

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาผลชักนำให้เพิ่มการสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในพืชตัดแปลง
พันธุกรรมและฤทธิ์ทางเภสัชเวช

A study of the light sources effecting on the induction of flavonoid biosynthesis in
transgenic tobaccos and their pharmaceutical activities

นางสาวกนกพร สมพรไพสิน

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556-7

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาผลชักนำให้เพิ่มการสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในพืชตัดแปลง
พันธุกรรมและฤทธิ์ทางเภสัชเวช

A study of the light sources effecting on the induction of flavonoid biosynthesis in
transgenic tobaccos and their pharmaceutical activities

นางสาวกนกพร สมพรไพฑิณ

12696481

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556-7

วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การศึกษาผลชักนำให้เพิ่มการสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในพืชตัดแปลงพันธุกรรมและ
ฤทธิ์ทางเภสัชเวช

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556-57

กนกพร สมพรไพฑูริย์ วิทยาลัยนาโนเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง สถาบันเทคโนโลยีพระจอม
เกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์จาก cDNA ของอะราบิโดปซิส และนำไปใช้
สำหรับการสร้างเวกเตอร์ที่สามารถแสดงออกได้โดยอะโกรแบคทีเรียม นำเวกเตอร์นี้ไปถ่ายโอนเข้าสู่อะ
โกรแบคทีเรียม อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ที่ได้ นำไปทำให้เซลล์พืชติดเชื้อ เซลล์พืชนี้นำมาชักนำให้เกิด
เป็นต้นใหม่บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานาไมซิน ภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำการคัดเลือกต้นพืชที่
ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะคานาไมซิน และนำมาวิเคราะห์ต้นพืชที่มีอินแทรกโนมโดยใช้วิธีการ PCR แต่
ละสายพันธุ์พืชที่คัดเลือกได้ นำไปขยายพันธุ์และใช้สำหรับการทดสอบการสร้างสารฟลาโวนอยด์
เปรียบเทียบกับต้นปกติ ภายใต้ระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารสกัดจากใบของพืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีอินแทรก
สังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดจากใบของพืชปกติเพียงเล็กน้อย รังสียูวี
สามารถกระตุ้นซึ่งสังเคราะห์สารของทั้ง พืชปกติ และพืชตัดต่อพันธุกรรม อย่างไรก็ตามพืชตัดต่อ
พันธุกรรมสามารถตอบสนองต่อรังสียูวี ได้ดีและผลิตสารฟลาโวนอยด์ได้สูงกว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์
ในใบมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระซึ่งตรวจสอบโดยวิธี ABTS และ DPPH สารสกัดจาก
ใบพืชตัดต่อพันธุกรรมในวิธีการที่ได้รับรังสียูวีนั้นส่งผลให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และกิจกรรม
การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น สารสกัดจากดอกพืชตัดต่อพันธุกรรมและพืชปกติ มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูง
กว่าสารสกัดจากใบหลายเท่า แต่ปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากดอกไม่มีความสัมพันธ์ โดยตรงกับ
กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ : ฟลาโวนอยด์, สารต้านอนุมูลอิสระ, ABTS, DPPH, ยูวี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: A study of the light sources effecting on the induction of flavonoid biosynthesis in transgenic tobaccos and their pharmaceutical activities

Researcher: Kanokporn Sompornpailin

College of Nanotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

Gene involved in flavonoid biosynthesis was cloned from Arabidopsis cDNA and constructed into Agrobacterium expression vector. This vector was transformed into Agrobacterium. This Agrobacterium was used for infecting tobacco leaf cells. Tobacco cells were regenerating on kanamycin resistance medium under tissue culture condition. Plantlets resisted to kanamycin antibiotic were selected and analyzed for inserting gene using PCR method. Each line of selected plant was propagated and used for detecting flavonoid substances in comparing to wild type plant under tissue culture condition. The leaf extracts of transgenic tobaccos containing flavonoid biosynthetic gene have slightly higher flavonoid content than that of wild type. UV radiation could stimulate biosynthesis of both wild type and transgenic plants. However, transgenic plant was a high response to UV radiation and produced more flavonoid substances. The flavonoid content in the leaf extract was related to antioxidant activities which were examined by using ABTS and DPPH methods. The leaf extract of transgenic treated with UV radiation effected an enhancement of the level of total flavonoid content and antioxidant activities. The flower extract of transgenic and wild type plant had flavonoid content higher several folds than the leaf extract, but the flower flavonoid content was not directly related with antioxidant activities.

Keywords : flavonoids, antioxidant, ABTS, DPPH, UV

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากงบประมาณแผ่นดินประจำปี งบประมาณ 2556-57 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยได้รับการประเมินข้อเสนอจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ผู้วิจัยขอขอบคุณอย่างสูงไว้ในที่นี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของหน่วยงานและสถาบัน ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานวิจัย สำเร็จได้ด้วยดี

กนกพร สมพรไพฑิณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	IV
สารบัญ.....	V
สารบัญรูป.....	VI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	11
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปราย.....	16
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....	24
บทที่ 5 บรรณานุกรม.....	25
งานวิจัยที่แนะนำให้เสนอ.....	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



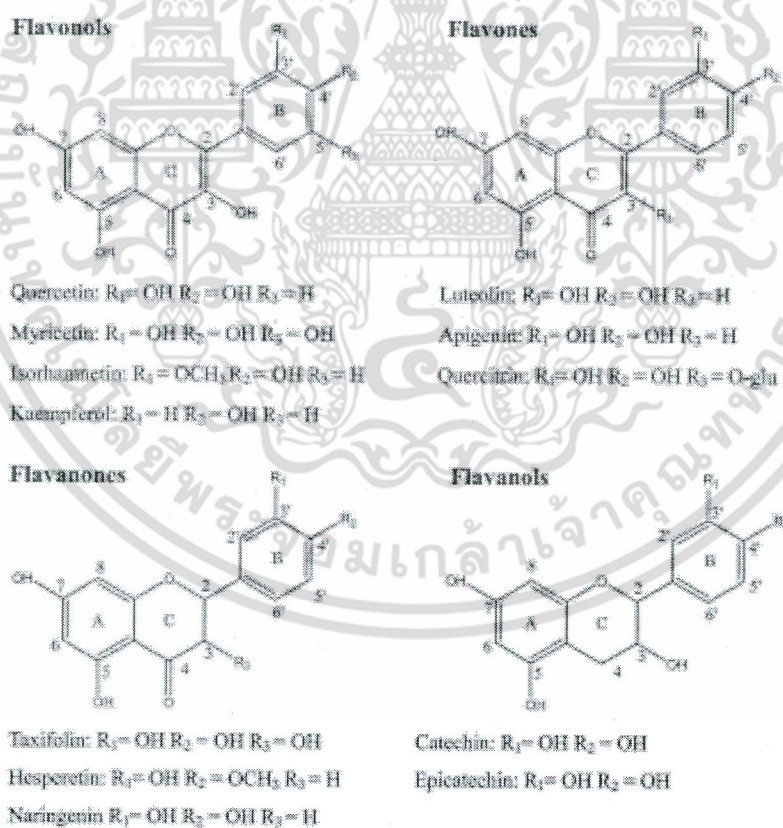
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

สารฟลโวนอยด์

สารฟลโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิกลุ่มพอลิฟีนอลที่พบได้ในพืชทั่วไป เป็นสารจำพวกเม็ดสีจากธรรมชาติที่พบได้ในพืชทั่วไป และเกือบทุกส่วนในต้นพืช พบการสะสมมากในบริเวณแควิวอด ในธรรมชาติมักพบในรูปของไกลโคไซด์ พบได้ในปริมาณต่ำ สารกลุ่มฟลโวนอยด์ ในธรรมชาติมีหลายชนิด แบ่งตามระดับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและหมู่ฟังก์ชันของวง C (รูปที่ 1.1) แต่ละชนิดทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป พืชแต่ละชนิดสะสมฟลโวนอยด์ กลุ่มย่อยได้แตกต่างกันออกไป



