan, N., Hariyadi, P., and Faridah, D. N. 2019. The difference in colour shifting of *clitoria ternatea* L. flower extract at pH 1, 4, and 7 during storage. *Current Nutrition and Food Science*. 15 : 694–699.
- Marsin, A. M., Jusoh, Y. M. M., Abang, D. N., Zaidel, Z. H., Yusof, A. H. M., and Muhamad, I. I. 2020. Microwave-assisted encapsulation of blue pea flower (*Clitoria ternatea* L.) colourant: maltodextrin concentration, power and time. *Chemical Engineering*. 78 : 199–204.
- Matsufuji, H., Kido, H., Misawa, H., Yaguchi, J., Otsuki, T., Chino, M., et al. 2007. Stability to light, heat, and hydrogen peroxide at different pH values and DPPH radical scavenging activity of acylated anthocyanins from red radish extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 : 3692–3701.

Peng, J., Xue, C., Dong, X., Zeng, C., Wu, Y., and Cao, F. 2021. Gene cloning and analysis of the pattern of expression of the transcription factor *HymMYB2* related to

- blue flower formation in *hydrangea macrophylla*. *Euphytica*. 217: 115.
- Pham, T. N., Nguyen, D. C., Lam, T. D., Van Thinh, P., Le, X. T., Nguyen, D. V. V., et al. 2019. "Extraction of anthocyanins from butterfly pea (*clitoria ternatea* L. flowers) in Southern Vietnam: response surface modeling for optimization of the operation conditions". IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. (Vol. 542, No. 1, p. 012032). IOP Publishing.
- Qi, H., Zhang, G., Chu, Z., Liu, C., and Yuan, S. 2022. Identification of seven key structural genes in the anthocyanin biosynthesis pathway in sepals of *hydrangea macrophylla*. *Current Issues in Molecular Biology*. 44(9) : 4167-4180.
- Rocha, R., Pinela, J., Abreu, R. M. V., Añibarro-Ortega, M., Pires, T. C. S. P., Saldanha, A. L., et al. 2020. Extraction of anthocyanins from red raspberry for natural food colorants development: processes optimization and in vitro bioactivity. *Processes*. 8 : 1447.
- Shen, Y., Ardoin, R., Osorio, L. F., Cardona, J., López Prado, A. S., Osorio, L. F., et al. 2019. Effects of different solvents on total phenolic and total anthocyanin contents of *clitoria ternatea* L. petal and their anti-cholesteroloxidation capabilities. *International Journal of Food Science and Technology*. 54 : 424431.
- Saptarini, N. M., and Suryasaputra, D. 2018. Total anthocyanins content in various extract of butterfly pea (*Clitoria ternatea* linn) flower. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*. 9: 185–188.
- Tanaka, Y., Brugliera, F., and Chandler, S. 2009. Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*. 10: 5350–5369.

- Togami, J., Tamura, M., Ishiguro, K., Hirose, C., Okuhara, H., Ueyama, Y., et al. 2006. Molecular characterization of the flavonoid biosynthesis of *verbena hybrida* and the functional analysis of *verbena* and *clitoria ternatea* L. F3'5'H genes in transgenic *verbena*. *Plant Biotechnology*. 23 : 5–11.
- Zhao, X., Yuan, Z., Feng, L., and Fang, Y. 2015. Cloning and expression of anthocyanin biosynthetic genes in red and white pomegranate. *Journal of Plant Research*. 128 : 687-696.

ธนพร พิมพ์อุบล. 2560. Gene Expression. [Online].