รูปที่ 1.1 โครงสร้างพื้นฐานของฟลโวนอยด์และสารกลุ่มย่อยที่สำคัญ

ที่มา Oki และคณะ 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารกลุ่มเฟลโวนอยด์สังเคราะห์ได้จากการเปลี่ยนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) เป็น คูมาริลโคเอ (coumaroyl-coenzyme A) สารคูมาโลลิตโคเอ (*p*-coumaroyl-CoA) 1 โมเลกุลรวมกับมาโลนิลโคเอ (malonyl-CoA) 3 โมเลกุล โดยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ทำให้เกิดการรวมตัวกันเป็น เป็นสารเตตระไฮดรอกซีซาลโคน (tetrahydroxychalcone) ที่มีคาร์บอน 15 อะตอม สามารถเปลี่ยนไปเป็นสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ได้หลายชนิด สารกลุ่มเฟลโวนอยด์ประกอบด้วยวงอะโรมาติก (aromatic ring) 2 วง คือวง A และ B ที่เชื่อมต่อกันด้วย เฮเทอโรไซเคิล (heterocycle) คือ วง C วง C สารกลุ่มเฟลโวนอยด์สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและถูกจำแนกเป็นกลุ่มย่อย เช่น เฟลโวน (flavone) เฟลวานอน (flavanone) เฟลวานอล (flavanol) และแอนโทไซยานิน (anthocyanin)

การเปลี่ยนแปลงของหมู่ย่อยภายในโครงสร้างหลักโดยการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น hydroxylation glycosylation acylation และ methylation มีผลทำให้สารกลุ่มนี้มีโครงสร้างที่หลากหลาย และจะส่งผลต่อหน้าที่ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน (Sompornpailin 2002)

อนุพันธ์ของสารกลุ่มเฟลโวนอยด์

1) แซลโคน (chalcone) และออโรน (aurone)

สารนี้มีโครงสร้างที่วง C แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ แซลโคนให้สีเหลืองเข้ม ได้แก่ สีของดอกโครีออพซิส (Coreopsis) และดอกไม้อื่นๆ ในวงศ์ Asteraceae (Andersen และ Markham, 2006) ส่วนสารออโรนพบในดอก ใบ เปลือก และเนื้อไม้ให้สีเหลืองทอง เช่น ซัลฟูเรทิน (sulfuretin)

2) เฟลโวน (flavones)

พบเฟลโวนในส่วนของเปลือกต้น แก่น ผล และ ราก ของพืชพวกขนุน (Artocarpus) และ หม่อน (Morus) พืชที่อยู่ในวงศ์ Moraceae ให้สีเหลืองอ่อนถึงแก่ สารในกลุ่มนี้ที่พบมากคือ อะพิจินิน (apigenin) และ ลูทีโอลิน (luteolin)

3) เฟลวานอล (flavanols)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสารที่ไม่มีสี สามารถดูดกลืนรังสีช่วงยูวีซี เป็นช่วงคลื่นที่แมลงสามารถมองเห็นได้ ดังนั้นเพลวโนอลจึงมีบทบาทสำคัญในการล่อแมลงเพื่อการผสมเกสร มีความสำคัญต่อพืชชั้นสูง เพลวโนอลที่พบมาก ได้แก่ เคเอ็มฟีรอล (kaempferol) และ เควอร์เซติน (quercetin) และ ไมริเซติน (myricetin)

4) แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

แอนโทไซยานิน เป็นสารกลุ่มเม็ดสีที่สะสมอยู่ในแวคิลโฮลของเนื้อเยื่อดอก และใบของพืช สารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสารส่งสัญญาณของวิธีการถ่ายทอดสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อแสงยูวี-บี การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีรายงานถึงการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่าง เมื่อพืชถูกเชื้อโรครบกวน

หน้าที่ของสารเพลวโนอยด์

พืชสร้างสารกลุ่มนี้ขึ้นเพื่อใช้สำหรับการเจริญและพัฒนาของพืช ทำหน้าที่ที่หลากหลายได้แก่ รับแสง ล่อแมลง ปกป้องพืชจากโรคแมลง และสภาวะกดดันต่างๆ สารนี้ยังทำหน้าที่เป็นสัญญาณโมเลกุลภายในเซลล์ เกี่ยวข้องกับ การเคลื่อนย้าย ออกซิน การสืบพันธุ์ของเกสรตัวผู้

สารเพลวโนอยด์ มีรายงานถึงคุณสมบัติที่สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ (Pietta 2000) โดยยับยั้งปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชัน (peroxidation) และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ในการทำลายชั้นไขมันในผนังเซลล์ (Procházková และคณะ 2011) สารเพลวโนอยด์ยังมีคุณสมบัติในการจับกับธาตุที่เป็นโลหะ ซึ่งน่าจะมีผลต้านการกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระของ โลหะธาตุ นอกเหนือจากฤทธิ์การต้านทานต่ออนุมูลอิสระ สารเพลวโนอยด์ยังเป็นสารที่ไวต่อแสง และมีส่วนช่วยในการควบคุมการรูปร่าง การเจริญและพัฒนาของพืช สารกลุ่มเพลวโนอยด์ สามารถดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน รวมทั้งรังสียูวีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต สารกลุ่มเพลวโนอยด์ และ อนุพันธ์ที่มี กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid) เป็นองค์ประกอบสามารถดูดซับรังสียูวีได้ดี จึงมีรายงานถึงการใส่สารกลุ่มนี้ในเครื่องสำอางค์เพื่อปกป้องผิวจากรังสียูวี (Chan และคณะ 2010, Fischer และคณะ 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากคุณสมบัตินี้เฟลโวนอยด์จึงมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชเวชอย่างกว้างขวาง และพบว่ามีฤทธิ์ในการรักษาโรคที่มีอาการเรื้อรังต่างๆ โรคเบาหวาน ภาวะอ้วนที่เกิดจากการสะสมของไขมัน ออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ต้านไวรัส และมีช่วยในการขยายหลอดเลือด

ชีวสังเคราะห์สารเฟลโวนอยด์

การผลิตสารในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ประกอบด้วยโปรตีน 2 กลุ่มคือ

1. โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นตัวกลางและผลผลิต

เอนไซม์ ในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ พบได้ในส่วนที่ละลายน้ำ โดยทั่วไปพบว่าเอนไซม์หลายชนิดเหล่านี้คาดว่าอยู่รวมกันเป็นกลุ่มจับกับเอ็นโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum) แบบหลวมๆ และทำหน้าที่ส่งต่อสับเซตรทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง

เอนไซม์ สำคัญในการสร้างสารกลุ่มย่อยต่างๆ ในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ที่สำคัญ (รูปที่ 1.2) ได้แก่ ยีน *PAL* ซึ่งให้สารตั้งต้นสำหรับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ยีน *CHS* (Wasson และคณะ 2006) ซึ่งให้เอนไซม์แคลโคเนซินเทส (chalcone synthase) ที่ทำหน้าที่นำสารมาโลนิวโคเอ (malonyl-CoA) และสารคูมาโลอิวโคเอ (*p*-coumaroyl-CoA) เข้าสู่ชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์

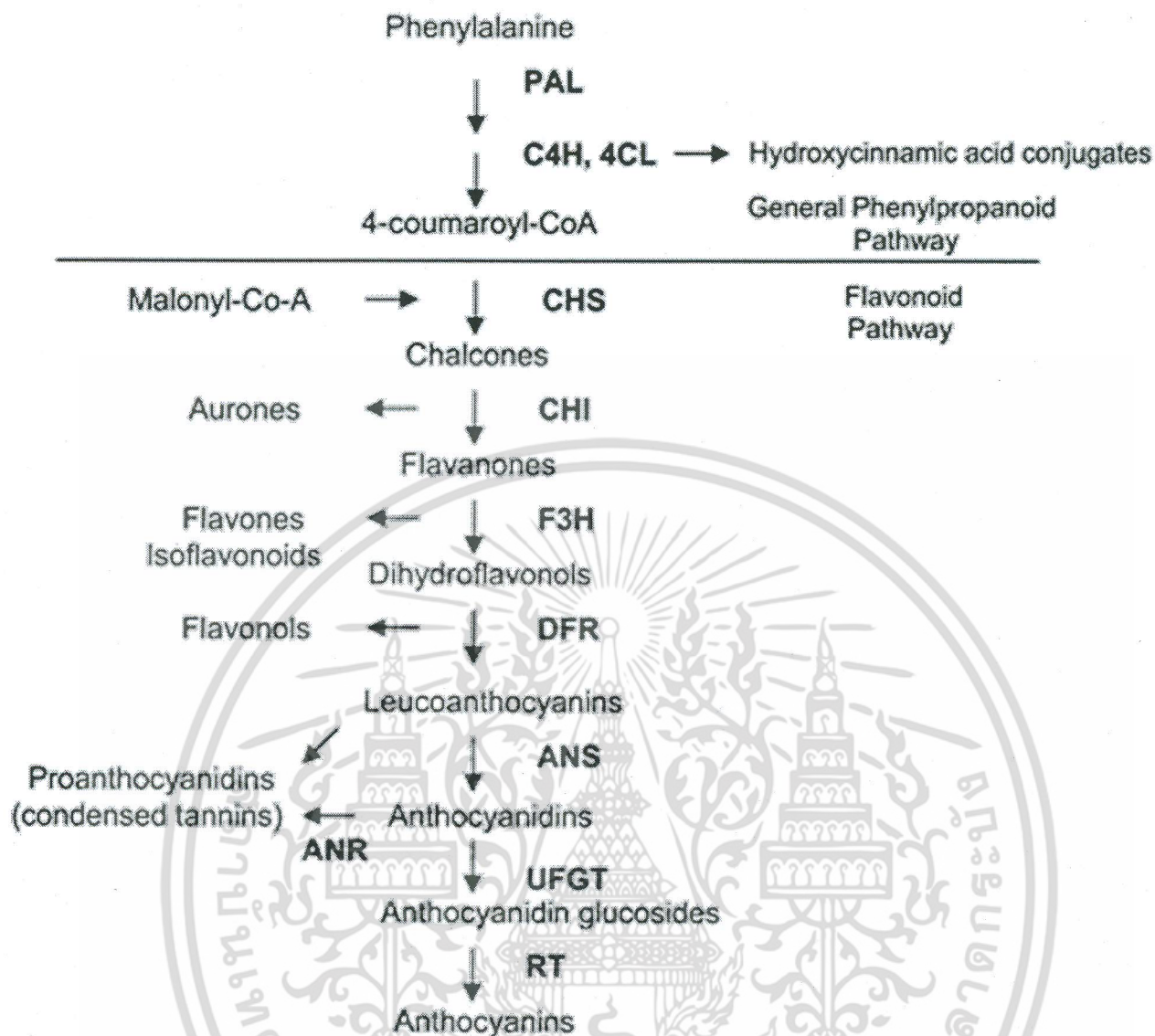
ยีน *DFR* ซึ่งให้เอนไซม์ไดไฮโดรเฟลโวนอล-4-รีดักเทส (dihydroflavonol-4-reductase) ซึ่งกระตุ้นปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของสารไดไฮโดรเฟลโวนอล (dihydroflavonols) ไปเป็นลิวโคแอนโทไซยานิดิน (leucoanthocyanidins) โดยใช้ NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) สารลิวโคแอนโทไซยานิดินนี้เป็นสารตัวกลางของสารที่ให้เม็ดสีในพืชกลุ่มแอนโทไซยานิน และยังเป็นสารตัวกลางของสารคาเทชิน (catechins) และแทนนิน (tannin) ซึ่งมีส่วนสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านทานอนุมูลอิสระ

ยีน *FLS* ให้เอนไซม์เฟลโวนอลซินเทส (flavonol synthase) ซึ่งให้สารกลุ่มเฟลโวนอลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญมากในกลุ่มเฟลโวนอยด์ (Winkel-Shirley, 2002)

2. โปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์

โปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในพืช ได้แก่ ยีนกลุ่ม bHLH และ MYB พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการสะสมสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ได้เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.2 ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มฟีนอลิก, PAL, Phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, 4-coumaroyl:CoA ligase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; UFGT, UDP Glc-flavonoid 3-O-glucosyl transferase; RT, rhamnosyl transferase.

ที่มา Jaakola และคณะ 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

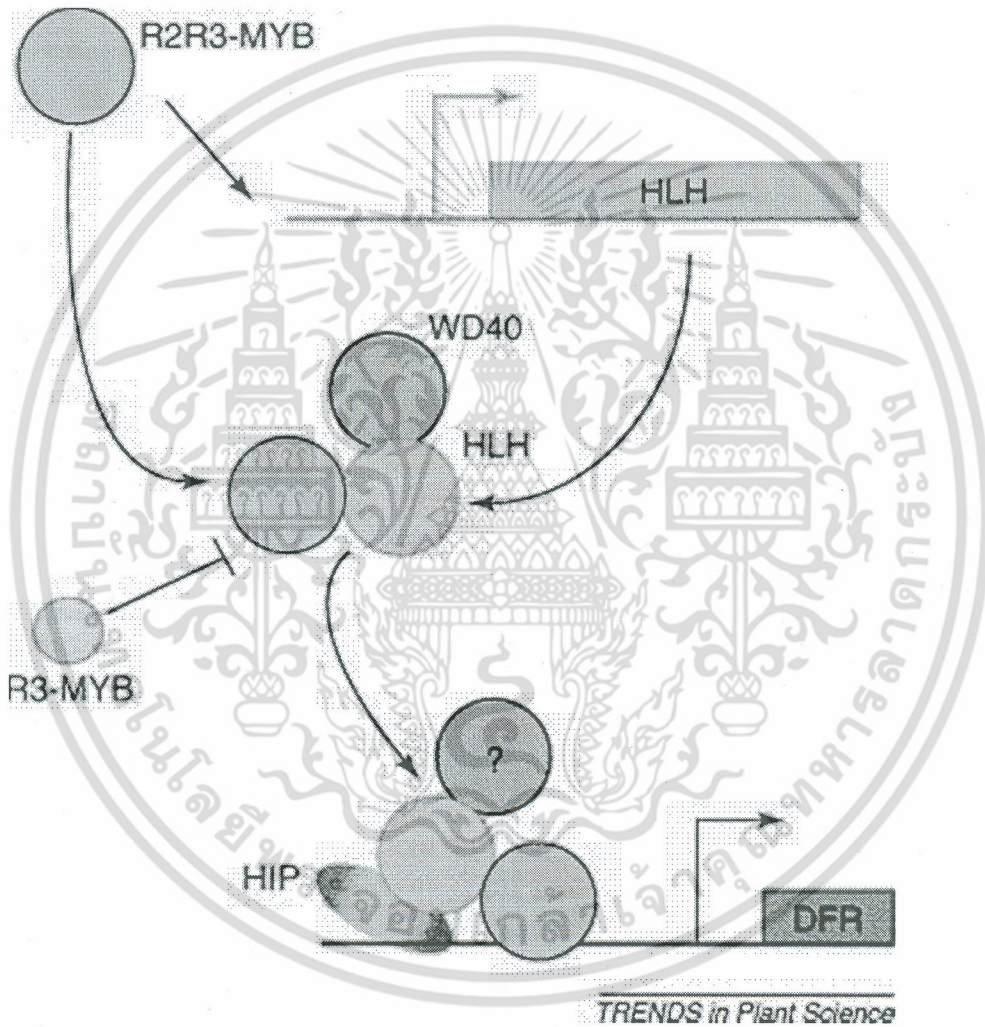
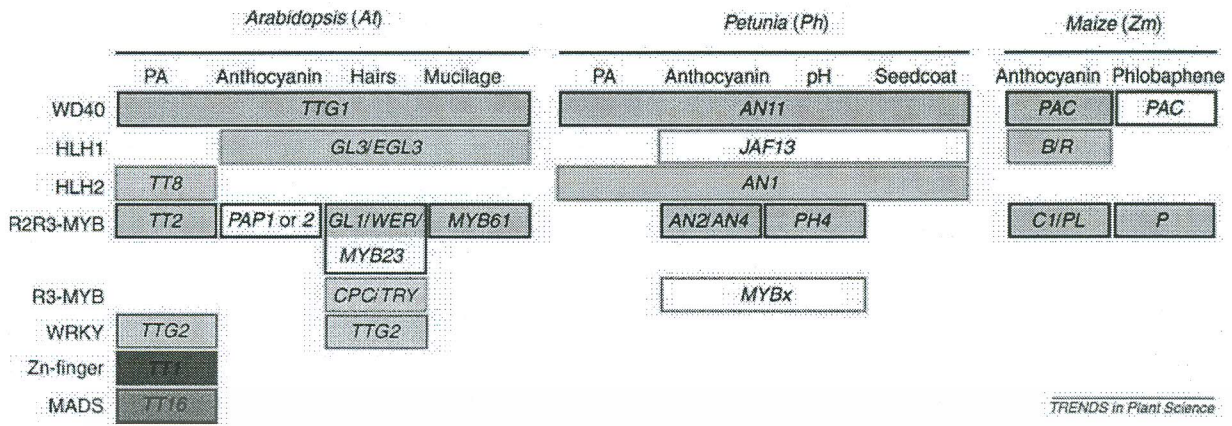
ยีนควบคุมการสังเคราะห์สารฟลโวนอยด์