เข้าถึงได้จาก: <https://www.classstart.org/classes/14649>

(สืบค้นเมื่อวันที่ 4 พฤษภาคม 2566)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



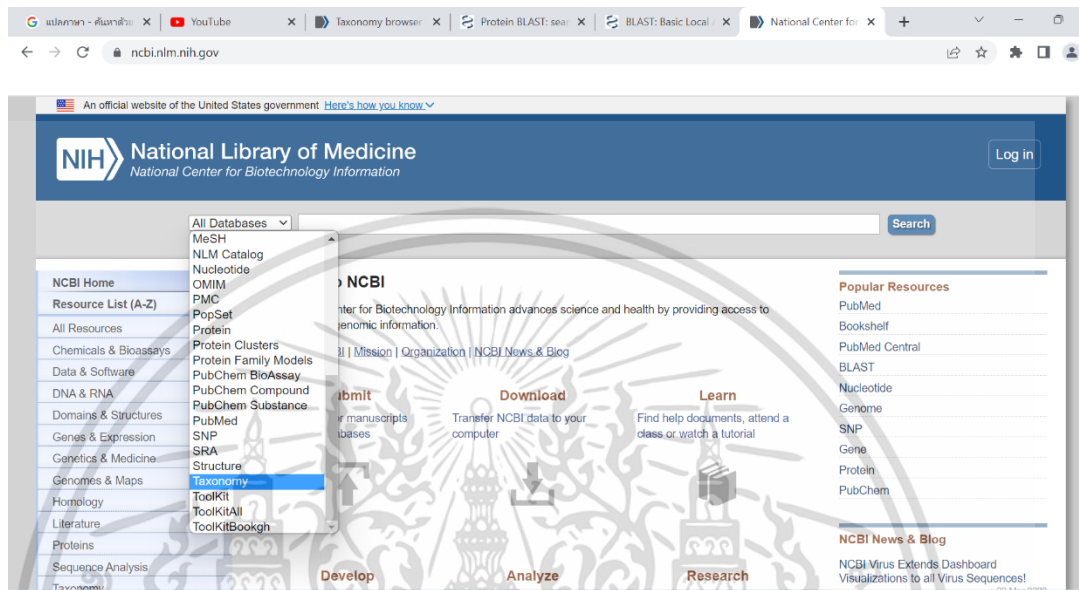
ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

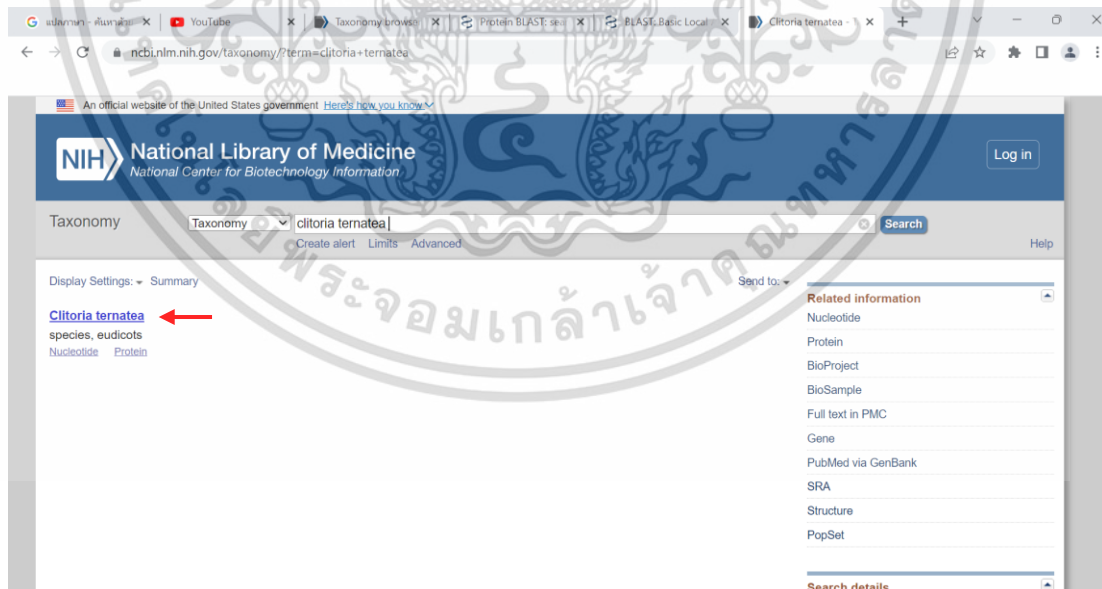
1. วิธีการออกแบบไพรเมอร์ที่ไม่มีในฐานข้อมูล

1.1 ค้นหาลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ของพืชชนิดอื่นที่ใกล้เคียงหลาย ๆ ชนิด ซึ่งจะใช้ฐานข้อมูล NCBI

กดเลือก Taxonomy จากนั้น พิมพ์ค้นหา “Clitoria ternatea” แล้วกด Search



เมื่อกด Search เสร็จจะขึ้นหน้าดังนี้ ให้คลิกไปที่ Clitoria ternatea



1.2 เมื่อกดคลิกที่ Clitoria ternatea แล้ว ให้กดคำว่า Clitoria (ที่วงกลมสีแดงไว้)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=43366

NCBI Taxonomy Browser

Search for [] as complete name [] lock Go Clear

Display 3 levels using filter: none

Clitoria ternatea

Taxonomy ID: 43366 (for references in articles please use NCBI:txid:43366)

— current name

Clitoria ternatea L., 1753

NCBI BLAST name: eudicots

Rank: species

Genetic code: Translation table 1 (Standard)

Mitochondrial genetic code: Translation table 1 (Standard)

Plastid genetic code: Translation table 11 (Bacterial, Archaeal and Plant Plastid)

Lineage (full)

cellular organisms; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Mesangiospermae; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; fabids; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; 50 kb inversion clade; NPAAA clade; indigoferoid/milletioid clade; Phaseoleae; **Clitoria** | genus

Entrez records	
Database name	Direct links
Nucleotide	351
Protein	527
Structure	13
Genome	1
Popset	17
PubMed Central	451
Gene	129
SRA Experiments	31
Identical Protein Groups	410
BioProject	1
BioSample	20
Taxonomy	1

Comments and References:

TROPICOS (Jul 24, 2020)

Name accessed in TROPICOS.org, Missouri Botanical Garden 24 July 2020: <http://www.tropicos.org> © 2020 Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=43366&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

และเมื่อคลิกแล้วจะขึ้นหน้าต่างที่มีพืชสีเขียวอื่นที่คล้ายกับอันที่ขึ้นมาตามลิงก์นี้

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=163735&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

1.3 จากนั้นให้คลิกไปที่ Glycine max

ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=163735&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

- Glycine lactovirens
- Glycine latifolia
- Glycine latrobeana
- Glycine microphylla
- Glycine peratosa
- Glycine pindanica
- Glycine pullenii
- Glycine rubiginosa
- Glycine stenophita
- Glycine syndetika
- Glycine tabacina
- Glycine aff. tabacina
- Glycine tomentella
- o unclassified Glycine
- o Glycine subgen. Soja
 - Glycine max (soybean)
 - Glycine max
 - o Glycine soja | species
- o Harashuteria
 - Harashuteria hirsuta
- o Hardenbergia
 - Hardenbergia comptoniana
 - Hardenbergia violacea
- o Haymondia
 - Haymondia wallichii
- o Helicotropis
 - Helicotropis linearis
 - Helicotropis linearis var. linearis
 - [Vigna] linearis var. latifolia
 - Helicotropis spectabilis

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3847&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

1.7 หากลำดับกรดอะมิโนของพืชสีเขียวอื่น ที่ใกล้เคียงกัน โดยกลับไปหน้าเว็บ NCBI อีกครั้ง แล้วคลิกที่ Protein จากนั้นค้นหาว่า F3H glycine max แล้วกด Search

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ncbi.nlm.nih.gov

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

All Databases

- MeSH
- NLM Catalog
- Nucleotide
- OMIM
- PMC
- PopSet
- Protein**
 - Protein Clusters
 - Protein Family Models
 - PubChem BioAssay
 - PubChem Compound
 - PubChem Substance
 - PubMed
 - SNP
 - SRA
 - Structure
 - Taxonomy
 - ToolKit
 - ToolKitAll
 - ToolKitBooksh

NCBI Home

Resource List (A-Z)

All Resources

Chemicals & Bioassays

Data & Software

DNA & RNA

Domains & Structures

Genes & Expression

Genetics & Medicine

Genomes & Maps

Homology

Literature

Proteins

Sequence Analysis

Taxonomy

NCBI

Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to genomic information.