สิ่งแวดล้อมควบคุมการแสดงออกของยีนที่ให้เอนไซม์ ในชีวสังเคราะห์ฟลโวนอยด์ ในอราบิดอปซิส พืหนุย และข้าวโพด ผ่านการทำงานของโปรตีนควบคุม (regulatory protein) หลายชนิด ดังแสดงในรูปที่ 1.3 ยีนควบคุมเหล่านี้มีโครงสร้างที่สามารถจับกับโปรโมเตอร์ของยีน โครงสร้างของโปรตีนควบคุมมีกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณนอร์ักษ์ ซึ่งใช้จัดกลุ่ม โปรตีนควบคุมกลุ่มสำคัญ (รูปที่ 1.4) ได้แก่

โปรตีนโดเมน WD repeat มีโครงสร้างกรดอะมิโนแบบสั้น ๆ ประมาณ 40 กรดอะมิโน บริเวณปลายสายมักประกอบด้วย tryptophan-aspartic acid (WD) dipeptide มีโดเมนซ้ำๆ ประกอบกันเป็นวงกลม

โปรตีนโดเมน MYB ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนปลาย N ทำหน้าที่จับกับ ดีเอ็นเอ ส่วนกลางเป็นบริเวณที่กระตุ้นการถอดรหัส และปลาย C ยับยั้งการถอดรหัส โปรตีน MYB ที่พบในพืชมีโดเมนแบบ R2R3-MYB (Stracke คณะ 2001)

โปรตีนโดเมน bHLH ประกอบด้วย α -helices 2 สายเชื่อมต่อกันด้วย loop แต่ละเฮลิคซ์ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็นเบส ทำให้สะดวกต่อการจับดีเอ็นเอ ปรกติแล้วเฮลิคซ์หนึ่งมีขนาดเล็กกว่าอีกอันหนึ่ง เฮลิคซ์ขนาดใหญ่สามารถจับกับดีเอ็นเอได้ โปรตีนโดเมน bHLH สามารถจับกับโปรโมเตอร์บริเวณ E-box ที่มีบริเวณนอร์ักษ์ CANNTG (Massari และ Murre 2000)



รูปที่ 1.3 ยีนที่ให้โปรตีนควบคุมสังเคราะห์เม็ดสี ในอราบิดอปซิส พิทูเนีย และข้าวโพด ซึ่งสามารถจัดกลุ่มตามโครงสร้างโปรตีน ในแท่งแสดงชื่อยีนที่ถอดและแปลรหัสให้โปรตีน และการควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

ที่มา Koes และคณะ 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของโปรตีนควมคุม ที่มีโดเมน WD repeat, MYB และ bHLH ตามลำดับ

ที่มา <http://en.wikipedia.org/wiki/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสะสมสารเฟลโวนอยด์ในพืช

การตรวจสอบ ผลผลิตจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์นั้น นิยมตรวจสอบการสะสมของแอนโทไซยานินเป็นสารสีซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย โดยเฉพาะที่บริเวณแวคิวโอลของเซลล์ชั้นเอพิเดอร์มิส ในปัจจุบันพบว่ามียาหลายปัจจัย ที่มีผลต่อการสะสมสารเฟลโวนอยด์ในพืช ได้แก่

1) แรงดันออสโมติก (osmotic pressure)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหลายๆชนิด พบว่าการสะสมของแอนโทไซยานินเกิดขึ้น เนื่องจากสภาวะเครียดทางออสโมติก (osmotic pressure) โดยการชักนำของน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแมนนิทอล (Cormier และคณะ 1989, Tholakalabavi และคณะ 1997)

พบสะสมสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นในใบพืชอะราบิดอปซิส เมื่อเลี้ยงในอาหารที่น้ำตาลชนิดต่างๆ (Mita และคณะ 1997) และในรากข้าวโพดที่ขึ้นบริเวณดินที่มีความเค็มสูง (Raliamoorthy และ Rao. 1994) การสะสมของแอนโทไซยานินในใบของต้น *Monis alba* เมื่อเจริญในสภาพที่มีความเค็ม (Ramanjulu และคณะ 1993)

2) แสง (light)

แสงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตสารเฟลโวนอยด์ ดังนั้นการวิจัยส่วนใหญ่จึงมุ่งศึกษาถึงการชักนำด้วยแสง (Lois และ Buchanan, 1994) โดยศึกษาแสงที่ความยาวคลื่นในช่วงอัลตราไวโอเล็ต หรือช่วงที่มองเห็นได้ และช่วง far-red นอกจากนี้ความเข้มแสง ยังส่งผลต่อการเพิ่มหรือลดการผลิตสารกลุ่มเฟลโวนอยด์ อีกด้วย

การควบคุมการสังเคราะห์สารเฟลโวนอยด์

การควบคุมการสังเคราะห์สารเฟลโวนอยด์ในพืชมีหลายแนวทาง ทั้งในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ โดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการเลี้ยงเซลล์พืชในระบบการให้อาหารแบบต่อเนื่อง การกลายพันธุ์ เซลล์พืชโดยใช้กลไกทางกายภาพและเคมี แต่ในปัจจุบันพบว่าการผลิตด้วยเทคนิคยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากสารเฟลโวนอยด์จัดเป็นสารกลุ่มทุติยภูมิ การควบคุมการผลิตนั้นต้องการหลายปัจจัยทำงานร่วม แบบเครือข่าย (network) ดังนั้นการศึกษาปัจจัยในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนจึง มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสำคัญต่อการกำหนดทิศทางการสังเคราะห์ชนิดและปริมาณสาร อย่างจำเพาะมากกว่าการกลายพันธุ์แบบสุ่ม

แม้ว่ามีรายงานถึงหลายปัจจัยที่มีผลกระตุ้น ทั้งสภาวะกดดันจากสภาพแวดล้อมและจากโรคแมลงศัตรูพืช แสง อุณหภูมิ เป็นต้น (Dixon และ Nancy, 1995, Mo และคณะ 1992, Vander Meer และคณะ 1992) แต่ในปัจจุบันพบว่า ปัจจัยเกี่ยวกับกลับมีผลการรายงานในทิศทางตรงกันข้าม

เนื่องจากสารกลุ่มฟเลโวนอยด์มีความสำคัญ ในการลดความรุนแรงจากสภาวะเครียดทั้งจากสิ่งที่มีและไม่มีชีวิตแล้ว ยังพบว่ามีส่วนช่วยให้พืชปรับตัวเป็นปรกติได้รวดเร็วขึ้นหลังจากที่ได้รับสภาวะเครียดแล้ว (Gould 2004) ดังนั้นเมื่อพืชปรับสภาวะได้อย่างเหมาะสมแล้ว การผลิตสารจึงลดต่ำลง

ในปัจจุบัน นิยมศึกษาถึงการทำงานของโปรตีนควบคุม ที่มีหน้าที่สำคัญคือ เป็นโปรตีนที่มีบริเวณจับกับดีเอ็นเอหรือโปรตีน (DNA or protein binding domain) และมีผลในการกระตุ้นหรือยับยั้งให้เกิดการถอดรหัส (DNA activation domain) ของยีนที่ให้เอนไซม์ ในอะราบิโดปซิส พืชเนย และ ข้าวโพด (Koes และคณะ 2005) การตัดต่อพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับแต่ละลักษณะ จะส่งผลกระทบต่อลักษณะที่ต้องการมากกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (Umezawa และคณะ 2006) ดังนั้นการตัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ฟเลโวนอยด์ จึงนำไปสู่แนวทางการเพิ่มสารที่ตรงต่อความต้องการ และรองรับการผลิตทางการผลิตสารออกฤทธิ์ทางเภสัชเวชได้อย่างเหมาะสม

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุชีวภาพ

1. ต้นยาสูบ *Nicotina tobaccum*
2. เชื้อ *Eschericia coil*
3. เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*
4. cDNA *Arabidopsis Thaliana*

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนโคลนยีน
2. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ
3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ
4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดและปริมาณสาร
5. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ

อุปกรณ์ที่ใช้

1. ประเภทเครื่องแก้ว ชนิดต่างๆ ได้แก่ ปีกเกอร์ ปีเปต ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จานเพาะเชื้อ

ขวดวัดปริมาตร กระจกตวง คิวเวท

2. เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ได้แก่

- ไมโครปีเปตและทิปขนาดต่างๆ
- เครื่องชั่งสารไฟฟ้าแบบหยาบและแบบละเอียด
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้เย็น
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- เตาอบความร้อน (hot air oven)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vertex mixer)
- เครื่องเขย่า (shaker)
- ตู้บ่ม (incubator)
- เครื่องพีซีอาร์
- อุปกรณ์ทำอิเล็กโตรโฟรีซิส
- อุปกรณ์ถ่ายภาพและวิเคราะห์ห่อะกาโรสเจล
- ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการทดลอง

1. การโคลนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

การทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโคลนยีนแต่ละชนิด เพื่อใช้สำหรับเพิ่มปริมาณยีนชนิดที่ต้องการ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับใช้เพิ่มปริมาณยีนถอดและแปลรหัสให้ เอนไซม์และโปรตีนควบคุม ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ ซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (cDNA) 10xTaq buffer, แมกนีเซียมคลอไรด์, dNTP, ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์และรีเวิร์สไพรเมอร์ของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนแต่ละชนิด, เอนไซม์ Taq DNA polymerase ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองของยีนแต่ละชนิด

นำส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจล อะกาโรส และทำให้บริสุทธิ์

2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในแบคทีเรีย

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์ เข้ากับเวกเตอร์ pGEM (Promega) โดยใช้เทคนิค T-A cloning และทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสม เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ โดยวิธีการ heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณของยีนที่ต้องการในเซลล์เจ้าบ้าน (host) ได้แก่ เซลล์ของแบคทีเรีย E.coli และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิด ซึ่งมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรก โดยการคัดเลือกในอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal สเปรดสารแขวนลอยเซลล์ที่ทำกรถ่ายโอนพลาสมิดลงบนเพลทดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการสกัด พลาสมิดจากเซลล์ที่คัดเลือกและทำการตรวจสอบต่อไป

3. การตรวจสอบยีนแต่เชื่อมต่อกับ *Agrobacterium* expression vector

ตรวจสอบชนิดของยีน โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ตามชนิดของยีนที่ต้องการพิสูจน์ แล้วจึงนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และการหาลำดับดีเอ็นเอ นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้ว เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBI121 โดยวิธีการ heat-shock

4. ขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชทดสอบและชักนำให้เกิดต้น

ถ่ายโอนพลาสมิดที่มีส่วนของยีนที่ต้องการแทรกอยู่ เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมเพื่อใช้สำหรับถ่ายโอนเข้าสู่พืชครั้งนี้คือ ตัดใบพืชทดสอบที่ปราศจากเชื้อ แช่ลงในเซลล์แขวนลอยของอะโกรแบคทีเรียม นำใบยาสูบวางบนอาหารแข็งสูตร MS มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชักนำให้เกิดแคลลัส บ่มใต้แสงไฟ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ย้ายใบพืชลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก และยาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลินที่ฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เลี้ยงเนื้อเยื่อจนเกิดเป็นแคลลัส แล้วจึงย้ายลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดยอดที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลิน และยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือกเลี้ยงจนแคลลัสเกิดเป็นยอด คัดเลือกยอดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนย้ายลงอาหารแข็ง MS สูตรปกติที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก

5. การเพิ่มจำนวนต้น

นำต้นพืชทั้งต้นปกติและต้นดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายโอนยีนที่ต้องการแล้ว นำมาตัดยอดและนำไปเลี้ยงในอาหาร MS เพื่อเพิ่มจำนวน ในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

6. การศึกษาการผลิตสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในพืชตัดต่อพันธุกรรม

นำต้นพืชปกติและต้นพืชดัดแปลงพันธุกรรมมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มการผลิตปริมาณสาร และทำการตรวจสอบผลสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ตามวิธีของ Harborne 1998 โดยทำการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยบดใบพืชสดและสกัดด้วยเมทานอลที่มีกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะตัวของสารฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่มด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นประมาณ 300-560 นาโนเมตร

7. การสกัดสารทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตัวอย่างพืชมาสกัดด้วยสารละลาย 2 ชนิด คือ น้ำปราศจากไอออน และกรดไฮโดรคลอริก 1% ในเมทานอล เขย่าสารสกัด และ เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสในสภาพมีด้ามแช่เย็น นำตัวอย่างมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และปั่นเหวี่ยงที่ 7000g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ปราศจากตะกอนไปใส่ในหลอดใหม่ นำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้งภายใต้ความดันต่ำ เพื่อกำจัดสารละลายส่วนเกิน นำไปละลายกลับในสารละลายชนิดเดิม (Ok และคณะ 2002) นำสารสกัดจากสารละลายทั้งสองชนิดของตัวอย่างที่แตกต่างกัน มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

- เทคนิค DPPH (Brand-Williom และคณะ 1995)

สารสกัดฟลาโวนอยด์ 10 ไมโครลิตร เติมนลงในสารละลายผสม ABTS 1 มิลลิลิตรนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน (Trolox)

- เทคนิค ABTS (Landrault และคณะ 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดเฟลโวนอยด์ นำไปผสมสารละลาย DPPH และการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm. เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสกัด เมื่อนำมาคำนวณร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การโคลนยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

การทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ โคลนยีนแต่ละชนิดในจีวสังเคราะห์ เฟลโว นอยด์ จากข้อมูล Genbank ได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ยีนควบคุม 2 คู่ ดังนี้

P1_F : ATG GAG GGT TCG TCC AAA P1_R : CTA ATC AAG TTC AAC AGT

T2_F : ATG GAT GAA TCA AGT ATT T2_R : CTA TAG ATT AGA TCA TGT

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ยีน โครงสร้าง 2 คู่ ดังนี้

P3_F : ATG GAT CAA ATC GAA CAA TGT P3_R : TTA GCA AAT CGG AAT CGG AGC

C4_F : ATG GTG ATG GCT GGT GCT TCT C4_R : TTA GAG AGG AAC GCT GTG CAA

ใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวสำหรับ การหาเงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองของยีนแต่ละชนิด นำส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจล อะกาโรส และทำให้บริสุทธิ์

2. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในแบคทีเรีย

การเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยการใช้เทคนิคพีซีอาร์ เข้ากับเวกเตอร์ โดยใช้เทคนิค T-A cloning และทำการถ่ายโอนดีเอ็นเอลูกผสม เข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ โดยวิธีการ heat-shock เพื่อเพิ่มปริมาณของยีนที่ต้องการในเซลล์เจ้าบ้าน (host) ได้แก่ เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับ พลาสมิด โดยในขณะนี้ทำการโคลนยีนสำเร็จแล้ว 4 โคลน อยู่ในระหว่างการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคลนยีนที่เหลือ และ ทำการพิสูจน์ โคลนที่ได้ แล้ว 2 โคลน นำ อีก 2 โคลน โดยส่งไปตรวจสอบลำดับ นิวคลีโอไทด์ อีก 2 โคลนที่พิสูจน์แล้ว เพื่อนำไปใช้โคลนยีนเข้าสู่ *Agrobacterium expression vector*

3. การตรวจสอบยีนแต่เชื่อมต่อกับ *Agrobacterium expression vector*

นิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว 2 โคลน นำไปใช้โคลนยีนเข้าสู่ *Agrobacterium expression vector* โดยเชื่อมต่อกับ เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBI121 ทำการตรวจสอบทิศทางการแทรกของยีนในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ถ่ายโอนเวกเตอร์นี้เข้าสู่ *Agrobacterium* โดยวิธีการ heat-shock

4. ขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชทดสอบและชักนำให้เกิดต้น

ถ่ายโอนพลาสมิดที่มีส่วนของยีนที่ต้องการแทรกอยู่ เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียที่เตรียมเพื่อใช้สำหรับถ่ายโอนเข้าสู่พืชครั้งนี้คือ ตัดใบพืชทดสอบที่ปราศจากเชื้อ แฉ่งลงในเซลล์แขวนลอยของอะโกรแบคทีเรีย นำใบยาสูบวางบนอาหารแข็งสูตร MS มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ย้ายใบพืชลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก เลี้ยงเนื้อเยื่อจนเกิดเป็นแคลลัสแล้วจึงย้ายลงในอาหารแข็ง MS สูตรชักนำให้เกิดยอด คัดเลือกยอดที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนย้ายลงอาหารแข็ง MS สูตรปกติที่มียาปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก ได้ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแล้วบางส่วน สำหรับการเพิ่มจำนวนต้นในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

5. การตรวจสอบพืชที่ได้รับยีนและการเพิ่มจำนวนต้น

พืชคัดแปลงพันธุกรรมแต่ละโคลน ที่ได้รับการคัดเลือกนำมาทดสอบว่ามียีนในชีวิตสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ โดยนำพืชดังกล่าวมาสกัด DNA นำ DNA ที่ได้มาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนที่แทรกอยู่ด้วยเทคนิค PCR (รูปที่ 3.1) นำต้นที่ได้รับการตรวจสอบแล้ว มาทำการเพิ่มจำนวนต้นในเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อใช้ในการศึกษาการสะสมสารเฟลโวนอยด์ในแต่ละโคลน เปรียบเทียบกับ ต้นพืชปกติ

W T1 T2 T3 T4 T5 T6 M T7 T8 T9 T10 T11 T13



รูปที่ 3.1 แสดงผลการตรวจสอบแทรกของยีนในจีโนมของพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนด้วยเทคนิค PCR

W = wild type

T = transgenic

M = marker

6. การตรวจสอบปริมาณสาร

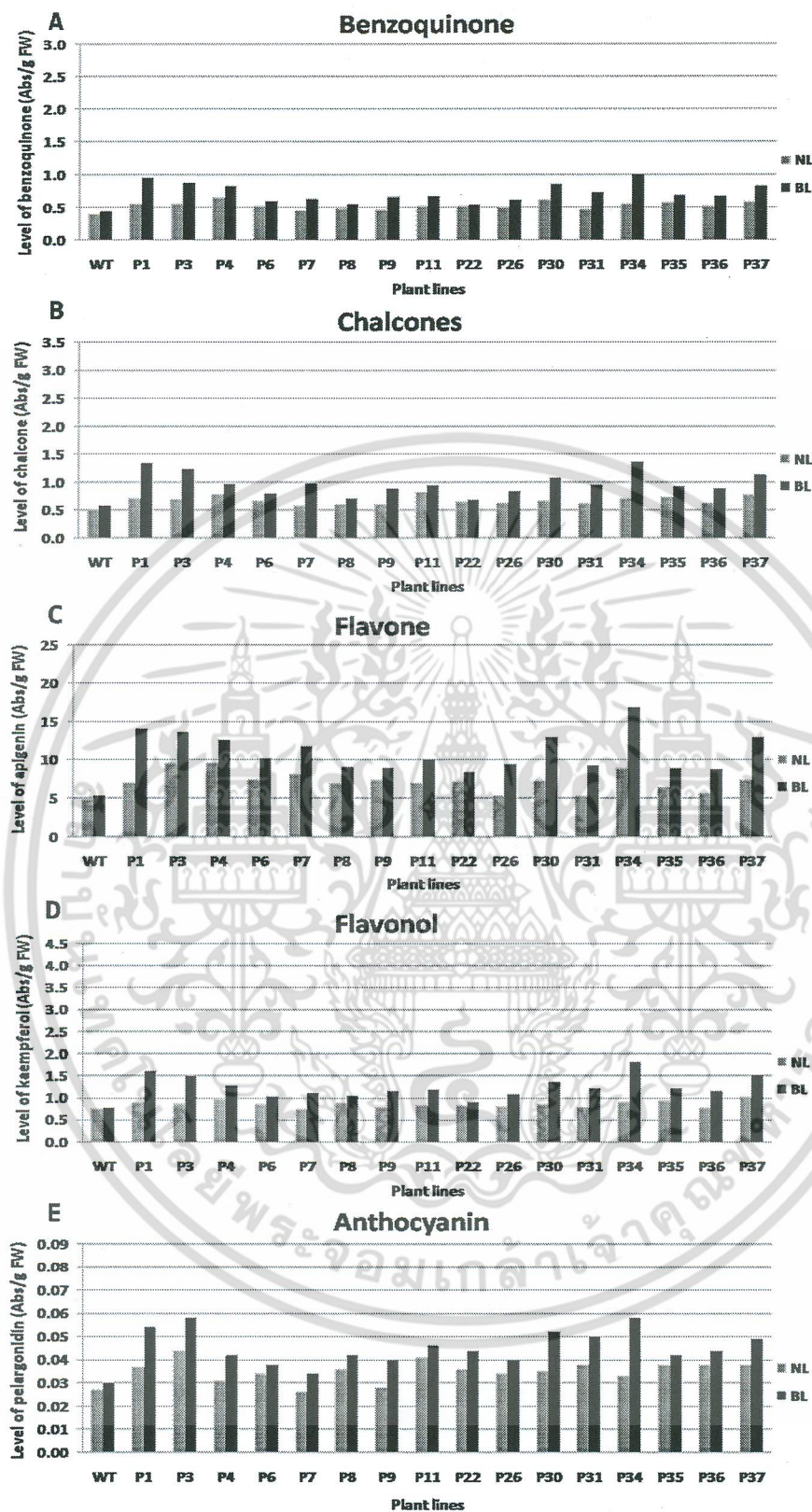
เมื่อทำการเพิ่มจำนวนต้นของพืชที่มียีนแทรกในแต่ละโคลนแล้ว นำแต่ละโคลนมาเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำแต่ละโคลนมาตรวจสอบการผลิตสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ภายใต้สภาวะแสงปกติ และ สภาวะกักกัน ด้วยแสงยูวี ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.2

จากการทดสอบภายใต้แสงปกติ (NL) เมื่อนำไปสกัดสารกลุ่มฟเลโวนอยด์และตรวจสอบปริมาณสาร พบว่าพืชตัดต่อพันธุกรรมยีนกลุ่ม MYB ส่วนใหญ่มีการผลิตสารกลุ่มฟเลโวนอยด์ แตกต่างจาก ต้นพืชปกติ เพียงเล็กน้อย ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า ในขณะที่บางสายพันธุ์ของพืชตัดต่อพันธุกรรมไม่มีความแตกต่าง พันธุ์ที่ไม่ได้ตัดต่อพันธุกรรม

แสงจากหลอดยูวี (BL) สามารถกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์สารฟเลโวนอยด์เพิ่มมากขึ้น ทั้งในพืชปกติ (ชุดควบคุม) และพืชตัดแปลงพันธุกรรม แต่ในพืชตัดแปลงพันธุกรรมมีการตอบสนอง ต่อแสงยูวีได้ดีกว่า

ในการทดลองนี้จึงได้ ทำการคัดเลือกต้นพืชตัดต่อพันธุกรรมที่มีคุณลักษณะพิเศษทั้งในด้านการผลิตสารและคุณลักษณะอื่นที่คาดว่าเป็นผลการทำงานของยีน เพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ทั้งการนำออกปลูกในสิ่งแวดล้อมภายนอกและการตรวจสอบฤทธิ์ต้านทานต่ออนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

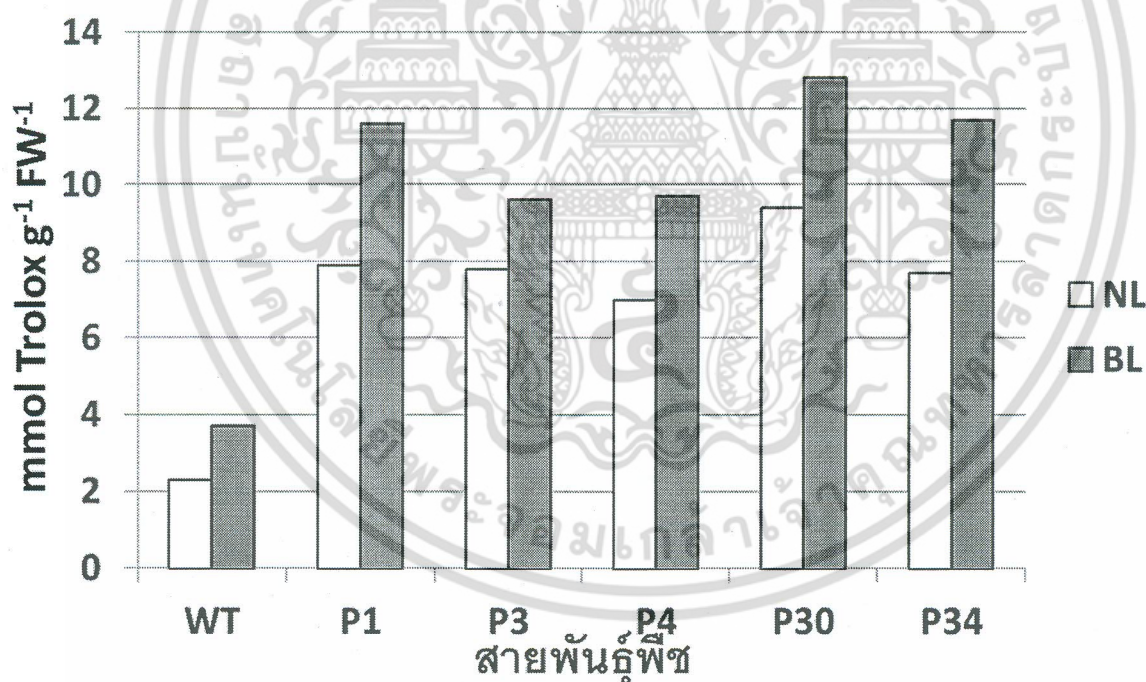


รูปที่ 3.2 แสดงระดับของสารฟลโวนอยด์ในต้นพืชตัดต่อพันธุกรรมที่มียีนกลุ่ม MYB ภายใต้การปลูกในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ NL หมายถึงระบบที่มีการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ BL หมายถึงระบบที่มีการให้แสงจากหลอดยูวี เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

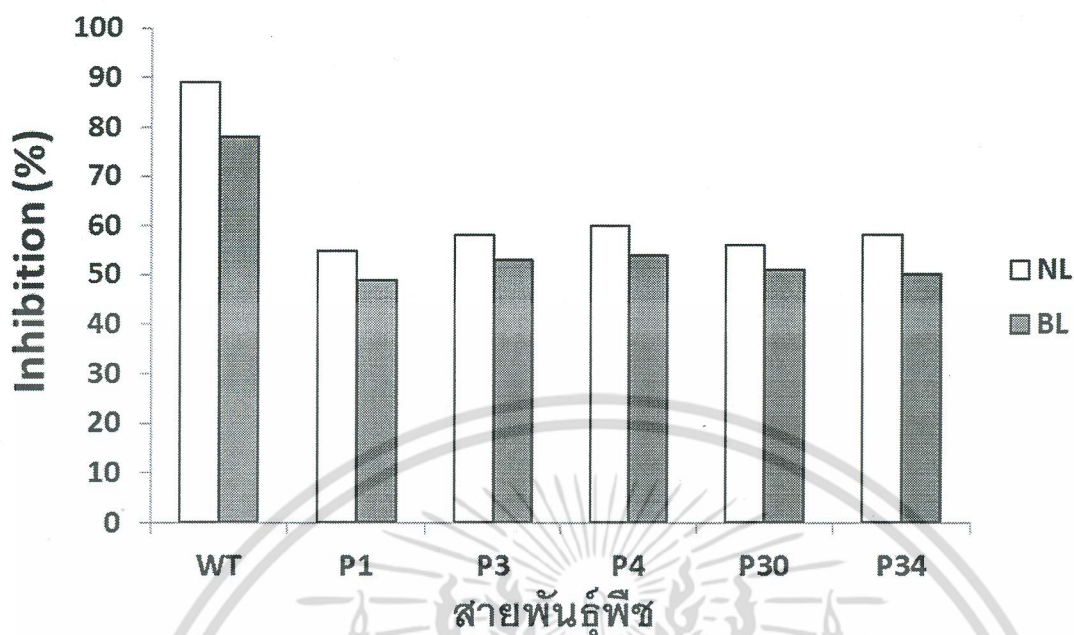
7. การสกัดสารทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อทำการคัดเลือกต้นตัดต่อพันธุกรรมที่ มีการผลิตสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงนำไปเพิ่มจำนวน โคลนในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนำพืชแต่ละโคลนมาใช้สำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชเวช ในการต้านทานอนุมูลอิสระ โดยการนำพืชแต่ละโคลนมาใช้สำหรับการทดสอบการผลิตสารตอบสนองต่อรังสียูวีที่ความเข้มแสงที่เหมาะสม และนำพืชมาสกัดด้วยสารละลายผสม ของ น้ำปราศจากไอออน และกรดไฮโดรคลอริก 1% ในเมทานอล และนำสารสกัดที่ได้ไป ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เทคนิค ABTS และ DPPH เปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้ตัดต่อพันธุกรรม เทคนิค ABTS นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารตัวอย่าง ไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน (Trolox) ผลแสดงดังรูปที่ 3.3 และเทคนิค DPPH คำนวณร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชจากระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แสดงดังรูปที่ 3.4 และการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชจากโรงเรือนเพาะเลี้ยง แสดงดังรูปที่ 3.5

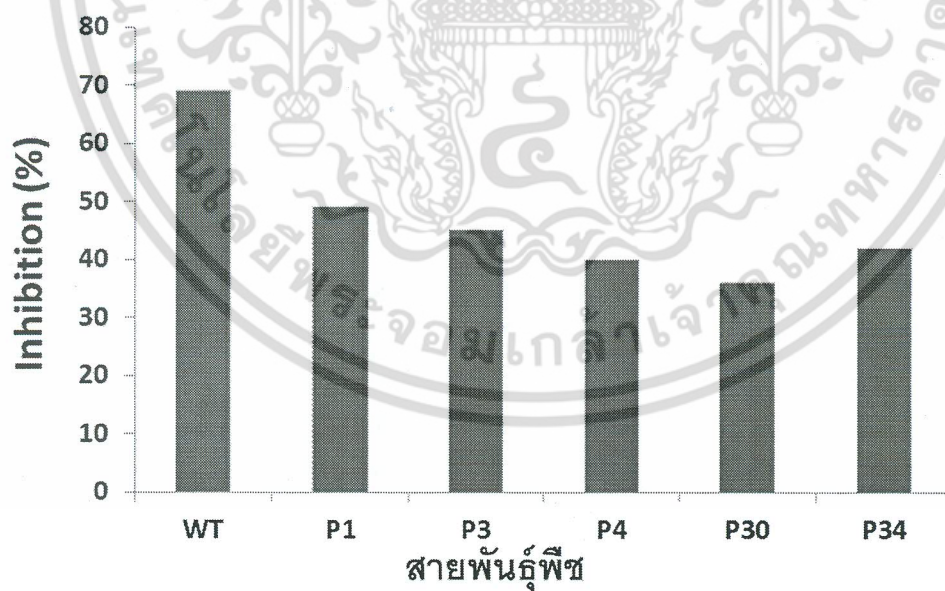


รูปที่ 3.3 การออกฤทธิ์การต้านทานอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิค ABTS ของสารสกัดใบต้นยาสูบจากระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox NL หมายถึงระบบที่มีการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ BL หมายถึงระบบที่มีการให้แสงจากหลอดยูวี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.4 การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยเทคนิค DPPH ของสารสกัดใบต้นยาสูบจากระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ NL หมายถึงระบบที่มีการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ BL หมายถึงระบบที่มีการให้แสงจากหลอดยูวี



รูปที่ 3.5 การออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยเทคนิค DPPH ของสารสกัดดอกของต้นยาสูบจากระบบการเพาะปลูกในโรงเรือน ที่มีการให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองพบว่า สารสกัดของพืชที่ตัดต่อพันธุกรรมสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน มีการสะสมสารฟเลโวนอยด์แตกต่างกันออกไป ในสถานะแสงปกติพืชที่ตัดต่อพันธุกรรมมีการสะสมสารในปริมาณสูงกว่า พืชปกติ (ชุดควบคุม) เพียงเล็กน้อย ในขณะที่บางสายพันธุ์มีการสะสมสารใกล้เคียงกับพืชปกติ

เมื่อพืชได้รับสถานะกอดัน พืชปกติและพืชตัดต่อพันธุกรรม มีการผลิตสารที่สูงขึ้นกว่าพืชในสถานะปกติ แต่พืชตัดต่อพันธุกรรมมีบางสายพันธุ์มีอัตราการเพิ่มของสารที่สูงกว่าหลายเท่า แสดงว่าการโคลนยีนเข้าสู่พืชเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการส่งผลให้สารแสดงออกเพียงพอต่อความต้องการสายพันธุ์ที่อาจต้องการสิ่งเร้าที่กระตุ้นในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งการทดลองนี้ผู้วิจัยได้คัดเลือกสิ่งเร้าที่พบว่าให้ผลในระดับดี จากงานวิจัยของกลุ่มผู้วิจัยเอง (Sompompailin และ Maneprasert 2004) ที่ได้ทำการทดสอบกับพืชปกติมาแล้ว มากระตุ้นพืชและพบว่าสารมีการสะสมสารกลุ่มฟเลโวนอยด์เพิ่มมากขึ้น จึงเป็นแนวทางที่ดีสำหรับเลือกเพื่อศึกษาต่อไป

จากผลการทดลองพบว่า ต้นตัดต่อพันธุกรรมที่มีการผลิตสารฟเลโวนอยด์ในปริมาณสูง มีแนวโน้มให้ฤทธิ์การต้านทานต่ออนุมูลอิสระทั้งใน เทคนิค ABTS และ DPPH ไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารฟเลโวนอยด์ในสารสกัดใบ

สารสกัดจากใบในระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชตัดต่อพันธุกรรม เมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ พบว่าพืชตัดต่อพันธุกรรมมีการสะสมสารสูงกว่า ในแสงทั้งสองระบบ ในระบบแสงยูวี ส่งผลต่อให้มีการกระตุ้นการสังเคราะห์และสะสมสารฟเลโวนอยด์ภายในต้น เพิ่มขึ้น แต่พืชที่มียีนควบคุมมีแนวโน้มตอบสนองต่อแสงยูวีได้ดีกว่า การศึกษาการออกฤทธิ์การต้านทานต่ออนุมูลอิสระในใบพืชนี้สอดคล้องกับปริมาณสารกลุ่มฟเลโวนอยด์แบบรวม

เนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน มีแนวโน้มการสะสมสารฟเลโวนอยด์ที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการเลือกเนื้อเยื่อสำหรับศึกษาการผลิตสารจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ ผู้วิจัยจึงทำงานเพิ่มเติมโดย นำพืชออกปลูกโรงเรือน นำดอกพืชที่ปลูกภายในโรงเรือน มาสกัดสาร เพื่อตรวจสอบ การสังเคราะห์และสะสมสารฟเลโวนอยด์ภายในดอก ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากดอกให้ปริมาณสารฟเลโวนอยด์หลายชนิด สูงกว่าภายในใบหลายเท่า (ไม่ได้แสดงผล) แต่สารสกัดจากดอกมีออกฤทธิ์ต้านทาน ต่ออนุมูลอิสระ ที่ดีกว่าใบพืชจากระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ไม่มากนัก คาดว่าเกิดเนื่องจาก สารฟเลโวนอยด์ในดอก อาจมีกลุ่ม

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยของสารเฟลโวนอยด์แตกต่างกัน ไม่สามารถตรวจสอบชนิดสารจำเพาะด้วยเทคนิคนี้ แต่เทคนิคนี้ทำให้ทราบรูปแบบและแนวโน้มของกลุ่มสารที่สร้างขึ้น นอกจากนี้ สารที่พืชสร้างขึ้นอาจทำหน้าที่ทำหน้าที่เป็นสัญญาณ ในวิถีอื่นๆ ภายในเซลล์

การใช้เทคนิคอื่นที่มีความจำเพาะในการตรวจสอบสาร จึงน่าจะเป็นแนวทางที่นำทำงานวิจัยต่อไป ตลอดจนถึงการหาชนิดโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์สารสารเฟลโวนอยด์และสิ่งเร้าที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถเลือกใช้เพื่อกำหนดทิศทางการผลิตสารสำหรับการใช้ทางเภสัชเวชได้ต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

สรุปผลโครงการวิจัย

ในการวิจัยนี้สามารถโคลนยีนในชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์สำเร็จ และได้ทำการการตัดต่อพันธุกรรมเข้าสู่พืชทดสอบคือยาสูบ และคัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ นำพืชที่มีพืชดังกล่าวไปตรวจสอบการแทรกของยีนด้วยเทคนิค PCR พืชที่ได้รับการตรวจสอบการแทรกของยีนแล้ว จึงนำเพิ่มจำนวนเพื่อทดสอบการสังเคราะห์สารเฟลโวนอยด์ จากผลการทดลองพบว่าพืชตัดต่อพันธุกรรมมีแนวโน้มให้การสังเคราะห์และสะสมสารเฟลโวนอยด์ที่สูงกว่าพืชปกติ แต่การใช้สิ่งเร้าแสงยูวีมีส่วนช่วยเพิ่มการสะสมสารเฟลโวนอยด์ในเนื้อเยื่อ ปริมาณสารเฟลโวนอยด์ที่สะสมในเนื้อเยื่อในปริมาณสูง มีแนวโน้มให้ฤทธิ์การต้านทานต่ออนุมูลอิสระทั้งใน เทคนิค ABTS และ DPPH ไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารเฟลโวนอยด์ในสารสกัดใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

บรรณานุกรม

- Brand-William, W., M., Cuelier and M. E., Berset, 1995. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 28: 25-30
- Chan CF, Lien CY, Lai YC, Huang CL, Liao WC. 2010 Influence of purple sweet potato extracts on the UV absorption properties of a cosmetic cream. *J Cosmet Sci.* 61(5): 333-341.
- Dixon, R. A. and Nancy, L. P. 1995 Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7,1085-1097.
- Fischer F, Zufferey E, Bourgeois JM, Héritier J, Micaux F. 2011 UV-ABC screens of luteolin derivatives compared to edelweiss extract. *J Photochem Photobiol B.* 4;103(1):8-15.
- Gould, K. S. 2004 Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *J Biomed Biotechnol.* 5, 314-320.
- Harborne, J.B.: *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.* London: Chapman & Hall, 1998.
- Jaakola L, Poole M, Jones MO, Kämäräinen-Karppinen T, Koskimäki JJ, Hohtola A, Häggman H, Fraser PD, Manning K, King GJ, Thomson H, Seymour GB. 2010 A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits. *Plant Physiol.* 153(4):1619-29.
- Koes R., Verweij W., Quattrocchio F. 2005 Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Sciences* 10:5, 236-242

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Landrault, N., P., Poucheret, P., Ravel, F., Gasc, G., Cros and P. L., Teissedre, 2001. Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3341-3348.
- Massari ME, Murre C. 2000. "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms". *Mol. Cell. Biol.* 20 (2): 429-40.
- Mo, Y., Nagel, C. and Taylor, L. P. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in function pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 7213-7217.
- Oki, T., M., Matsuda, M., Kobayashi, Y., Nishiba, S., Furuta and I., Suda, 2002. Polymeric Procyanidins as Radical-Scavenging Components in Red-Hulled Rice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:7524-7529.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000 Jul;63(7):1035-42.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. 2011 Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82 (4), 513-523.
- Sompornpailin, K. 2002. Anthocyanin Biosynthesis Effects on Plant Color Controlling. *J. KMITL.* 10.
- Sompornpailin, K. and Maneeprasert, R. 2004. Studies on Stress Conditions Affecting Flavonoid Biosynthesis in Plant Tissue via Tissue Culture Technique. *J. Science-Ladkrabang.* 13, 15-24.
- Stracke R., Werber M., Weisshaar B. 2001 The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*". *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (5): 447-56.
- Van der Meer, I. M., Stam, M. E., Van Tunen, A. J., Mol, J. N. M. and Stuitje, A. R. 1992. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell.* 4, 253-282.
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 113-122.

Wasson, A. P., Pellerone, F. I. and Mathesius, U. 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*. 18, 1617-1629.

Winkel-Shirley. 2002 Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 218-223.

Zipursky L., Berk A., Krieger M., James E D., Harvey F. L., Chris K., Scott M. P., Paul T. M, McGill Lodish 5E Package - Molecular Cell Biology & McGill Activation Code. San Francisco: W. H. Freeman.

<http://en.wikipedia.org/wiki/>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยที่แนะนำเสนอ

- นำเสนอผลงาน ในระดับนานาชาติ 4th International conference on nutrient & physical activity in aging, obesity & cancer (NAPA 2013) เรื่อง Plant Genetic Engineering for antioxidant flavonoids production and theirs protective activities ที่ Centrara Grand Mirage Beach Resort Pattaya, Chonburi Thailand, Aug 14-17, 2013: 59 Oral presentation
- นำเสนอผลงาน ในระดับนานาชาติ International conference on engineering applied science and technology (ICEAST 2013) Aug 21-24, 2013: เรื่อง Increasing Plant Flavonoid Biomaterials in Response to UV-A light และได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Advances in Material Science and Technology 802: 74-78 (SCOPUS)
- นำเสนอผลงาน ในระดับนานาชาติ The 5th International conference on science technology and Innovation for sustainable development (ICON:SCI 2014) July 17-18, 2014: เรื่อง antioxidant activity in the petal extract of PAP1 transgenic tobacco และอยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ในวาร Advances in Material Science and Technology (SCOPUS)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้