Mission | Organization | NCBI News & Blog

Submit

Download

Learn

Develop

Analyze

Research

Popular Resources

- PubMed
- Bookshelf
- PubMed Central
- BLAST
- Nucleotide
- Genome
- SNP
- Gene
- Protein
- PubChem

NCBI News & Blog

NCBI Virus Extends Dashboard Visualizations to all Virus Sequences!

33°C

18:09 30/3/2566

จากนั้นคลิกที่อันแรกตามลูกศร

ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=F3H+glycine+max

Custom range...

Clear all

Show additional filters

RefSeq Sequences

Items: 1 to 20 of 27

1. [flavanone 3-hydroxylase \(Glycine max\)](#)

375 aa protein

Accession: NP_001236797.1 GI: 351724903

BioProject Nucleotide PubMed Taxonomy

GenPept Identical Proteins FASTA Graphics

2. [flavanone 3-hydroxylase isoform X1 \(Glycine max\)](#)

370 aa protein

Accession: XP_040662589.1 GI: 2027450584

BioProject Nucleotide Taxonomy

GenPept Identical Proteins FASTA Graphics

3. [flavanone 3-hydroxylase \(Glycine max\)](#)

375 aa protein

Accession: ACA81458.1 GI: 169793533

Nucleotide Taxonomy

GenPept Identical Proteins FASTA Graphics

Recent activity

- F3H glycine max (27)
- clitoria ternatea (1)

Page 1 of 2

18:13 30/3/2566

1.8 จะวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้เลือกไปก่อนหน้านี้ โดยใช้ Run Blast

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Protein: Advanced Help

GenPept

flavanone 3-hydroxylase [Glycine max]
 NCBI Reference Sequence: NP_001236797.1
 Identical Proteins FASTA Graphics

Go to:

LOCUS NP_001236797 375 aa linear PLN Find regions of similarity between this sequence and other sequences using BLAST.

DEFINITION flavanone 3-hydroxylase [Glycine max].
 ACCESSION NP_001236797
 VERSION NP_001236797.1
 DBSOURCE REFSEQ: accession [NM_001249868.3](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Glycine max (soybean)
 ORGANISM Glycine_max
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Proteales; order: Fabales; Fabaceae; Phaseolidae; Glycine

Articles about the F3H gene
 Accumulation of flavonols in response to violet-B irradiation in soybean (Mol Cells. 2008)

Protein BLAST: search protein database

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&QUERY=NP_001236797.1&LINK_LOC=protein&PAGE=...

NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information

BLAST® » blastp suite Home Recent Results Saved Strategies Help

blastn blastp blastx tblastn tblastx Standard Protein BLAST

BLASTP programs search protein databases using a protein query, more...

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

From To

Or, upload file No file chosen

Job Title

Align two or more sequences

Choose Search Set

1.9 เมื่อคลิก BLAST แล้ว จะปรากฏลำดับกรดอะมิโนของพืชfamilyเดียวกันกับ *Clitoria ternatea* จากนั้นคัดลอกพืชที่คล้ายมากที่สุดมาประมาณ 6 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NCBI Blastref[NP_001236797.1] x +

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

select all 100 sequences selected GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine max]	Glycine max	782	782	100%	0.0	100.00%	375	NP_001236797.1
<input checked="" type="checkbox"/> hypothetical protein GYH30_003035 [Glycine max]	Glycine max	781	781	100%	0.0	99.73%	375	KAH1058767.1
<input checked="" type="checkbox"/> hypothetical protein JHK87_003047 [Glycine soja]	Glycine soja	778	778	100%	0.0	99.73%	375	KAG5050849.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine soja]	Glycine soja	775	775	100%	0.0	99.20%	375	ACA81455.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine max]	Glycine max	772	772	100%	0.0	98.93%	375	ACA81454.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine soja]	Glycine soja	771	771	100%	0.0	98.67%	375	ACA81441.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine soja]	Glycine soja	771	771	100%	0.0	98.40%	375	ACA81440.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine soja]	Glycine soja	770	770	100%	0.0	98.40%	375	ACA81458.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase isoform X1 [Glycine max]	Glycine max	766	766	100%	0.0	98.67%	370	XP_040862589.1
<input checked="" type="checkbox"/> hypothetical protein GYH30_003035 [Glycine max]	Glycine max	764	764	100%	0.0	98.40%	370	KAH1058766.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine max]	Glycine max	764	764	100%	0.0	97.87%	375	ACA81453.1
<input checked="" type="checkbox"/> hypothetical protein JHK87_003048 [Glycine soja]	Glycine soja	764	764	100%	0.0	97.87%	376	KAG5050850.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine soja]	Glycine soja	763	763	100%	0.0	97.60%	375	ACA81443.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine soja]	Glycine soja	761	761	100%	0.0	97.60%	375	ACA81452.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine max]	Glycine max	761	761	100%	0.0	97.60%	375	ACA81430.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine soja]	Glycine soja	759	759	100%	0.0	97.33%	375	ACA81448.1
<input checked="" type="checkbox"/> flavanone 3-hydroxylase [Glycine soja]	Glycine soja	750	750	100%	0.0	97.33%	375	ACA81434.1

1.10 จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนไปหาลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีนในพืชชนิดอื่นที่คัดเลือกได้ แล้วนำลำดับเบสที่หาได้นำมาเทียบกันเพื่อหาบริเวณที่อนุรักษ์ด้วยโปรแกรม Clustal Omega

NCBI Blastref[NP_001236797.1] x Clustal Omega < Multiple Sequen... x Google x +

ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/

Clustal Omega

Input form Web services Help & Documentation Bioinformatics Tools FAQ Feedback

Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega

Service Announcement

The new Job Dispatcher Services beta website is now available at <https://www.dev.ebi.ac.uk/Tools/dispatcher>. We'd love to hear your [feedback](#) about the new webpages!

Multiple Sequence Alignment

Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between **three or more** sequences. For the alignment of two sequences please instead use our pairwise sequence alignment tools.

Important note: This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter up to 4000 sequences

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.11 จากนั้นเมื่อออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณที่อนุรักษ์แล้ว นำลำดับเบสที่คัดเลือกไปตรวจสอบว่ามีค่า GC content เหมาะสมไหม โดยใช้โปรแกรม Oligo Calc ให้นำลำดับเบสไพรเมอร์ที่ออกแบบมาใส่ในช่อง Nucleotide base code → ให้คลิกที่ Calculate → ให้ดูที่ค่า Melting Temperature (TM) Calculations ในช่องที่2

The screenshot shows the Oligo Calc web interface. The main input field is for the nucleotide sequence. Below it, there are options for 'Reverse Complement Strand (5' to 3') is:' and 'Select molecule' (ssDNA). There are also checkboxes for '5' modification' and '3' modification', and a dropdown for 'Select molecule' (ssDNA). Below these are buttons for 'Calculate', 'Swap Strands', 'BLAST', and 'mfold'. The 'Physical Constants' section includes fields for Length (0), Molecular Weight, GC content (4%), and Melting Temperature (TM) Calculations (1, 2, 3). The 'Thermodynamic Constants' section includes fields for RlnK, deltaH, deltaG, and deltaS.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่.....8.....เดือน.....มิถุนายน.....พ.ศ...2566.....

ข้าพเจ้า นางสาว ธิดารัตน์ อินทโมรี รหัสประจำตัว 62050501
นางสาว พ็ซอร์ เจริญก้านบัวกาง รหัสประจำตัว 62050520

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง
ชื่อภาษาไทย การโคลนยีนในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน
ชื่อภาษาอังกฤษ Cloning of anthocyanin-biosynthesis genes from butterfly pea flowers
ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์.....2.79.....% หรือโปรแกรม Turnitin.....%

ลงชื่อ.....**พ็ซอร์**.....

(น.ส.พ็ซอร์ เจริญก้านบัวกาง)

นักศึกษา

ลงชื่อ.....**ธิดารัตน์**.....

(น.ส.ธิดารัตน์ อินทโมรี)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้วขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับนำไปใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ลงชื่อ.....**ชช**.....ลงชื่อ.....ลงชื่อ.....
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ลึกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม