

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในพืช

นางสาวชัชววรรณ ตรีตานีภากุล
นางสาวนิลเนตร อัสวะศิริจินดา
นางสาวสิรินพร สุขสวัสดิ์อำนาจ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 67277
วัน,เดือน,ปี..... 22 พ.ย. 2549

b.....
j.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549 :

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Plant Expression Study of Regulatory Gene Involved in Flavonoid
Biosynthesis




A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในพืช
นักศึกษา นางสาวชัชววรรณ ตรีตานีภากุล รหัส 45050187
 นางสาวนิลเนตร อัสวะศิริจินดา รหัส 45050206
 นางสาวสิรินพร สุขสวัสดิ์อำนาจ รหัส 45050250
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพฑิณ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.มาลินี ตันติยากรณ์	
กรรมการ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพฑิณ	Dr. GNP



 (รศ.ดร.นวลพรรณ ณ.ระนอง)
 หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมจากชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ในพืช		
นักศึกษา	นางสาวชัชวรณ	ตรีตานีภากุล	รหัส 45050187
	นางสาวนิลเนตร	อัสวะศิริจินดา	รหัส 45050206
	นางสาวสิรินพร	สุขสวัสดิ์อำนาจ	รหัส 45050250
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ปีการศึกษา	2548		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน		

บทคัดย่อ

เฟลโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลต่างๆของพืชในธรรมชาติ โดยมีบทบาทในแง่ต่างๆ ทั้งทางเกษตรกรรม และทางอุตสาหกรรม ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์นี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ยีนโครงสร้าง และยีนควบคุม โดยยีนควบคุมชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์ให้โปรตีนที่รู้จักกันดีมี 3 กลุ่ม คือ WD-40 MYB และ bHLH ในการทดลองนี้ได้ทำการสร้างเวกเตอร์ที่ประกอบด้วยยีนควบคุมและแสดงออกได้ในต้นยาสูบ โดยใช้อะโกรแบคทีเรียในการถ่ายโอนเข้าสู่ต้นพืชทดลอง ในการถ่ายโอนนี้ได้ใช้เวกเตอร์ 2 ชนิด คือ pBI121 และ pHTT202 เพื่อที่จะศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลอง ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพของ pBI121 มีประสิทธิภาพดีกว่า pHTT202 จากนั้นได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ มีลำต้นแข็งแรง ใบมีสีเขียว และมีราก ที่เจริญบนอาหาร MS ปกติที่มีการเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ซึ่งเป็นต้นที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน โดยได้ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์จำนวน 59 ต้น คิดเป็น 50.42 เปอร์เซ็นต์ และได้ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์จำนวน 37 ต้น คิดเป็น 29.36 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปทดสอบการแสดงออกภายใต้สภาวะเครียดจากความเค็มโดยใช้อาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลลาร์ และสภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติกโดยใช้อาหารที่เติมแมนนิทอลความเข้มข้น 0.3 โมลลาร์ โดยเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน พบว่าต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์มีแนวโน้มที่จะสามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ดีกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกลับทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ และต้นที่ได้รับสภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติกจะโทรมลงมากกว่าต้นที่ได้รับสภาวะเครียดจากความเค็มเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	The Plant Expression Study of Regulatory Gene Involved in Flavonoid Biosynthesis
Name	Shatshawan Tritanipakul Nilnate Assavasirijinda Sirinporn Suksawatamnuay
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Assis. Prof. Dr. Kanokporn Sompornpailin

Abstract

Flavonoids are group of substances which make a different color shades in the natural plant. These substances have benefit to agriculture and various industry. This biosynthetic genes are divided in two groups, structural gene and regulatory gene. Three well-known proteins (WD-40, MYB and bHLH) involve in flavonoid biosynthesis. Thus this experiment studies a construction of the expression vectors containing regulatory genes and their expression in model plant using *Agrobacterium* mediated transformation. This transformation uses two different kinds of vector (pBI121 and pHTT202) in order to study and comparison of transformation efficiency in the model plant. The result shows higher efficiency of transformation of pBI121 than that of pHTT202. Transformant plantlets screened on MS medium containing kanamycin. 59 transgenic plants (50.48%) contained regulatory gene in sense direction and 37 plants (29.36%) possessed antisense regulatory gene. Gene expression was analyzed in transgenic plants subjected to salt stress using medium with 150 mM NaCl and osmotic stress by culturing in medium with 0.3 M mannitol compared to control plants. Transgenic plants containing sense regulatory gene tended to tolerance to stresses more than those with antisense gene. Both types of transformants in osmotic stress showed more severe characters than those exposed to salt stress when compare to control plants.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการพิเศษตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ของคณะ
วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยโครงการพิเศษนี้ได้
ทำการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมจากชีวสังเคราะห์เพลไดโนยด์ในพืชซึ่ง
ต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.กนกพร สมพรไพลิน ที่สละเวลามาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และให้
คำปรึกษาตลอดการดำเนินงานโครงการพิเศษนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.มาลินี ดันดิยาภรณ์ และรศ.ดวงใจ โอษฐ์กุล ที่เสียสละเวลามาเป็น
ประธานกรรมการ และกรรมการในการสอบโครงการพิเศษนี้

ขอขอบคุณพี่ท็อป พี่ที พี่ผึ้ง พี่โจ พี่ถั่วเขียว และเพื่อนๆทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือทุกอย่างจน
โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
Abstract.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงการพิเศษ.....	2
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	2
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 สารเฟลโวนอยด์.....	4
2.2 การควบคุมรูปแบบของการเกิดสี.....	9
2.3 ขึ้นควบคุม และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	9
2.4 ขึ้นควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในอะราบิโดปซิส.....	12
2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมสารแอนโทไซยานินในพืช.....	16
2.6 วิถีวิเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	17
2.7 การโคลนยีน.....	18
2.8 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR).....	20
2.9 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis).....	21
2.10 วิธีการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย.....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
3.1 การโคลนยีน <i>PAP</i> โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์.....	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	25
3.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่โพรแคริโอตที่เตรียม.....	27
3.4 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลองโดยใช้โพรแคริโอตที่เตรียม.....	28
3.5 คัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน.....	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	30
4.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์.....	30
4.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณยีนควบคุม PAP ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	30
4.1.2 ผลการเชื่อมต่อและการถ่ายโอนยีนส่วนของดีเอ็นเอ.....	31
4.1.3 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM	34
4.2 การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	38
4.2.1 ผลการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	38
4.2.2 ผลการคัดเลือกพลาสมิดที่ให้การแสดงออกของยีน PAP.....	40
4.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ <i>Agrobacterium</i>	45
4.3.1 การสร้างสายพันธุ์โพรแคริโอตที่เตรียมที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุม.....	45
4.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้โพรแคริโอตที่เตรียม.....	46
4.4.1 การถ่ายโอนยีนโดยใช้โพรแคริโอตที่เตรียมเข้าสู่ต้นยาสูบ.....	46
4.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน	47
4.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน.....	49
4.5.1 คัดเลือกพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์.....	49
4.5.2 ตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมภายใต้สภาวะ แตกต่างกัน.....	51
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	53
5.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์.....	53
5.2 การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	53
5.3 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้โพรแคริโอตที่เตรียม.....	53

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.4 ตรวจสอบการแสดงผลของพืชทดสอบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมภายใต้สภาวะ เครียดต่างๆ	54
เอกสารอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	59
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการทดลอง.....	62
ภาคผนวก ค ลำดับเบสของยีน.....	67



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชต่างๆ.....	12
3.1 ปฏิกริยาการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ <i>Agrobacterium</i> expression vector.....	26
3.2 สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายโอนเวกเตอร์แต่ละชนิด.....	28
4.1 สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายโอนเวกเตอร์แต่ละชนิด.....	46
4.2 จำนวนใบยาสูบที่ทำการถ่ายโอนอะโกรแบคทีเรียที่มีชิ้นยีนควบคุมชนิดต่างๆ.....	47
4.3 จำนวนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆ และสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้.....	48
4.4 จำนวนของแคลลัสของยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นยีนควบคุมที่สามารถเจริญเป็นยอดและเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้.....	50
6.1 แสดงการเตรียม stock ของอาหารสูตร MS.....	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของเฟลวोनอยด์.....	5
2.2 วิธีชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน.....	8
2.3 แสดงโครงสร้างของโปรตีน WD40 repeats.....	11
2.4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในบริเวณ R2 และ R3 โปรตีนกลุ่ม myb บางตัว.....	13
2.5 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในบริเวณ R2 และ R3 โปรตีนกลุ่ม myb กับ TT2.....	14
2.6 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมน bHLH ของ TT8 กับโปรตีนอื่นๆ ที่มีโดเมนเดียวกัน.....	15
2.7 แสดงโครงสร้างของโปรตีนควบคุมในการแสดงออกของยีน BAN.....	16
4.1 แสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์สำหรับยีนควบคุม PAP.....	30
4.2 โคโลนีของ <i>Escherichia coli</i> ที่ได้รับเวกเตอร์ pGEM บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal.....	31
4.3 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีสีขาวจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ.....	32
4.4 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ด้วย <i>Bam</i> HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสแทรกอยู่.....	33
4.5 ก และ ข แสดงจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ <i>PAP1</i> และ <i>PAP2</i> ตามลำดับ.....	34
4.6 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Hind</i> III เพื่อตรวจสอบชนิดของชิ้นดีเอ็นเอ.....	35
4.7 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI และ <i>Eco</i> T14I เพื่อตรวจสอบชนิดของชิ้นดีเอ็นเอ.....	36
4.8 ก และ ข แสดงผลการแยกชิ้นดีเอ็นเอของ <i>PAP1</i> และ <i>PAP2</i> ออกจากพลาสมิด pGEM โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI.....	37
4.9 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วย <i>Bam</i> HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่ามีชิ้นดีเอ็นเอ <i>PAP1</i> แทรกอยู่.....	39
4.10 ก และ ข แสดงทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นดีเอ็นเอ <i>PAP1</i> กับพลาสมิด pBI121 และจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hind</i> III และ <i>Eco</i> T14I.....	40
4.11 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ <i>PAP1</i> ด้วย <i>Hind</i> III และ <i>Eco</i> T14I เพื่อคัดเลือกพลาสมิด ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ (sense).....	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12 ก และ ข แสดงทิศทางการเชื่อมต่อของซันดีเอ็นเอ <i>PAP2</i> กับพลาสมิด pBI121 และจุดตัด จำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>	42
4.13 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ที่มีซันดีเอ็นเอ <i>PAP2</i> ด้วย <i>HindIII</i> เพื่อคัดเลือกพลาสมิด ที่มี ทิศทางของซันดีเอ็นเอแทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ (sense).....	43
4.14 ก และ ข แสดงทิศทางการเชื่อมต่อของซันดีเอ็นเอ <i>PAP2</i> กับพลาสมิด pHTT202 และจุดตัด จำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HindIII</i>	44
4.15 ผลการตัดพลาสมิด pHTT202 ที่มีซันดีเอ็นเอ <i>PAP2</i> ด้วย <i>HindIII</i> เพื่อคัดเลือกพลาสมิด ที่มี ทิศทางของซันดีเอ็นเอแทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ (sense).....	45
4.16 ก-ข แสดงภาพเปรียบเทียบการพัฒนาไปเป็นแคลลัสของใบยาสูบ.....	49
4.17 ก และ ข แสดงภาพเปรียบเทียบต้นพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์และไม่สมบูรณ์.....	50
4.18 ก และ ข แสดงภาพเปรียบเทียบลักษณะของต้นที่เจริญในอาหาร MS หลังได้รับสภาวะเครียด.....	52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงการพิเศษ

ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นกลุ่มของสารที่ทำให้เกิดสีต่างๆของพืชในธรรมชาติ แบ่งออกตามโครงสร้างได้มากกว่า 10 กลุ่ม เช่น แชลโคน (chalcone) เฟลวานอน (flavanone) และแอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นต้น จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าสารฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืช เมื่อพืชได้รับสภาวะเครียด เช่น ความเย็น รังสี UV-B ความเค็ม และความแห้งแล้ง เป็นต้น สารเหล่านี้จะมีผลให้พืชเจริญเติบโตได้อย่างเป็นปกติ (Broun, 2005)

ฟลาโวนอยด์มีบทบาทในแง่ต่างๆ ทั้งทางเกษตรกรรม และทางอุตสาหกรรม เช่น การล่อแมลงและนกให้มาช่วยแพร่พันธุ์พืชให้มาผสมเกสร (Carboche และคณะ 2000) ป้องกันพืชจากการรุกรานของราและแบคทีเรีย เป็นสารที่ช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหาร เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ (De-Xing Hou และคณะ 2005) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ และช่วยในการป้องกันรังสี UV (Sompompailin และคณะ 2002) เป็นต้น

ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์นี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ยีนโครงสร้าง (structural gene) ที่ทำหน้าที่ในการถอดและแปลรหัสให้เอนไซม์ที่ใช้ในชีวสังเคราะห์ และยีนควบคุม (regulatory gene) จะให้โปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง (กนกพร, 2545) ซึ่งยีนควบคุมของชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ที่ศึกษากันมากมี 3 กลุ่ม คือยีนที่ให้โปรตีนควบคุม transparent testa glabral (TTG1) MYB และ basic helix-loop-helix (bHLH) โดยโปรตีนควบคุมมีการทำงานร่วมกันผ่านทางโปรโมเตอร์ BANYULS (BAN) (Baudry และคณะ 2005) ซึ่ง MYB และ bHLH ทำงานร่วมกันในการกระตุ้นการถอดรหัสชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก เช่น ความเค็ม และความแห้งแล้ง (Ithal and Reddy 2004)

พบการจับกันของโปรตีนในกลุ่ม MYB และ bHLH ในพืชหลายชนิดเช่น พิทูเนีย (*Petunia*) สแนปดากอน (*Snapdragon*) และข้าวโพด (*Maize*) นอกจากนี้โปรตีน MYB และ bHLH ยังเป็นโปรตีนควบคุมชีวสังเคราะห์แทนนินในเปลือกหุ้มเมล็ดอีกด้วย (De bora และคณะ 2002)

ในการทดลองนี้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมจากชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ รวมไปถึงศึกษาผลการแสดงออกของยีนควบคุมชนิดดังกล่าวในพืชทดลอง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1.2.1 เพื่อสร้างเวกเตอร์ที่มียีนควบคุม *PAP* สำหรับแสดงออกในพืชทดลอง
- 1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนควบคุมจากชีวสังเคราะห์เพลไวโนมัยด์เข้าสู่พืชทดลอง
- 1.2.3 ศึกษาผลการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมชนิดดังกล่าวภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

สร้างเวกเตอร์สำหรับถ่ายโอนยีนควบคุม *PAP* เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนควบคุม โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เข้าสู่พืชทดลอง และตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมชนิดดังกล่าวภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถสร้างเวกเตอร์ที่มียีนควบคุม *PAP* สำหรับแสดงออกในพืชทดลอง
- 1.4.2 ได้พืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุม
- 1.4.3 ทราบถึงผลการแสดงออกของยีนควบคุมภายในพืชทดลอง

1.5 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.5.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

- 1.5.1.1 ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนควบคุมกลุ่ม *PAP* โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม และตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส
- 1.5.1.2 นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าจะน่าจะเป็นยีนที่ต้องการมาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ และถ่ายโอนเข้าสู่ *Escherichia coli* เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดและชิ้นดีเอ็นเอ
- 1.5.1.3 ทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด
- 1.5.1.4 สกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้และแยกชิ้นดีเอ็นเอออกโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

1.5.2 การเชื่อมต่อยีนดีเอ็นเอ *PAP* กับ *Agrobacterium* expression vector

- 1.5.2.1 เชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector
- 1.5.2.2 ถ่ายโอน *Agrobacterium* expression vector เข้าสู่ *Escherichia coli* เพื่อคัดลอกและเพิ่มปริมาณ พลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.5.2.3 คัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางการแสดงออกของจีนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ (sense) และกลับทิศทางกับ โปรโมเตอร์ (antisense)

1.5.3 ขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *Agrobacterium*

- 1.5.3.1 ทำการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียในอาหารเหลว
1.5.3.2 ทำการถ่ายโอนยีนที่ต้องการเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียโดยวิธี freeze thaw

1.5.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลองโดยใช้ *Agrobacterium*

- 1.5.4.1 ทำการเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ต้องการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชในอาหารเหลว
1.5.4.2 นำพืชทดลองมาศึกษาเทคนิคการถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย
1.5.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

1.5.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน

- 1.5.5.1 คัดเลือกต้นพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์
1.5.5.2 ทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่มียาปฏิชีวนะเพื่อทำการคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน
1.5.5.3 นำต้นพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมมาเลี้ยงในอาหารที่มีสถานะเครียดต่างๆ แล้วทำการสังเกตผลเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน

บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

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

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

ฟลาโวนอยด์ที่สำคัญทางเภสัชกรรมและการแพทย์แผนปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น รูทีน (rutin) ช่วยเพิ่มความต้านทานของหลอดเลือดฝอย และสารสกัดจากใบเป๊ะก้วย ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตไปสมอง และช่วยทำลายอนุมูลอิสระซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เนื้อเยื่อในร่างกายมนุษย์เสื่อมลง

ฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มของสารที่มีคาร์บอน 15 ตัวจัดเรียงตัวในระบบ 3 วง คือ A B และ C โดยมี A และ B เป็นวงฟีนิล (phenyl ring) และ C เป็นวงแลคโตส (lactone ring) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวง C ทำให้แยกฟลาโวนอยด์ออกเป็นชนิดต่างๆ (รูปที่ 2.1) และการเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) ที่วง A และ B ตามตำแหน่งต่างๆ ทำให้เกิดอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ มากมาย

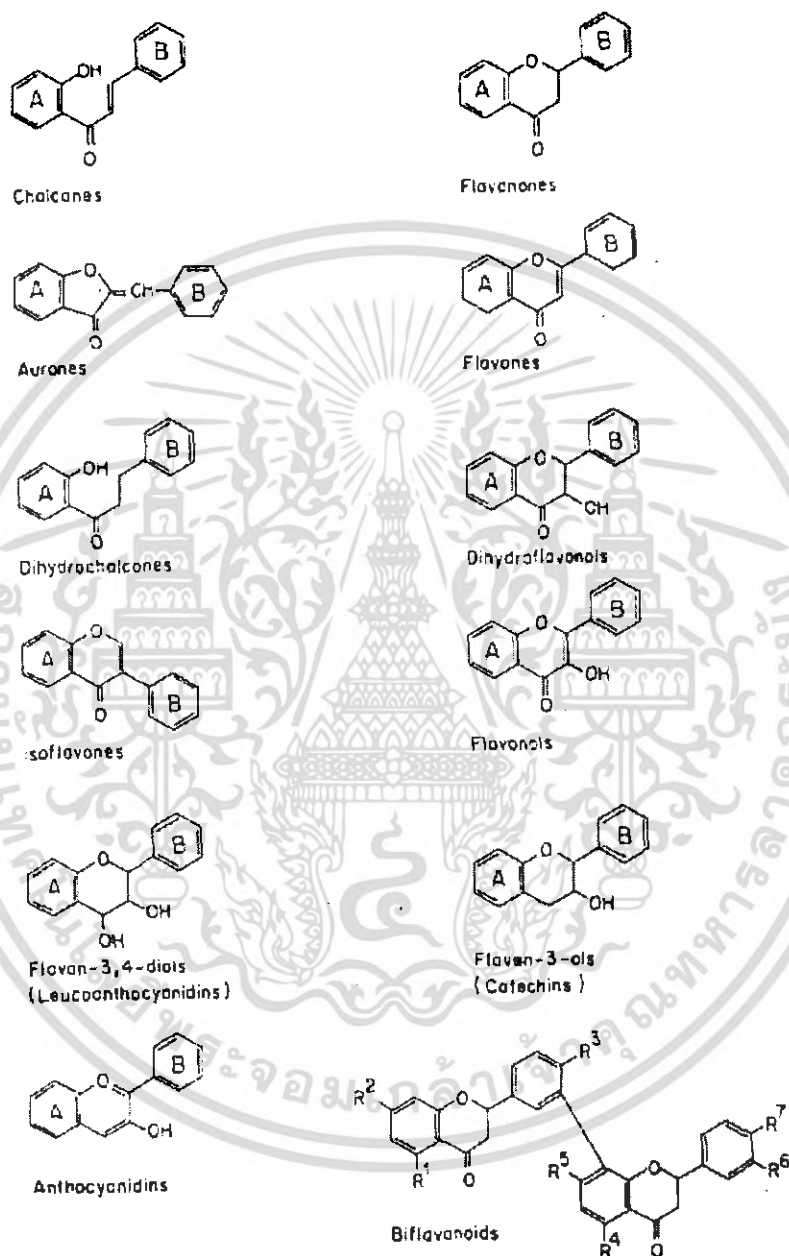
2.1.1 แชลโคน (chalcone) และออโรน (aurone)

สารนี้มีโครงสร้างที่วง C ผิดจากกลุ่มอื่นๆ เมื่อถูกไอแอมโมเนียเปลี่ยนจากเหลืองเป็นแดงจึงเรียกสารกลุ่มนี้ว่า แอนโทคลอร์ (antochlor) แชลโคนให้สีเหลืองเข้ม ได้แก่ สีของดอกไม้ในวงศ์ Compositae Oxalidaceae Scrophulariaceae Liliaceae และ Acanthaceae เป็นต้น ส่วนออโรนพบในดอก ใบ เปลือก และเนื้อไม้ให้สีเหลืองทอง เช่น Sulfuretin ในดอกรักเร่ (*Dahlia* spp.) และ hispidol glucoside ในถั่วเหลือง (*Glycine* spp.)

2.1.2 ฟลาวานอน (flavanone) และไดไฮโดรฟลาโวนอล (dihydroflavanol)

สารเหล่านี้ให้สีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี พบได้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ ตัวอย่าง กลัยโคไซด์ เช่น เฮสเพอริดีน (hesperidin) และ นารินจิน (naringin) จากเปลือกส้ม (aglycone : hesperetin และ naringenin) มีรสขมมักใช้ในอุตสาหกรรมและเภสัชกรรม ปัจจุบันรู้จักเฮสเพอริดีนในชื่อว่า ไซตรัสไบโอฟลาโวนอยด์ (citus bioflavonoid) มีในเปลือกส้มที่ยังไม่สุก ใช้เสริมความแข็งแรงของหลอดเลือด

ฝอย เฟลวอนอยด์ทั้งสองกลุ่มมีความคงทนต่อกรดเกลือ แต่จะสลายตัวให้แซลโคเจนเมื่ออุ่นกับด่าง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อราได้ ใช้ในการเก็บรักษาไม้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเฟลวอนอยด์

ที่มา : อ้อมบุญ, น.ป.ป.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 เฟลไวโนล (flavonol)

เฟลไวโนลเกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน (lignification) ในใบและเนื้อไม้ และมักพบในดอกไม้โดยเป็นสารเมดิซินชนิดหนึ่ง ซึ่งจะช่วยให้แมลงเพื่อให้เกิดการผสมเกสร จึงมีความสำคัญต่อพืชยืนต้น ส่วนในพืชล้มลุกนั้น จะพบเฟลไวโนลในปริมาณต่ำ และหาได้ยากในพืชชั้นต่ำ สำหรับในจุลินทรีย์ โดยเฉพาะในแบคทีเรีย และสาหร่ายไม้ปรากฏว่ามีเฟลไวโนลเลย ในเชื้อรา *Aspergillus candidas* มีคลอโรเฟลไวโนน (chlorflavonin) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น เฟลไวโนลกลัยโคไซด์ที่ใช้ในเภสัชกรรม คือ รุทินจากใบอิทรุด (*Ruta graveoleus*) มีคุณสมบัติเสริมความแข็งแรงของหลอดเลือดฝอย

2.1.4 เฟลไวโนน (flavone)

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

2.1.5 ไอโซเฟลไวโนอยด์ (isoflavonoid)

มีโครงสร้างต่างจากเฟลไวโนนชนิดอื่นคือ ตรงส่วนของคาร์บอนที่เชื่อมระหว่างวง A และ B มีโซ่ข้างเป็นกลุ่มของเฟลไวโนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น โรทีโนนจาก *Derris* spp. มีฤทธิ์เบื่อปลา โคเมสโตรล (coumestrol) จากพืชตระกูลถั่วเป็นไฟโตอะเล็กซิน (phytoalexin) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนผิวของพืช (rotenone)

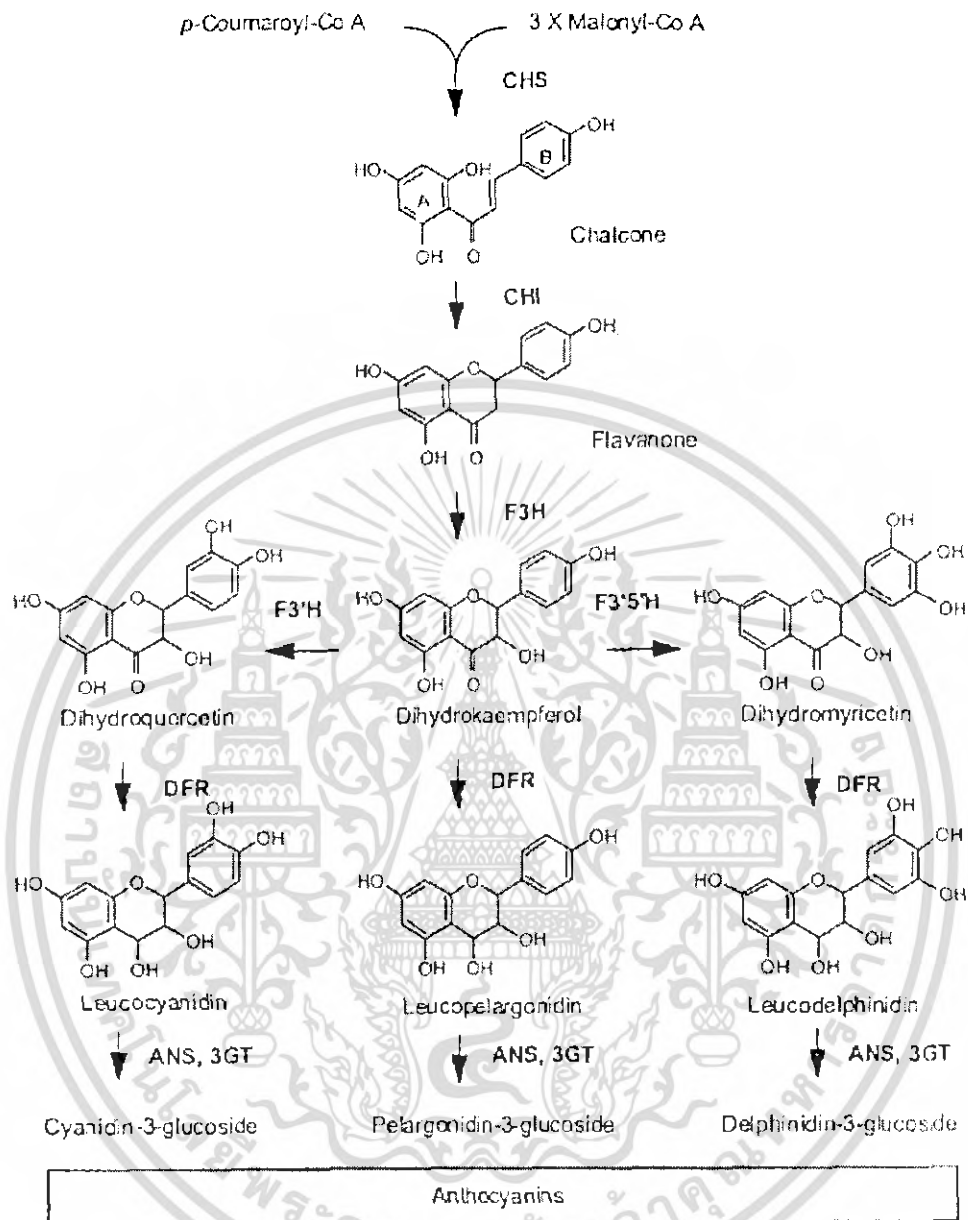
2.1.6 แอนโทไซยานิน (anthocyanin) (กนกพร, 2545)

แอนโทไซยานิน เป็นสารกลุ่มเมดิซินสะสมอยู่ในแวคิโอล ของเนื้อเยื่อดอกและใบของพืช สารกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น เป็นสารส่งสัญญาณของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณในหลายวิถี การจับกันระหว่างพืชและเชื้อโรค การป้องกันตัวเองของพืช การตอบสนองต่อแสงยูวี-บี การตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ มีรายงานถึงการชักนำให้สะสมสารกลุ่มแอนโทไซยานินในข้าวฟ่าง เมื่อพืชถูกเชื้อโรครบกวน เช่นเดียวกับในข้าวโพด มีรายงานการสะสมของสารกลุ่มนี้เมื่อถูกหนอนรบกวนและยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอนโทไซยานินกับการเพิ่มความต้านทานหนอนรบกวนในพืชอีกด้วย มีการใช้สารกลุ่มนี้ในทางเภสัชเวชและเป็นอาหารเสริมสุขภาพ เช่น ให้ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดปริมาณคอเลสเตอรอล และต่อต้านการเกิดมะเร็ง

ชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินนั้น ให้ผลผลิตเป็นสารสีซึ่งสามารถตรวจสอบได้ง่าย นิยมใช้ชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้เป็นต้นแบบสำหรับศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของยีน และหน้าที่ของยีน โดยเฉพาะการควบคุมการแสดงออกของยีน มีการแยกยีนศึกษาหน้าที่และรูปแบบการแสดงออกของยีนซึ่งได้จากชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิด เช่น อะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*)

พิทูเนีย (*Petunia*) สแนปดราคอน (Snapdragon) และข้าวโพด (Maize) ซึ่งสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้สามารถสรุปได้ดังนี้ (รูปที่ 2.2)

โดยขั้นตอนแรกที่เข้าสู่ชีวสังเคราะห์เฟลโวนอยด์เกิดจากการกระตุ้นให้รวมตัวกันของ malonyl CoA 1 โมเลกุล และ *p*-coumaroyl CoA 1 โมเลกุลโดยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ให้ผลผลิตสารเนริงเจนิน แคลโคน (naringenin chalcone) ซึ่งมีสีเหลือง ขั้นตอนที่สองเป็นการเกิดไอโซเมอร์ (isomerization) ของสารแคลโคน โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้สารเนริงเจนินเฟลวาโนน (naringenin flavanone) ไม่มีสี หลังจากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone-3-hydroxylase (F3H) ให้สารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอล คือ สารไดไฮโดรเคเอ็มพีรอล (dihydrokaempferol) สารนี้อาจจะได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งต่างๆเพิ่ม โดยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) และ flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) และให้สารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอลชนิดอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ ไดไฮโดรเคอควิซีน (dihydroquercetin) และไดไฮโดรเมอริซิทีน (dihydromyricetin) จำนวนหมู่ไฮดรอกซีบนวง B มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเม็ดสีที่แตกต่างกัน ในการเปลี่ยนสารกลุ่มไดไฮโดรเฟลโวนอล เป็นสารที่มีกลุ่มแอนโทไซยานินนั้นต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด เริ่มจากกระตุ้นการรีดิวซ์สารกลุ่มนี้ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) และสารกลุ่มลิวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanidin) ได้แก่ ลิวโคไซยานิน (leucocyanidin) ลิวโคเพลาโกนิน (leucopelargonidin) และ ลิวโคเดลฟินิน (leucodelphinidin) ถูกออกซิเดชัน (oxidation) ดีไฮเดรชัน (dehydration) และไกลโคซิลเลชัน (glycosylation) ให้สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งให้เม็ดสีแตกต่างกัน ได้แก่ ไซยานิน เพลาโกนิน และ เดลฟินิน ซึ่งให้สีแดง ส้ม และม่วงตามลำดับ นอกจากนี้อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเกิดปฏิกิริยาต่างๆเพิ่มเติม เช่น ไกลโคซิลเลชัน เมทิลเลชัน และเอซิลเลชัน ซึ่งทำให้เกิดเม็ดสีแอนโทไซยานินที่จำเพาะในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้ต้องการเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) และทรานส์พอร์ตเตอร์ (transporters) ซึ่งเรียกว่า กลูตาไทโอนปั๊ม (glutathione pump) สำหรับเคลื่อนย้ายสารจากไซโทพลาสซึมเข้าสู่แวคูลอล



รูปที่ 2.2 วิธีชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase; F3'5H, flavonoid 3',5'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol reductase; ANS, anthocyanidin synthase; 3GT, anthocyanin glucosyltransferase)

ที่มา : กนกพร (2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การควบคุมรูปแบบของการเกิดสี

กลีบดอกไม้จะมีรูปแบบการเกิดสีเกิดจากการสะสมของแอนโทไซยานินที่เซลล์จำเพาะ การควบคุมชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินจะควบคุมที่การถอดรหัสยีนเป็นส่วนใหญ่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของยีนโครงสร้าง (structural gene) ซึ่งจะให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีทำการสร้างแอนโทไซยานิน และกลุ่มของยีนควบคุม (regulatory gene) จะให้โปรตีนซึ่งกำหนดการแสดงออกของยีนโครงสร้างและรูปแบบของการสะสมเม็ดสี โดยการแสดงออกของยีนควบคุมจะมีความจำเพาะต่อรูปแบบของการเกิดสี ถึงแม้ว่าในพืชหลายชนิดจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ก็พบว่ายีนโครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งทำหน้าที่เดียวกันในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ร่วมกัน และยีนเหล่านี้ยังถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยแสง การศึกษาถึงการควบคุมชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน โดยเฉพาะเทคนิคการกลายพันธุ์นั้นพบว่า การควบคุมชีวสังเคราะห์นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุม ในการกำหนดรูปแบบการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

ถึงแม้ว่าในปัจจุบัน จะมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินอย่างมากมายทั้งในด้านการวิเคราะห์โครงสร้างสารและด้านอณูชีววิทยา แต่กลไกที่แน่นอนยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติม การเกิดเม็ดสีของพืชส่วนใหญ่ นั้น จะควบคุมที่การถอดรหัสยีนซึ่งการควบคุมนี้มีความซับซ้อนเกี่ยวข้องกับโปรตีนควบคุมหลายชนิด ส่งผลให้พืชแสดงรูปแบบการเกิดสีที่แตกต่างกันออกไปอย่างมากมาย

2.3 ยีนควบคุม และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

มีการจัดจำแนกยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิด ยีนควบคุมแบ่งเป็นหลายประเภท ในที่นี้จะกล่าวถึงยีนควบคุมที่เป็นที่รู้จักกันดีคือยีนซึ่งให้โปรตีนควบคุมที่มีโดเมน myb โดเมน basic helix-loop-helix (bHLH) โดเมน WD40 repeats ซึ่งยีน 3 กลุ่มนี้ได้มีการโคลนและศึกษาการแสดงในพืชหลายชนิด

2.3.1 Myb (Martin and Ares 1997)

โปรตีน myb เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (transcription factor) มีบริเวณที่สำคัญอยู่ 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณที่ใช้จับกับดีเอ็นเอ (DNA binding domain) และบริเวณที่กระตุ้นให้เกิดการถอดรหัส (DNA activation domain) การจำแนก myb จะใช้บริเวณรีพีท (repeat : R) อยู่ภายในบริเวณที่ใช้จับกับดีเอ็นเอ myb ในสัตว์มักจะมีรีพีท 3 ชนิด คือ R1, R2 และ R3 ส่วนในพืชมักจะมีเพียง R2 และ R3 เท่านั้นแต่ก็มีพืชบางชนิดที่มีเพียงรีพีทชนิดเดียวหรืออาจมีทั้ง 3 ชนิด แต่ละรีพีทประกอบด้วยกรด

อะมิโนประมาณ 50 ตัว ภายในรีพีทเดียวกันจะมีบริเวณอนุรักษ์ร่วมกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยมีทริปโตเฟนจำนวน 3 ตัวที่อยู่ห่างกันภายในรีพีทจะจับกันด้วยพันธะทางเคมี ทำให้สายพอลิเพปไทด์เกิดโครงสร้างสามมิติเป็นลักษณะ helix-turn-helix สำหรับในพืช ทริปโตเฟนตัวแรกภายใน R3 นั้นอาจถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก (aromatic amino acid) ชนิดอื่น

การทำงานของโปรตีน myb จะเกิดขึ้นโดยการจับกับดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ (sequence-specific) ซึ่งเกิดขึ้นจากกรดอะมิโน 8 ตัวภายในแต่ละรีพีท โดยกรดอะมิโน 6 ใน 8 ตัว จะเหมือนกันในพืชแต่ละชนิด ส่วนอีก 2 ตัวจะแตกต่างกันไป ทำให้มีความคล้ายกันมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนั้นมีความสำคัญต่อการจับกับดีเอ็นเอ ซึ่งส่งผลต่อบริเวณที่ myb จะเข้าไปจับ และความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอ

การควบคุมการทำงานของ myb ในพืช แบ่งเป็น 2 ระดับ ได้แก่

2.3.1.1 การควบคุมในระดับก่อนการแปลรหัส (pre-translational control) ได้แก่ การควบคุมการสร้าง mRNA ซึ่งมีความจำเพาะในแต่ละอวัยวะ เวลา และการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสง ความเครียดต่างๆ เป็นต้น นอกจากนี้ การตัดแปลง mRNA และการส่ง mRNA ออกนอกนิวเคลียส ก็เป็นการควบคุมในระดับนี้เช่นกัน

2.3.1.2 การควบคุมในระดับหลังการแปลรหัส (post-translational control) สามารถทำงานผ่านกลไกต่างๆ รวมถึง ค่าความต่างศักย์รีดอกซ์ภายในเซลล์ (cellular redox potential) ผ่านฟอสโฟริเลชัน (phosphorylation) และการจับกันของโปรตีน (protein-protein interaction)

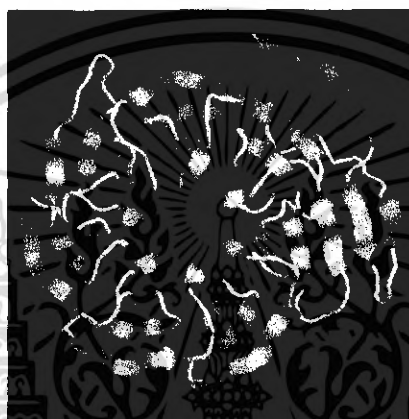
2.3.2 bHLH (myc) (Caboche และคณะ 2000)

ทรานส์คริปชันแฟกเตอร์กลุ่มนี้ ทางปลายคาร์บอกซิลจะประกอบด้วย β -helix 2 บริเวณ ได้แก่ helix I และ helix II ในแต่ละ helix จะประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 15-20 ตัว และมี loop สั้นๆ เป็นตัวเชื่อมระหว่าง helix เกิดเป็นโครงสร้างตติยภูมิแบบ helix-loop-helix (HLH) ส่วนทางปลายอะมิโนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นเบสจำนวนมาก

โปรตีนที่มีโดเมน bHLH นี้ จะจับกับโปรตีนที่มีโดเมนเดียวกันที่บริเวณ HLH เกิดเป็น ไดเมอร์ (dimer) หากโปรตีนที่มีโดเมนนี้เป็นโปรตีนที่เหมือนกันมาจับกันจะเรียกว่า โฮโมไดเมอร์ (homodimer) ส่วนด้านปลายอะมิโนจะเป็นบริเวณที่เข้าจับกับดีเอ็นเอ โดยบริเวณที่จะเข้าไปจับและประสิทธิภาพในการจับ ขึ้นอยู่กับโปรตีนที่มาจับกันเป็นไดเมอร์

2.3.3 WD40 repeats (Neer และคณะ 1994 ; Smith และคณะ 1999)

เป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่มีบริเวณอนุรักษ์ขนาดประมาณ 40-60 กรดอะมิโน ซึ่งเริ่มต้นด้วยกรดอะมิโนไกลซีน และฮิสติดีน (GH) จำนวน 11-24 ตัวต่อกันจากทางด้านปลายอะมิโน แล้วสิ้นสุดที่กรดอะมิโนทริฟโตเฟน และกรดแอสพาร์ติก (WD) ทางด้านปลายคาร์บอกซิล ส่วนภายในระหว่าง GH และ WD นั้นเป็นลำดับเบสหลักของบริเวณอนุรักษ์ร่วมกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งจะมีการขจัดข้อพับ ไปพับมาลักษณะคล้ายใบพัด แบ่งเป็น 7 แฉก แต่ละแฉกจะประกอบด้วย 4 พับ ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของโปรตีน WD40 repeats

ที่มา : <http://www.biochem.northwestern>

โดเมน WD40 repeats ส่วนใหญ่มีความจำเป็นสำหรับการเกิดปฏิกริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน แต่จะขาดบริเวณที่ใช้จับดีเอ็นเอ สมาชิกของโปรตีน WD40 repeats ที่ประกอบด้วย WD-repeats 4-10 ชุดจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการภายในเซลล์ที่หลากหลาย เช่น เป็นสารส่งสัญญาณของวิถีการถ่ายทอดสัญญาณ (signal transduction) กระบวนการตกแต่ง mRNA (RNA processing) การควบคุมการคัดลอกรหัส เป็นต้น

โปรตีนควบคุมเหล่านี้มักมีการทำงานร่วมกัน มีการศึกษาอย่างมากมายพบว่า กันโปรตีนควบคุมเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการแสดงออกซึ่งพบได้ทั่วไปในพืชชนิดต่างๆ โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนบางยีนไม่ได้เกิดจากการทำงานของ myb เพียงอย่างเดียว เช่น โปรตีน C1 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม myb จะจับกับโปรตีน R ซึ่งมีโดเมน bHLH เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนโครงสร้างในชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวโพด

ตารางที่ 2.1 แสดงยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชต่างๆ

โดเมน	ข้าวโพด	พืทูเนีย	สแนปครากอน	เพอริลา	อะราบิดอปซิส
bHLH	<i>r, b, sn, lc</i>	<i>jafl3, an1</i>	<i>delila</i>	<i>Myc-rp,</i> <i>Myc-F3G1</i>	<i>tt8</i>
MYB	<i>c1, pl</i>	<i>an2, mybPh3</i>	<i>rosea</i>	<i>Myb-p1,</i> <i>Myb-C05</i>	<i>tt2, pap1,</i> <i>pap-2</i>
WD40	<i>pac1</i>	<i>an11</i>		<i>PFWD</i>	<i>ttg1</i>

ที่มา : Yamazaki และคณะ 2002

2.4 ยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินในอะราบิดอปซิส

อะราบิดอปซิสเป็นพืชชนิดหนึ่ง ที่ได้มีการจัดจำแนกและศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น เป็นพืชที่มีจีโนมขนาดเล็ก มีวงจรชีวิตสั้น และมีการหาลำดับเบสทั้งหมดในจีโนมแล้ว เป็นต้น ตัวอย่างของยีนควบคุมที่ได้มีการศึกษาแล้ว ได้แก่

2.4.1 *PAP1 (Production of Anthocyanin Pigment 1)* และ *PAP2* (Borevitz และคณะ 2000)

PAP1 และ *PAP2* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มของยีน *myb* ซึ่งภายในโดเมนนี้จะให้ลำดับกรดอะมิโน R2 และ R3 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *PAP1* และ *PAP2* มีบริเวณอนุรักษ์ร่วมกับ *myb* อื่นๆ เช่น โปรตีน An2 จากพืทูเนีย โปรตีน Cl, Pl และ P จากข้าวโพด นอกจากนี้ยังมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน GL1 จากอะราบิดอปซิส และโปรตีน Mixta จากสแนปครากอน ซึ่งควบคุมการพัฒนาของขนอ่อน (trichome) อีกด้วยดังแสดงในรูปที่ 2.4

R2 LRKAAATEE SLLRQCINKY EGK HQVPVRAGN-CRPS LLLLYKPS PAP1
 LRKAAATEE SLLRLCIDKY EGK HQVPIRAGN-CRPS LLLLYKPS PAP2
 VRKAAATEE LLLRECIDK-EGK HLVPVRAGN-CRPS LLLLYRPH AN2
 VKRAAASK DALAAYVKAH EGK REVPQKAGR-CGAS LLLLYRPN C1
 VKRAAASK DTLAAYVKAH EGK REVPQKAGR-CGAS LLLLYRPN P1
 LKRRAATEE QLLANYIAEH EGS RSLPKNAGL-CGAS LLLLYRAD P
 YKKLVEE NIIMDYVLNH TQGNRIVRKTGK-CGAS LLLMYSPN GL1
 VKKAPVDE QKLLAYTEEH HGS RSLPLKAGQ-CGAS LLLAYRPD Mixta
 LKLPKKE QRVIELVQKY PKR SVIAKH--KGIIGQ EHHHNPE c-myb

R3 IKRGKLSSEVDLLRLRL SL GRLGRTADV EY THLSKK PAP1
 IKRGRLSNDVDLLRLKL SL GRLGRTADV EY THLSKK PAP2
 IKRGDESIDVDLILRLKL SL GRLGHIA DV EY THLRKK AN2
 IRRGNISYDEDLIIRLRL SL GRLGRTDEI EY STLGRR C1
 IKRGNISYDEDLIVRLKL SL GRLGRTDEI EY STLGRR P1
 VKRGNISKEEDI IIKL AT SL SHLGRTD EIEY SHLSRQ P
 VNKGNFTEQEDLIIRLKL SL KRVGRTDQV EY THLSKK GL1
 IKRGPFSLQEQTIIOAL SA SHLKRTD EIEY THLKKR Mixta
 VKKTSWTEEDRIIYQAKR SA AEKLLGRTDAI EY STMRRK c-myb

รูปที่ 2.4 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในบริเวณ R2 และ R3 โปรตีนกลุ่ม myb บางตัว (บริเวณสีแดง และบริเวณสีเหลือง หมายถึง conserved residue และ matching residue ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ PAPI

ที่มา : Borevitz และคณะ 2000

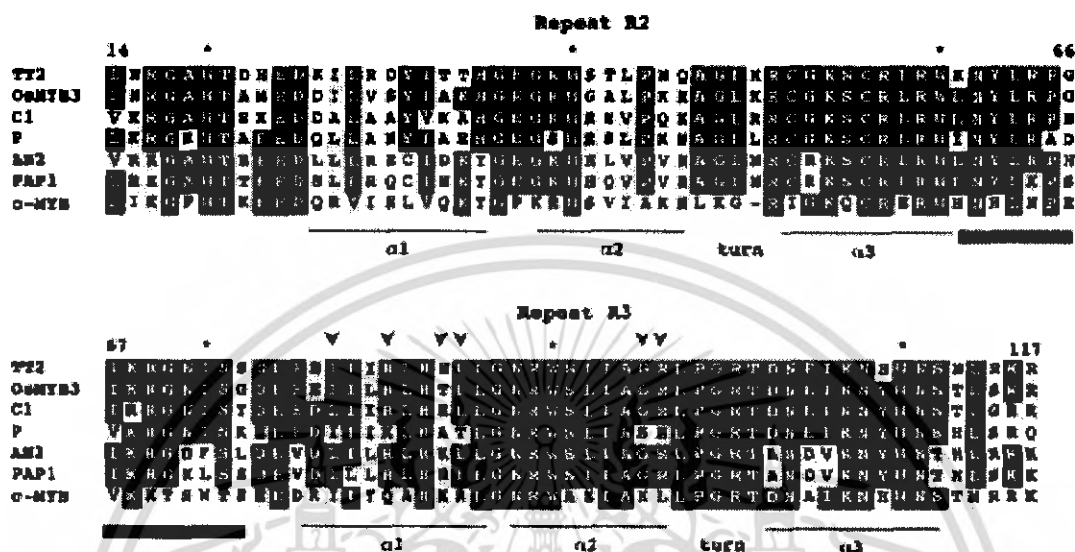
ลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมน myb ของ *PAP1* และ *PAP2* เหมือนกันเท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์ และเท่ากับ 77 เปอร์เซ็นต์ ภายในโปรตีนทั้งหมด การทำให้ยีน *PAP1* และ *PAP2* แสดงออกมากกว่าปกติ (overexpression) ในอะราบิดอปซิส ส่งผลให้มีการสร้างแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นในทุกส่วนของต้นพืช เช่น ราก ลำต้น ใบ กิ่ง กลีบดอก และเกสร เป็นต้น นอกจากนี้ยังส่งผลให้มีการสะสมฟเลโวนอล และไฮดรอกซีซินนามามากขึ้น เมื่อเทียบกับต้นควบคุมที่มีการแสดงออกของยีนเหล่านั้นในระดับปกติ

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

2.4.2 *TT2* (Transparent testa 2)

ยีน *TT2* เมื่อแปลรหัสแล้วจะได้กรดอะมิโนทั้งหมด 258 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 29.7 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 8.91 (Nesi และคณะ 2001) ยีน *TT2* จะควบคุมรหัสของทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในกลุ่มโดเมน myb ซึ่งภายในโดเมนนี้จะให้ลำดับกรดอะมิโน R2 และ R3 จากการเปรียบเทียบลำดับ

กรดอะมิโนภายในโดเมนนี้ พบว่า *TT2* มีบริเวณอนุรักษ์ร่วมที่คล้ายกับโดเมน *myb* ในพืชมากกว่า *c-Myb* ซึ่งมีในสัตว์



รูปที่ 2.5 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในบริเวณ R2 และ R3 โปรตีนกลุ่ม *myb* กับ *TT2*

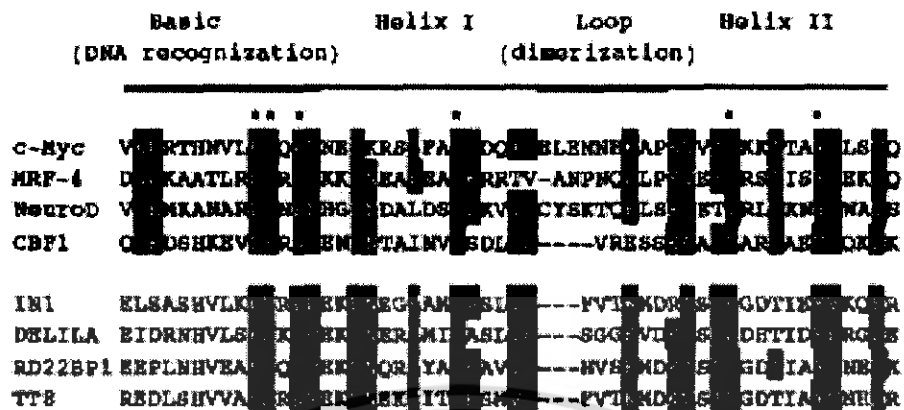
พบว่ามีความคล้ายกับโปรตีนอื่นๆ ที่มีโดเมน *myb* จากพืช เช่น เหมือนกับ *OsMYB3* ที่พบในข้าว 82% *C1* ที่พบในข้าวโพด 74% *P* ที่พบในข้าวโพด 67% *AN2* ที่พบในพืชมะเขือ 66% และ *PAPI* พบในอะราบิโดปซิส 65% (แถบสีดำ หมายถึง บริเวณอนุรักษ์)

ที่มา : Nesi และคณะ 2001

ยีน *TT2* เป็นปัจจัยหลักในการควบคุมให้มีกระบวนการสร้างโปรแอนโทไซยานิดิน จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *TT2* โดยถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะราบิโดปซิส ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *CaMV 35S* พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *TT2* นั้นสามารถชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *BAN (BANYULS)* ซึ่งกำหนดรหัสอนไซม์ที่นำสารตัวกลางเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์ค่าที่ซิน และโปรแอนโทไซยานิดินในเมล็ดอ่อน และรากได้ เมื่อเทียบกับต้นควบคุม (Baudry และคณะ 2004)

2.4.3 *TT8 (Transparent testa 8)* (Caboche และคณะ 2000)

เป็นยีนที่ควบคุมรหัสของทรานสคริปชันแฟคเตอร์ในกลุ่มของ *bHLH* ได้จากอะราบิโดปซิส จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมนนี้ พบว่า *TT8* มีบริเวณอนุรักษ์ร่วมกับ *c-Myb* ซึ่งมีในสัตว์ และโปรตีนอื่นๆ ที่มีโดเมน *bHLH* จากพืช ดังรูปที่ 2.6

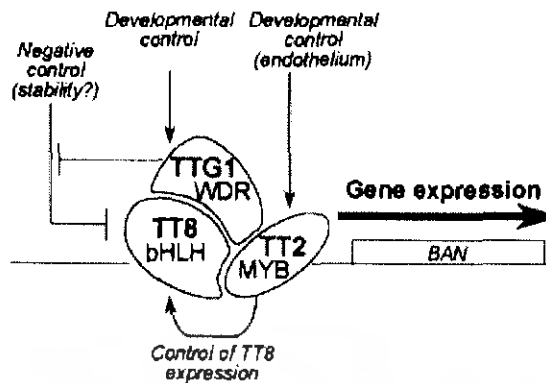


รูปที่ 2.6 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนภายในโดเมน bHLH ของ *TT8* กับโปรตีนอื่นๆ ที่มีโดเมนเดียวกัน (แถบสีดำ หมายถึง กรดอะมิโนในบริเวณอนุรักษ์)

ที่มา : Caboche และคณะ 2000

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโครงสร้างต่างๆของชีวสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ในอะราบิดอปซิสที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *TT8* พบว่า ยีน *TT8* จำเป็นสำหรับการแสดงออกของยีน *DFR* ซึ่งควบคุมขั้นตอนแรกในการเปลี่ยนสารตัวกลางในวิถี (intermediate) ให้เข้าสู่การสร้างแอนโทไซยานิน และโปรแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ *TT8* ยังจำเป็นสำหรับการแสดงออกของยีน *BAN* ใดๆก็ตาม การแสดงออกของยีนเหล่านี้ ยังขึ้นอยู่กับยีนซึ่งให้โปรตีนควบคุม *TT2* และ *TTG1* (Transparent testa glabra 1) ซึ่งกำหนดรหัสทรานสคริปชันแฟกเตอร์ในกลุ่ม myb และ WD40 repeats ตามลำดับอีกด้วย

มีรายงานว่า *TT8* *TT2* และ *TTG1* จะทำงานร่วมกันและจำเป็นสำหรับการกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีน *BAN* โดยยีน *TT2* นั้นจะมีความจำเพาะเจาะจงกับการกระตุ้นการแสดงออกของ *BAN* ซึ่งเหมือนกับ *PAP1* และ *PAP2* ที่จำเพาะต่อการแสดงออกของแอนโทไซยานิน ส่วน *TT8* (bHLH) อาจจะมีมีความจำเป็น แต่มีความจำเพาะต่ำกว่า เนื่องจากโปรตีนในโดเมน bHLH ตัวอื่นก็สามารถกระตุ้น *BAN* ได้ เช่น *EGL3* และ *GL3* (Baudry และคณะ 2004)



รูปที่ 2.7 แสดงโครงสร้างของโปรตีนควบคุมในการแสดงออกของยีน *BAN*
ที่มา : Baudry และคณะ 2004

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และสะสมสารแอนโทไซยานินในพืช

2.5.1 การชักนำด้วยแสง (photo induction)

แสงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตสารแอนโทไซยานิน การวิจัยส่วนใหญ่ของแอนโทไซยานินจึงมุ่งศึกษาถึงการชักนำด้วยแสง ศึกษาแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง อัลตราไวโอเลตช่วงที่มองเห็นได้ และช่วง far-red มีการทำวิจัยเพื่อสนับสนุนเรื่องการชักนำด้วยแสง โดยทำการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในที่มืด (Dong และคณะ 1998) มีการศึกษาที่ให้ผลแย้งกับการศึกษาแรก โดยพบว่าปริมาณรังสียูวี-บี ที่มากเกินไปจะทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย และยับยั้งการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Buchholz และคณะ 1995)

2.5.2 การชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำ (cold temperature induction)

การศึกษาเกี่ยวกับการชักนำการสังเคราะห์แอนโทไซยานินโดยใช้อุณหภูมิต่ำ มีการชักนำให้เกิดแอนโทไซยานินในต้นอ่อนของอะราบิโดปซิส (Leyva และคณะ 1995) sorghum (Shichijo และคณะ 1993) และข้าวโพด (Christie และคณะ 1994) วิธีสังเคราะห์ของแอนโทไซยานินมีความเกี่ยวข้องกับ *cor* gene (cold-regulation) ที่อุณหภูมิต่ำมากๆ จะทำลายความสามารถในการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินได้ และจากการศึกษาของ Mckown และคณะ (1996) สนับสนุนว่าการสังเคราะห์แอนโทไซยานินและการทนต่ออุณหภูมิต่ำเป็นจัด มีความเกี่ยวข้องกันทั้งในด้านวิธีสังเคราะห์และวิธีในการควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ และไม่มีแสงจะไม่มีสารสังเคราะห์แอนโทไซยานินเกิดขึ้น เช่นเดียวกับข้อสรุปของ Mol และคณะ (1996) ที่ว่ากลไกการชักนำด้วยอุณหภูมิต่ำและบทบาทหน้าที่ของแสงต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินนั้นยังคงไม่สามารถอธิบายได้

2.5.3 การชักนำทางด้านออสโมติก (Osmotic induction)

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชหลายๆ ชนิดพบว่า การสะสมของแอนโทไซยานินเกิดเนื่องมาจากสภาวะเครียดทางออสโมติก (osmotic pressure) โดยการชักนำของกลูโคส (Tholalakabavi และคณะ 1994) ซูโครส (Cormier และคณะ 1989) และแมนนิทอล (Tholalakabavi และคณะ 1997) ซึ่งความเครียดจากออสโมติกนั้นจะส่งผลให้พืชมีอัตราการดูดซึมน้ำคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง เนื่องจากพืชลดความสามารถในการนำไฟฟ้าของปากใบ นอกจากนี้ยังมีผลในการลดอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงในพืช (Reddy และคณะ 2004) ทำให้พืชสร้างแอนโทไซยานินขึ้นมาเพื่อปรับตัวเอง จากการทดลองในใบของอะราบิโดปซิส (Mita และคณะ 1997) พบว่ามีการสะสมแอนโทไซยานินเมื่อเลี้ยงในอาหารที่น้ำตาลชนิดต่างๆ

2.5.4 การชักนำด้วยความเค็ม (Salt induction)

เมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีดินเค็ม พืชจะทำการส่งสัญญาณเข้าภายในเซลล์ เพื่อให้เซลล์พืชสามารถรับรู้ถึงสภาวะที่เกิดขึ้น โดยเริ่มจากการส่งสัญญาณจากภายนอกไปยังบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และส่งสัญญาณผ่านโซเดียมไอออน (Na^+) เพื่อเข้าสู่เซลล์ (Mark and Romola 2002) ความเครียดนี้จะทำให้พืชเกิดการตอบสนองและปรับตัว ชักนำให้เกิดการสะสมแอนโทไซยานินขึ้น จากการศึกษาในต้นอ่อนของข้าว (Ital and Reddy 2004) ในรากข้าวโพด (Kaliamoorthy and Rao 1994) ใบของ *Morus alba* (Ramanjulu และคณะ 1993)

2.6 วิธีวิเคราะห์แอนโทไซยานิน

2.6.1 การสกัด (Xiaoyan และคณะ 2001)

การวิเคราะห์ด้วยสารสกัดนี้ต้องระวัง เนื่องจากแอนโทไซยานินในสารละลายที่เป็นน้ำไม่คงตัวเมื่ออยู่ใต้แสงที่เข้มที่มีอุณหภูมิสูง การสกัดควรควักจากพืชตัวอย่างที่สามารถสกัดได้โดยวิธีโฮโมจีไนส์ซิ่ง (homogonizing) ในเมทานอล ที่มี 1% ไฮโดรคลอริก (HCl) ถ้าสารสกัดที่ได้มีลักษณะขุ่นสามารถนำไปกรองหรือปั่นเหวี่ยงได้

2.6.2 Column Chromatography

ก่อนที่จะหยดสารสกัดลงบนกระดาษหรือ thin-layer adsorbents สำหรับทำการแยกแต่ละรงควัตถุออกจากกัน ต้องทำให้สารสกัดเข้มข้นก่อน และควรทำในที่อุณหภูมิต่ำเพื่อหลีกเลี่ยงการถูกทำลาย ตัวดูดซับ (absorbent) ที่ใช้โดยทั่วไปใน column chromatography คือ cation-exchange resin, alumina, polyimide polyvinylpyrrolidone (PVP) และ formophenolic resin ในปัจจุบันนิยมใช้ ion-exchange resin แยกทำให้แอนโทไซยานินบริสุทธิ์ ส่วนในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของ

แอนโทไซยานินในสตรอเบอรี่และองุ่นจะใช้ polyimide polyvinylpyrrolidone (PVP) และสามารถใส่ polyamide column ในการวิเคราะห์ส่วนประกอบ และแยกแอนโทไซยานินซึ่งถูกอะซิเลทได้

2.6.3 วิธีการวิเคราะห์อนุพันธ์ของแอนโทไซยานิน

2.6.3.1 การตรวจสอบอนุพันธ์ของน้ำตาล

โดยไฮโครไลสแอนโทไซยานินด้วยกรดในน้ำเดือด 30 นาที เพื่อที่จะได้อะไกลโคน (aglycone) และน้ำตาลออกมา สกัดแอนโทไซยานินด้วยเอมีลแอลกอฮอล์ (amyl alcohol) และอาจใช้การวิเคราะห์น้ำตาลช่วย น้ำตาลที่ได้จะอยู่ในชั้นน้ำ (aqueous phase) หลังจากนั้น ตั้งด้วยเอมีนเพื่อเอากรดออก แล้วแยกน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโทกราฟี และตรวจสอบน้ำตาลด้วยวิธีทั่วไป

2.6.3.2 การตรวจสอบอนุพันธ์ของหมู่เอซิล

กรดของเมดิสซึ่งมีหมู่เอซิลเกาะอยู่ วิเคราะห์โดยการไฮโครไลสด้วยด่างอ่อนๆ และนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทั่วไปหรือใช้ HPLC

2.7 การโคลนยีน (สุรินทร์, 2545)

การโคลนยีนหรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นั้น ในขั้นตอนแรกต้องเตรียมดีเอ็นเอก่อน เมื่อได้ดีเอ็นเอจากแหล่งที่ต้องการแล้ว จึงนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ (vector) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) แล้วจึงนำไปถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ (host) ขั้นตอนในการโคลนยีนมีดังนี้

2.7.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับโคลน

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

2.7.2 เวกเตอร์ (vector)

ชิ้นดีเอ็นเอที่เราต้องการโคลนนี้นั้นมักจะไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาต่อเข้ากับดีเอ็นเออื่นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ คือ ดีเอ็นเอพาหะ หรือเวกเตอร์นั่นเอง เวกเตอร์ คือ ดีเอ็นเอใดๆ ที่มีลักษณะเป็นหน่วยที่สามารถจำลองตัวเองได้ (replicon) หรือจะสามารถแทรกตัวเข้าไปในส่วนของดีเอ็นเอของเซลล์ผู้รับได้โดยวิธีรีคอมบินันชัน ทั้งนี้เนื่องจากยีนหรือส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการถ่ายให้กับเซลล์ผู้รับนั้นมักจะไม่สามารถจำลองตนเอง

ได้ จึงไม่สามารถงออยู่ได้ เวกเตอร์จะทำหน้าที่ 2 อย่าง คือ ป้องกันไม่ให้ชิ้นหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจถูกย่อยซึ่งถูกทำลายโดยเอนไซม์ภายในเซลล์ผู้รับ และช่วยให้มีการจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มปริมาณและถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นต่อไปได้ ช่วยให้ชิ้นที่ใส่เข้าไปนั้นแสดงออก (express) ในเซลล์ผู้รับ เวกเตอร์ที่จะใช้ขึ้นอยู่กับเซลล์ของผู้รับ เวกเตอร์ชนิดหนึ่งอาจเพิ่มปริมาณหรือจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับชนิดหนึ่งหรือสองชนิดเท่านั้น จึงต้องเลือกเวกเตอร์ที่เหมาะสมกับเซลล์ผู้รับที่ใช้ โมเลกุลของเวกเตอร์จะประกอบด้วยส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นในการจำลองตัว (origin of replication) ซึ่งทำงานได้ในเซลล์ผู้รับนั้น คือ มีลักษณะเป็นหน่วยหนึ่งในการจำลองตัว

2.7.3 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

เมื่อเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ที่จะใช้ การเชื่อมคือชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์มี 3 วิธี คือ

2.7.3.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (cohesive end ligation)

2.7.3.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ (blunt end ligation)

2.7.3.3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสคู่สม ซึ่งเกิดจากการต่อเบสชนิดเดียวกันเข้าไปที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่ง โดยเอนไซม์เทอร์มินอล ไดออกซีไรโบไดนิวคลีโอไทล ทรานสเฟอเรส (terminal deoxyribodinucleotidyl transferase) จะเติมไฮโมพอลิเมอร์ที่เป็นคู่สมกันที่ปลายสองข้างของดีเอ็นเอ การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเออาจจะได้ใช้วิธีหนึ่งวิธีใดเพียงวิธีเดียว แต่ใช้หลายวิธี หรือต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน

2.7.4 การนำเวกเตอร์ถูกผสมเข้าสู่เซลล์

การนำเวกเตอร์ถูกผสมเข้าสู่เซลล์ ทำได้หลายวิธีขึ้นกับชนิดของเวกเตอร์ที่ใช้ ถ้าเป็นพลาสมิดจะใช้วิธีใส่ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยตรง เรียกว่า ทรานส์ฟอร์มเมชัน (transformation) โดยทำให้เซลล์ผู้รับ (*Escherichia coli*) ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอภายนอกก่อน (competent cell) โดยใช้สารบางชนิด เช่น แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) หรือ ไอออนบวกอื่นๆ เช่น Mg^{2+} , K^+ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide หรือ DMSO) เป็นต้น นำเซลล์ที่อยู่ในสภาพที่พร้อมนี้มาใส่รวมกับพลาสมิดที่ตัดต่อกับดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พลาสมิดดีเอ็นเอจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อเอนไซม์ที่ผนังเซลล์ของ *Escherichia coli* แล้วจึงทำให้ส่วนผสมของเซลล์และพลาสมิดนี้เปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอนั้นจะแทรกเข้าสู่เซลล์ได้ ประสิทธิภาพของการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธีทรานส์ฟอร์มเมชันนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น รูปร่างและ

ขนาดของพลาสมิด ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ และวิธีการเตรียมเซลล์สำหรับการถ่ายโอน เป็นต้น พลาสมิดที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนปลายปิดและพันเป็นเกลียวซ้อน (supercoil) จะเข้าเซลล์ได้ดีกว่า พลาสมิดแบบเส้นตรงหรือวงแหวนปลายเปิด พลาสมิดที่มีขนาดเล็กจะเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่า พลาสมิดที่มีขนาดใหญ่ ถ้าพลาสมิดขนาดใหญ่กว่า 15 กิโลเบส จะมีประสิทธิภาพต่ำมาก ระยะของเซลล์ที่ดีที่สุดในการทำเป็นคอมพีเทนท์ คือ เซลล์ที่เจริญถึงระยะ log phase

2.7.5 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ

วิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการนั้น ทำได้หลายวิธีขึ้นกับเวกเตอร์ที่ใช้และที่มาของโคลน โดยมีวิธีในการตรวจหาโคลนที่ต้องการได้หลายวิธี ดังนี้

- 2.7.5.1 การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection)
- 2.7.5.2 การตรวจหาโดยวิธีทางอิมมูโนเคมี
- 2.7.5.3 การตรวจหาโดยวิธีนิวคลีอิกแอซิดไฮบริดไดเซชัน (nucleic acid hybridization)

2.8 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

สุรินทร์ (2545) Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการของการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลอง แต่จะทำปฏิกริยาอย่างต่อเนื่องโดยอาศัยดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA Polymerase) ในการทำปฏิกริยาร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 เส้นที่มีทิศทางในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเข้าหากันเป็นจุดเริ่มต้น ในการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมาเอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส นำนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (A T G C) มาต่อกันเป็นปลายดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันบนสายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถกำหนดปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย นำไพรเมอร์ทั้งสองชนิดไปรวมกับดีเอ็นเอที่เป็นเป้าหมาย (target DNA) โดยใส่ในปริมาณที่มากเกินไปพอ หลังจากนั้นทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน (denaturation) แล้วจึงลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์เข้ามาจับคู่ (annealing) กับเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการอย่างถูกต้อง เปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส ก็จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น (extension) ทำเช่นนี้ 30-40 รอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการก็จะเพิ่มเป็นล้านเท่า

2.9 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้โมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลายสารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้ามนอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายดีเอ็นเอ จึงมีประจุเป็นลบที่เพียงพอเป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอได้แก่ ขนาดของโมเลกุล รูปแบบของดีเอ็นเอ เพลอร์เซ็นต์และชนิดของเจล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และบัฟเฟอร์ที่ใช้

2.10 วิธีการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

วิธีการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย เป็นวิธีการถ่ายยีนโดยใช้พาหะเป็นตัวกลางในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช และเกิดกระบวนการเชื่อมต่อระหว่างสารพันธุกรรมที่ทำการส่งถ่ายกับจีโนมของพืช จากการค้นพบกลไกการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินที่เข้าบุกรุกทำลายพืชทางบาดแผล เป็นสาเหตุของอาการปุ่มปม (crown gall) บริเวณลำต้นของพืชใบเลี้ยงคู่อีกหลายชนิด ภายในเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีดีเอ็นเอพิเศษมีลักษณะเป็นวงแหวนขนาดเล็กอยู่ในส่วนไซโทพลาสซึมซึ่งถูกเรียกว่า พลาสมิด Ti (Tumour inducing plasmid) บนพลาสมิด Ti มีส่วนดีเอ็นเอที่เรียกว่า T-DNA ซึ่งมีอินที่ก่อให้เกิดอาการปุ่มปม ในเซลล์พืชประกอบด้วยยีนที่ควบคุมการผลิตฮอร์โมนพืชพวกออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งมีผลต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และยีนสร้างสารประกอบพวกโอปิ่นที่เพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน เชื้ออะโกรแบคทีเรียมีความสามารถในการส่งถ่ายส่วนของ T-DNA บนพลาสมิด Ti เข้าสู่เซลล์พืช บริเวณบาดแผลที่เชื้อเข้าบุกรุก T-DNA จะเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมพืช ทำให้เซลล์พืชเกิดการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ แสดงอาการปุ่มปมจากผลของฮอร์โมน ทำการสร้างสารประกอบพวกโอปิ่นซึ่งจะถูกเชื้ออะโกรแบคทีเรียมนำไปใช้ และสามารถส่งถ่ายพลาสมิด Ti ไปยังเซลล์ของแบคทีเรียที่ไม่มีพลาสมิดเพื่อนำสารประกอบโอปิ่นไปใช้ประโยชน์ได้ การใช้พลาสมิด Ti ในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่พืชทำได้โดยการแทนที่อินที่เกี่ยวกับการสร้างฮอร์โมนพืช และยีนสร้างโอปิ่นด้วยยีนควบคุมลักษณะที่ต้องการบนส่วนของ T-DNA แล้วให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียทำการส่งถ่ายนำเข้าสู่เชื่อมต่อกับโครโมโซม

พืช เพื่อให้เกิดการแสดงออกในลักษณะที่ต้องการ การถ่ายโอนยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมเป็นพาหะในการนำยีนเข้าสู่เซลล์พืชประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงคู่ แต่ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและธัญพืชยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ปัญหาสำคัญของการถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวคือ อะโกรแบคทีเรียมจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชที่จะเข้าบุกรุก ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจไม่ได้เป็นพืชอาศัยของเชื้ออะโกรแบคทีเรียม ทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพต่ำมีสาเหตุสำคัญ คือ ลักษณะทางกายภาพของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่มีความแตกต่างกันทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายโอนยีน เชื้ออะโกรแบคทีเรียมจะตอบสนองต่อสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อพืชเกิดบาดแผล ซึ่งจะกระตุ้นให้เชื้ออะโกรแบคทีเรียมในดินเคลื่อนที่เข้าบุกรุกพืชทางบาดแผล แต่บาดแผลที่เกิดในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะไม่มีการสร้างสารฟีนอลิกขึ้น หรือมีแต่การสร้างในปริมาณน้อย ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการบุกรุกของเชื้อต่ำลง รวมทั้งเซลล์ที่เกิดบาดแผลไม่แสดงการแบ่งตัวเหมือนในพืชใบเลี้ยงคู่ จึงมีการพัฒนาวิธีการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นในหลายๆ ปัจจัยของการถ่ายยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การโคลนยีน *PAP* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

3.1.1 ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PAP* และตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *PAP* โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมซึ่งมีปฏิกิริยาของการทำพีซีอาร์ ดังนี้

cDNA จาก <i>Arabidopsis</i>	1	ไมโครลิตร
dNTP (10mM)	1	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25mM)	5	ไมโครลิตร
10X buffer	5	ไมโครลิตร
แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (5U/ μ l)	0.4	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
รีเวอร์สไพรเมอร์	1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	35.6	ไมโครลิตร
รวม	50	ไมโครลิตร

มีสภาวะในการทำพีซีอาร์ คือ การทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพตามธรรมชาติ (denaturing) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที การทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และการต่อเติมสายดีเอ็นเอ (extension) จากไพรเมอร์โดยการทำงานของเอนไซม์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำทั้งหมด 40 รอบ

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับ *PAP* มีลำดับเบสเป็นดังนี้

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

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

โดย R หมายถึง A และ G

Y หมายถึง C และ T

M หมายถึง A และ C

และตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นแยกชิ้นส่วน *PAP* จากเจลอะกาโรส โดยใช้วิธีตาม *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* ของ *Amersham Phamacia Biotech*

3.1.2 ทำการเชื่อมต่อ และถ่ายโอนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ที่มีขนาดตามต้องการกับเวกเตอร์ *pGEM* โดยใช้เทคนิค *T-A cloning* โดยปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ ประกอบด้วย

ชิ้นดีเอ็นเอที่แยกมาจากการทำพีซีอาร์	3	ไมโครลิตร
เวกเตอร์ <i>pGEM</i>	1	ไมโครลิตร
<i>2X ligase buffer</i>	5	ไมโครลิตร
<i>T4 DNA ligase</i>	1	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่ม 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วบ่ม 22 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมงก่อนทำการถ่ายโอน

ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์ เข้าสู่ *Escherichia coli* และคัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็ง *LB* (ภาคผนวก ก) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน *IPTG* และ *X-gal* บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกได้ คัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* มีปฏิกิริยาดังนี้

พลาสมิดที่คัดเลือกได้	3	ไมโครลิตร
<i>10X buffer E</i>	1	ไมโครลิตร
<i>BamHI</i> (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
<i>BSA</i>	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.75	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.1.3 ทำการตรวจสอบชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด

ตรวจสอบชิ้นส่วนของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิดว่าเป็นยีน *PAP1* หรือยีน *PAP2* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ยีน *PAP1* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*T14I มีปฏิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	4	ไมโครลิตร
10X multi core buffer	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
<i>Eco</i> T14I (8 unit/ μ l)	0.2	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	4.55	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ยีน *PAP2* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III มีปฏิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	4	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.15	ไมโครลิตร
<i>Hind</i> III (15 unit/ μ l)	0.1	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	4.65	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่ม 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากพลาสมิด และทำให้ชิ้นดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์

3.2 การเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

3.2.1 การเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้วเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pBI121 และ pHTT202 ปฏิริยาดังนี้
เป็นดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปฏิบัติการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

	pBI121 เชื่อมต่อกับ <i>PAP1</i>	pBI121 เชื่อมต่อกับ <i>PAP2</i>	pHTT202 เชื่อมต่อกับ <i>PAP2</i>
DNA	5 ไมโครลิตร	3 ไมโครลิตร	3 ไมโครลิตร
10x ligase buffer	1.5 ไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
vector	3 ไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร	3 ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1.5 ไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
น้ำดีไอออนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	4 ไมโครลิตร	3 ไมโครลิตร	2 ไมโครลิตร
รวม	15 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร

บ่มที่ 22 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

ถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อเข้าสู่ *Escherichia coli* และคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการถ่ายโอนยีนบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินสำหรับเวกเตอร์ pBI121 และอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินสำหรับเวกเตอร์ pHTT202 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วทำการสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่คัดเลือกได้ ทำการคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจแทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยมีปฏิกริยาดังนี้

พลาสมิดที่ได้รับการคัดเลือก	3 ไมโครลิตร
10X buffer E	1 ไมโครลิตร
<i>Bam</i> HI (10 unit/ μ l)	0.15 ไมโครลิตร
BSA	0.1 ไมโครลิตร
น้ำดีไอออนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.75 ไมโครลิตร
รวม	10 ไมโครลิตร

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2.2 การคัดเลือกพลาสมิดที่ให้การแสดงออกของยีน *PAP*

ทำการคัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางของจีนดีเอ็นเอที่แทรกทิศทางเดียวกันกับ โปรโมเตอร์ (sense) และพลาสมิดที่มีจีนดีเอ็นเอแทรกอยู่กลับทิศทางกับ โปรโมเตอร์ (antisense) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

พลาสมิด pBI121 และ pHTT202 ที่มียีน *PAP1* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยมีปฏิกริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	4	ไมโครลิตร
multicore buffer	1	ไมโครลิตร
<i>Eco</i> T14I (10 unit/μl)	0.15	ไมโครลิตร
<i>Hind</i> III (15 unit/μl)	0.1	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออนไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	4.65	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่ม 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

พลาสมิด pBI121 และ pHTT202 ที่มียีน *PAP2* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยมีปฏิกริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	3	ไมโครลิตร
10X buffer E	1	ไมโครลิตร
<i>Hind</i> III (10 unit/μl)	0.15	ไมโครลิตร
BSA	0.1	ไมโครลิตร
น้ำดีไอออนไนซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.75	ไมโครลิตร
รวม	10	ไมโครลิตร

บ่ม 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่โกรแบคทีเรีย

การสร้างสายพันธุ์โกรแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุมโดยถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการเข้าสู่โกรแบคทีเรีย โดยใช้สายพันธุ์โกรแบคทีเรีย ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายโอนเวกเตอร์แต่ละชนิด

ยีนที่ทำการทดลอง	ที่มา	เวกเตอร์ที่ใช้	สายพันธุ์ <i>Agrobacterium</i> ที่ใช้
<i>myb-p1</i> sense	Chiba university	pHTT202	C58C1
<i>myb-p1</i> antisense	Chiba university	pHTT202	C58C1
<i>myc-rp</i> sense	Chiba university	pHTT202	C58C1
<i>PAP1, PAP2</i> sense, antisense	PCR	pHTT202 pBI121	C58C1 LBA4404

ถ่ายโอนยีนพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการเข้าสู่อะโกรแบคทีเรีย โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินสำหรับเวกเตอร์ pBI121 และอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และสเตรปโตมัยซินสำหรับเวกเตอร์ pHTT202 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3.4 ศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชทดลองโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

3.4.1 การถ่ายโอนอะโกรแบคทีเรียเข้าสู่ต้นยาสูบ

ถ่ายโอนอะโกรแบคทีเรียเข้าสู่ต้นยาสูบ โดยทำการเลี้ยงใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนบนอาหาร MS สูตรชักนำให้เกิดแคลลัส (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นทำการย้ายไปวางบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และคาเบนนิซิลิน เพื่อทำการฆ่าอะโกรแบคทีเรีย ทุก 2 สัปดาห์ทำการเปลี่ยนอาหาร

3.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

การศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน โดยทำการนับจำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ และทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนของอะโกรแบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์

3.5 คัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน

3.5.1 คัดเลือกต้นพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์

ทำการคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนโดยคัดเลือกต้นพืชทดลองที่มีลักษณะที่สมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้น ใบมีสีเขียวและมีราก แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS ปกติ

3.5.2 ตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ

นำพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์ และมีลักษณะใกล้เคียงกันนำมาทดสอบสภาวะเครียด คือ ทำการทดสอบสภาวะทนเค็ม และสภาวะแรงดันออสโมติก โดยทำการเลี้ยงต้นพืชทดลองที่มียีนที่ได้รับการถ่ายโอนอยู่ใน 3 สภาวะ คือ สภาวะปกติเพื่อใช้เป็นต้นควบคุม สภาวะทนเค็ม และสภาวะแรงดันออสโมติก

พืชทดลองต้นควบคุมจะเลี้ยงในอาหาร MS ปกติ ส่วนพืชทดลองที่เลี้ยงเพื่อทดสอบสภาวะทนเค็ม จะเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีสารโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ความเข้มข้น 150 mM ส่วนพืชทดลองที่เลี้ยงเพื่อทดสอบสภาวะแรงดันออสโมติก จะเลี้ยงในอาหาร MS ที่ใส่แมนนิทอล (mannitol) ความเข้มข้น 0.3 M แล้วทำการเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นสกัดสารมาวัดปริมาณแอนโทไซยานินที่สะสมอยู่ในพืชทดลอง



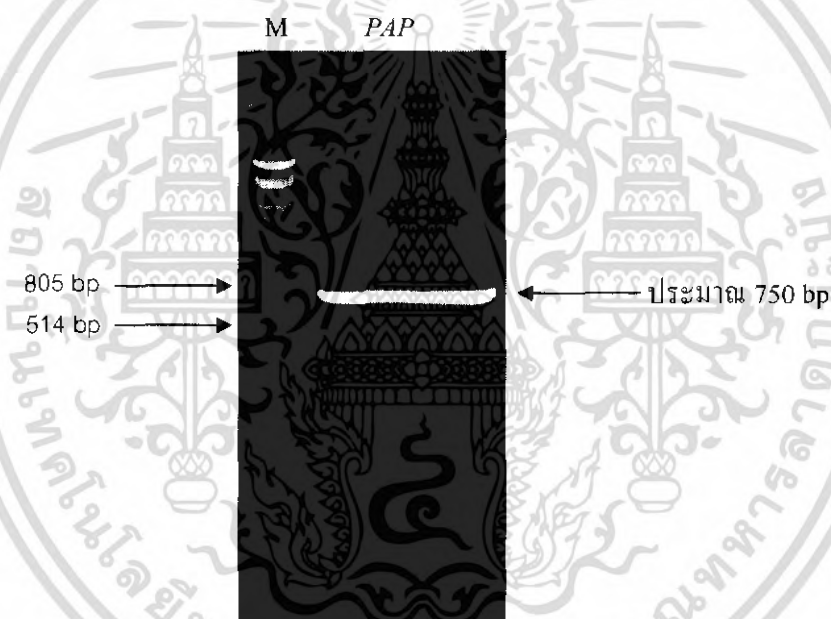
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

4.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณยีนควบคุม *PAP* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนควบคุมกลุ่ม *PAP* และตรวจผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.1 คาดว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้น่าจะเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PAP* เนื่องจากมีขนาดประมาณ 750 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับข้อมูลใน GenBank



รูปที่ 4.1 แสดงผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์สำหรับยีนควบคุม *PAP* จากเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ (M หมายถึง ดีเอ็นเอมาตรฐาน *PAP* หมายถึง ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์)

4.1.2 ผลการเชื่อมต่อและการถ่ายโอนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ

เมื่อทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจลและนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM โดยใช้เอนไซม์ไลกาส นำสารละลายที่ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาถ่ายโอนเข้าสู่ *Escherichia coli* และทำการคัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่โดยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal ได้ผลดังรูปที่ 4.2

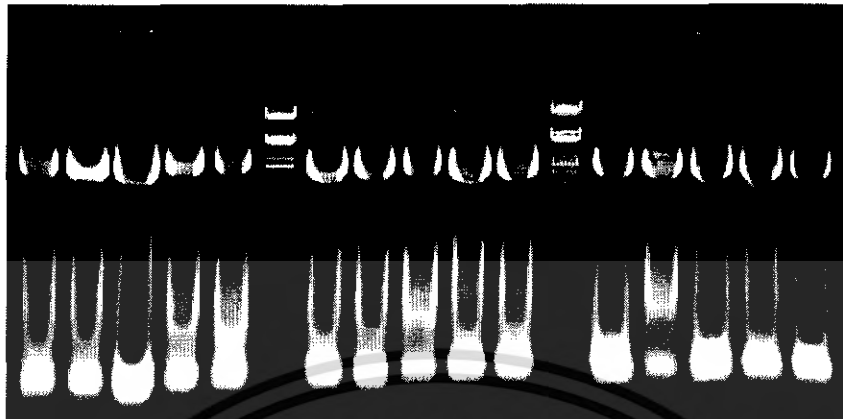


รูปที่ 4.2 โคโลนีของ *Escherichia coli* ที่ได้รับเวกเตอร์ pGEM บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน IPTG และ X-gal

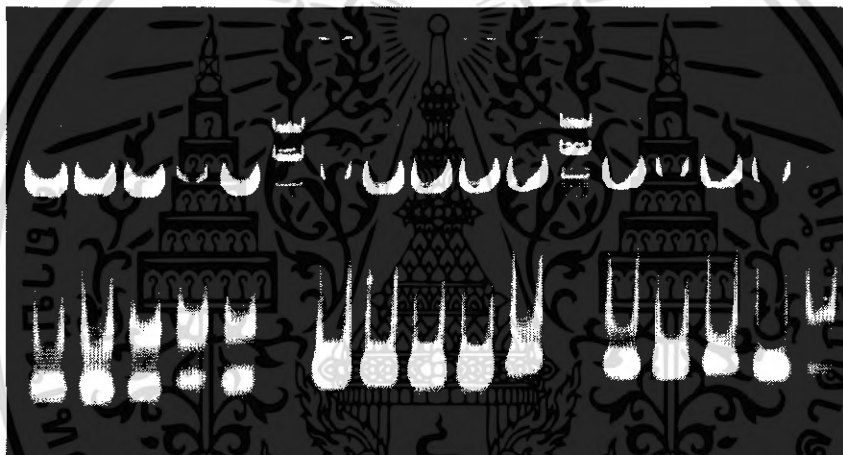
เซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pGEM จะสามารถเจริญได้บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เนื่องจากภายในพลาสมิดมียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิดนี้อยู่ ซึ่งโคโลนีที่ได้จะมี 2 ลักษณะ ได้แก่ โคโลนีสีขาว ซึ่งคาดว่าพลาสมิดนี้มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ การแทรกของชิ้นดีเอ็นเอนี้จะเกิดในยีน *lacZ* ทำให้ได้เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสที่มีลักษณะผิดปกติ จึงไม่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (X-gal) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าได้ และโคโลนีสีฟ้า ซึ่งคาดว่าพลาสมิดไม่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ ทำให้เอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสสามารถทำงานได้ตามปกติ จึงสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (X-gal) ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้า จึงเห็นโคโลนีเป็นสีฟ้า

คัดเลือกโคลนของ *Escherichia coli* ที่ให้โคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าจะมีพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่มาสกัดพลาสมิดและตรวจผลการสกัดพลาสมิดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.3

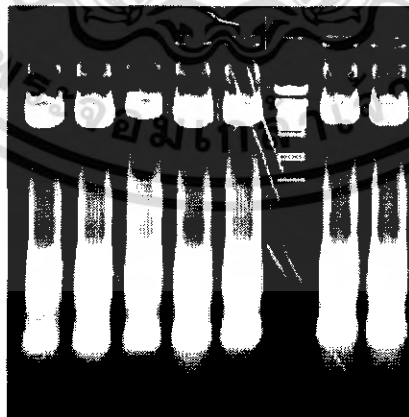
1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15



16 17 18 19 20 M 21 22 23 24 25 M 26 27 28 29 30



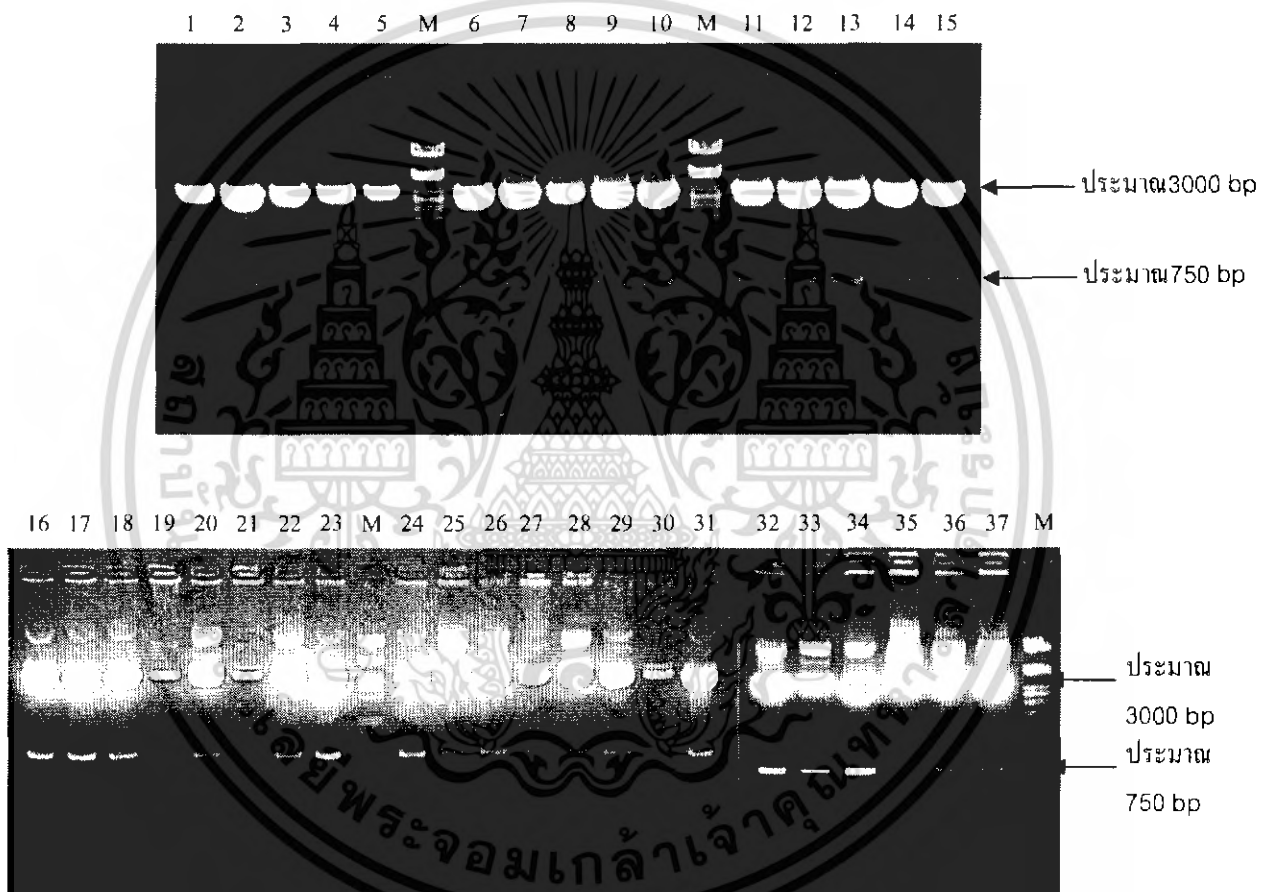
31 32 33 34 35 M 36 37



รูปที่ 4.3 แสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคลนีสีขาวจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนดีเอ็นเอ
(1-37 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

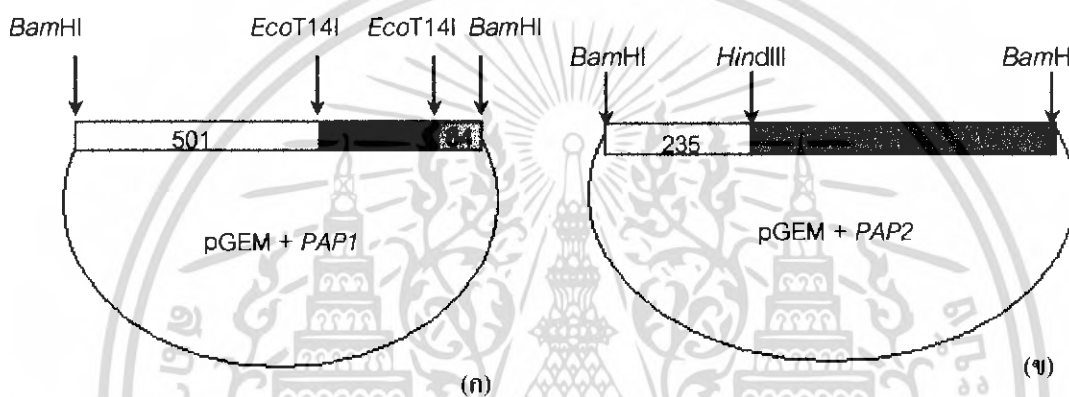
การคัดเลือกพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.4 จากการตัดพลาสมิด pGEM ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่ามีส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสแทรกอยู่ พบว่าโคลนหมายเลข 1 ถึง 37 มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสแทรกอยู่ ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์



รูปที่ 4.4 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่คาดว่ามีส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบสแทรกอยู่ (1-37 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ซึ่งเป็นหมายเลขเดิมกับรูปที่ 4.3 และตัดด้วย *Bam*HI M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

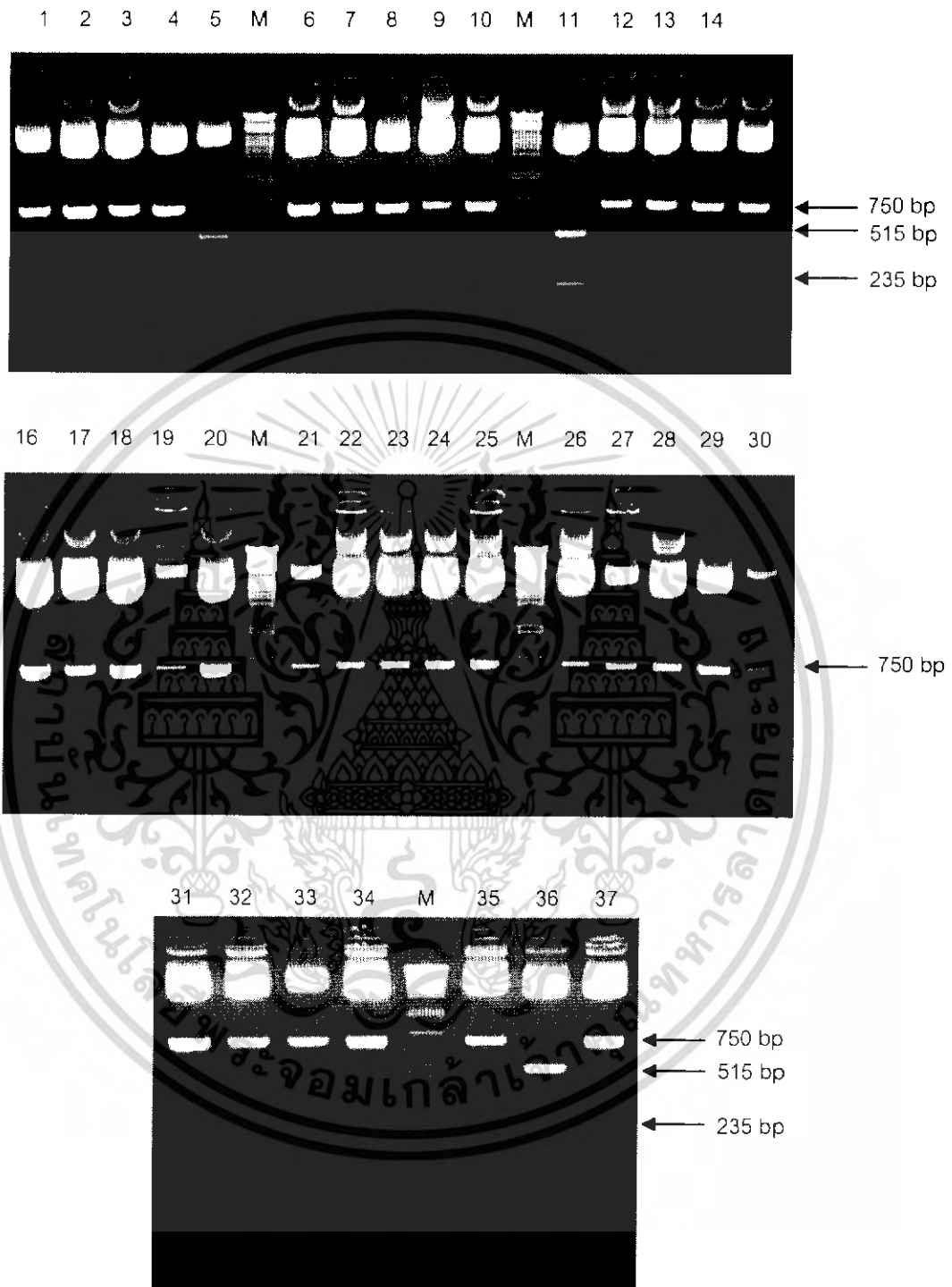
4.1.3 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM

จากข้อมูลของ GenBank *PAP1* ไม่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bam*HI แต่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Eco*T14I โดยเมื่อตัด *PAP1* ซึ่งมีขนาด 747 คู่เบส ด้วย *Eco*T14I จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้น ซึ่งมีขนาด 501, 182 และ 64 คู่เบส ดังรูปที่ 4.5 ก และสำหรับ *PAP2* ไม่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bam*HI แต่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Hind*III โดยเมื่อตัด *PAP2* ซึ่งมีขนาด 750 คู่เบส ด้วย *Hind*III จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ซึ่งมีขนาด 515 และ 235 คู่เบส ดังรูปที่ 4.5 ข ส่วนพลาสมิด pGEM ไม่มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *Bam*HI, *Eco*T14I และ *Hind*III



รูปที่ 4.5 ก และ ข แสดงจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์บนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *PAP1* และ *PAP2* ตามลำดับ

ทำการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิด โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.6

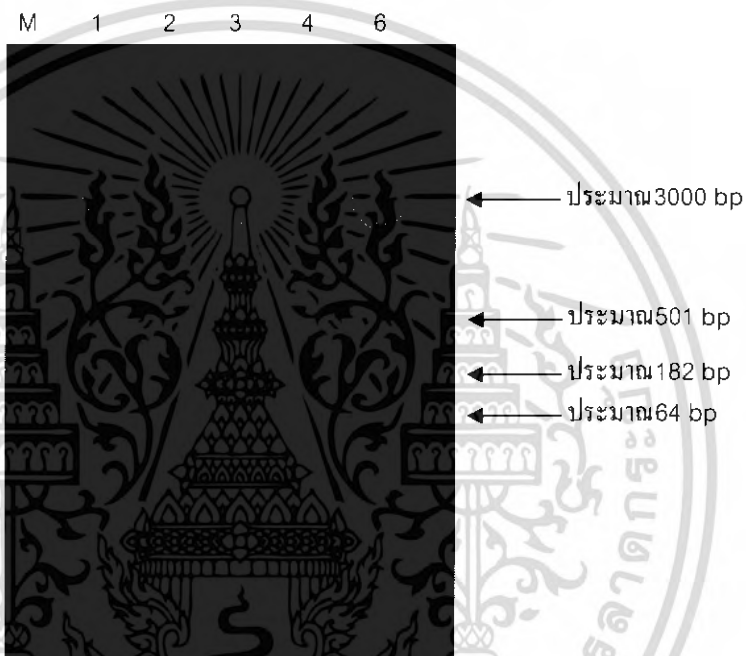


รูปที่ 4.6 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III เพื่อตรวจสอบชนิดของชิ้นดีเอ็นเอ (1-37 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ ซึ่งเป็นหมายเลขเดิมกับรูปที่ 4.4 และตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากการตัดพลาสมิดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III ในเบื้องต้นคาดว่าโคลนหมายเลข 5, 11 และ 36 น่าจะเป็น *PAP2* เนื่องจากพบแถบของดีเอ็นเอ 3 ชั้น ได้แก่ แถบของเวกเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 3000 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด *PAP2* ด้วย *Hind*III

จากนั้นจึงนำโคลนที่เหลือหมายเลข 1, 2, 3, 4 และ 6 ที่ไม่ใช่ *PAP2* มาตัดวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*T14I ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 50 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.7

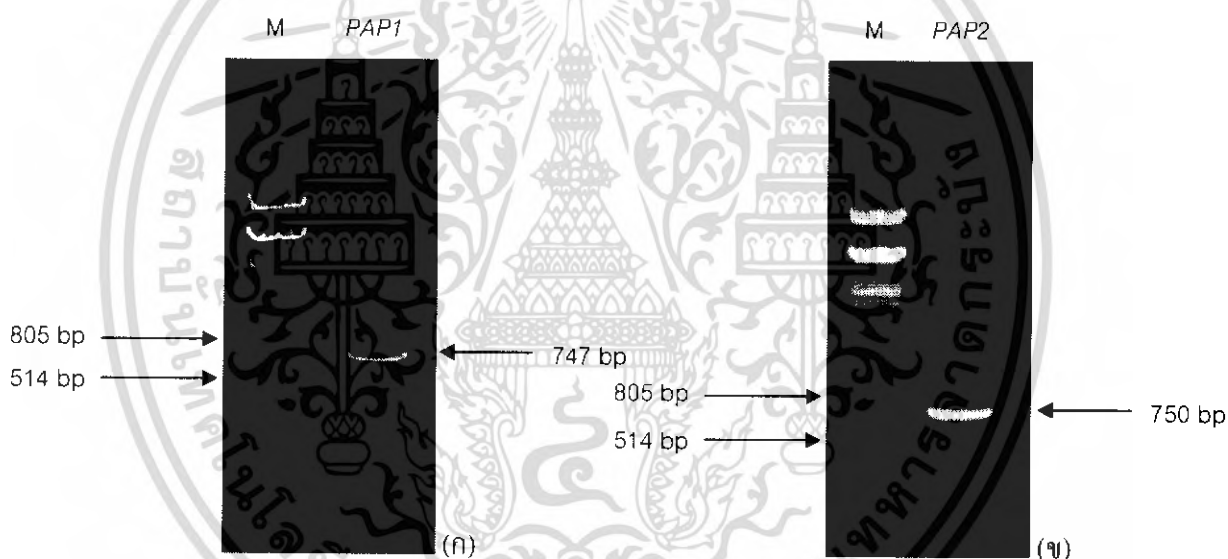


รูปที่ 4.7 ผลการตัดพลาสมิด pGEM ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Eco*T14I เพื่อตรวจสอบชนิดของชิ้นดีเอ็นเอ (1-4 และ 6 คือ หมายเลขโคลนของพลาสมิดที่สกัดได้ซึ่งเป็นหมายเลขเดิมกับรูปที่ 4.4 และตัดด้วย *Bam*HI และ *Hind*III M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน) (หมายเหตุ ; แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 64 bp เมื่อส่องดูด้วยแสง UV สามารถสังเกตเห็นได้แต่เมื่อถ่ายภาพจะไม่ปรากฏให้เห็นอาจเป็นเพราะขีดจำกัดของความสามารถของกล้องถ่ายภาพ)

หลังจากการตัดพลาสมิดด้วย *Bam*HI และ *Eco*T14I ในเบื้องต้นคาดว่าทุกโคลนน่าจะเป็น *PAP1* เนื่องจากพบแถบของดีเอ็นเอจำนวน 4 ชั้น ได้แก่ แถบของเวกเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 3000 คู่เบส และแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด *PAP1* ด้วย *Eco*T14I

อย่างไรก็ตามได้คัดเลือกโคลนหมายเลข 2 ซึ่งคาดว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่น่าจะเป็น *PAP1* และโคลนหมายเลข 11 ซึ่งคาดว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่น่าจะเป็น *PAP2* นำไปทดลองในขั้นต่อไปได้จากการศึกษาโดยการถ่ายโอนยีน *PAP1* หรือ *PAP2* ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *CaMV35S* และเทอร์มินเตอร์จากยีนที่กำหนดรหัสของ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxidase เข้าสู่ยาสูบ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP2* มีการผลิตแอนโทไซยานินมากกว่า ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *PAP1* (Borevitz และคณะ 2000)

แยกชิ้นดีเอ็นเอของยีน *PAP1* และ *PAP2* ที่ต้องการออกจากพลาสมิด pGEM โดยใช้โคลนหมายเลข 2 และหมายเลข 11 ตามลำดับ และทำให้ชิ้นดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์ ตรวจสอบโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.8 ก และ ข



รูปที่ 4.8 ก และ ข แสดงผลการแยกชิ้นดีเอ็นเอของ *PAP1* และ *PAP2* ออกจากพลาสมิด pGEM โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจสอบผลโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (*PAP1* คือ ชิ้นดีเอ็นเอ *PAP1* ซึ่งได้จากโคลนของพลาสมิดหมายเลข 2 และ *PAP2* คือ ชิ้นดีเอ็นเอ *PAP2* ซึ่งได้จากโคลนของพลาสมิดหมายเลข 11 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

4.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ *Agrobacterium* expression vector

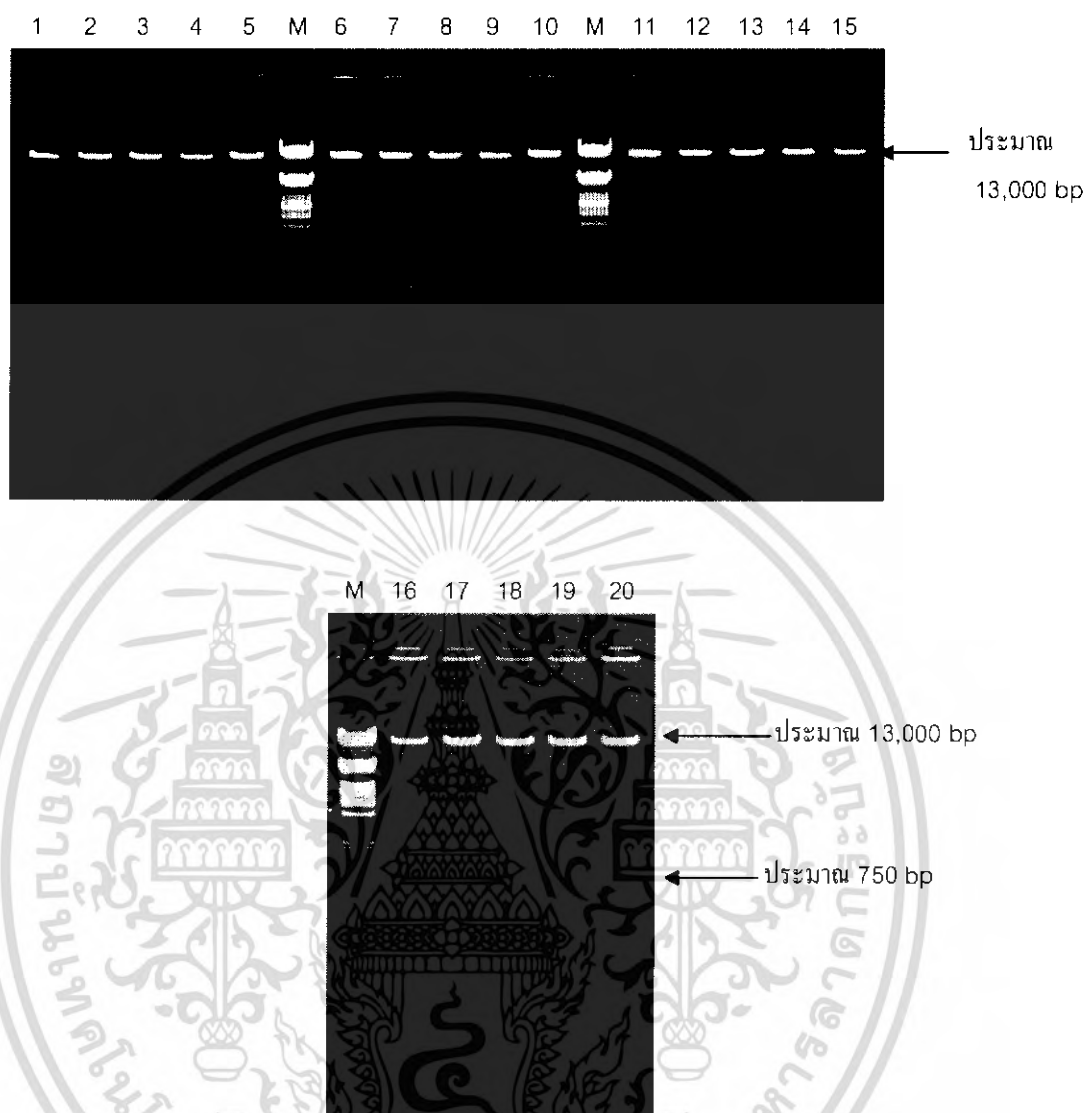
4.2.1 ผลการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เป็น *Agrobacterium* expression vector

ทำการถ่ายโอนสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ *PAP1* กับเวกเตอร์ pBI121 และ *PAP2* กับเวกเตอร์ pHTT202 และเวกเตอร์ pBI121 เข้าสู่ *Escherichia coli* และการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pHTT202 โดยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด pBI121 โดยการเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน เนื่องจากพลาสมิดแต่ละชนิดมียีนต้านยาปฏิชีวนะชนิดดังกล่าวอยู่

คัดเลือกโคโลนีของ *Escherichia coli* ที่มีพลาสมิด pHTT202 หรือพลาสมิด pBI121 แบบสุ่ม และสกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่คัดเลือกได้ ตรวจสอบผลการสกัดพลาสมิดโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากนั้นทำการคัดเลือกพลาสมิด pBI121 ที่มีดีเอ็นเอ *PAP1* แทรกอยู่ โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.9

จากการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วย *Bam*HI พบว่าโคโลนีหมายเลข 16, 17 และ 19 มีดีเอ็นเอแทรกอยู่จากทั้งหมด 20 โคโลนี ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ *PAP1* และเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 4.1.3 ดีเอ็นเอที่ได้คาดว่าเป็น *PAP1* ดังนั้นโคโลนีหมายเลข 16, 17 และ 19 จึงน่าจะเป็นพลาสมิด pBI121 ที่มี *PAP1* แทรกอยู่



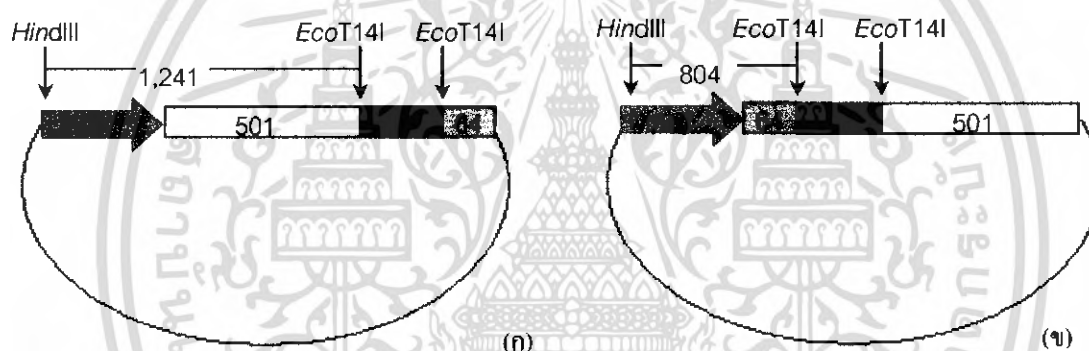
รูปที่ 4.9 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ด้วย *Bam*HI เพื่อคัดเลือกพลาสมิดที่กล่าวว่ามีชิ้นดีเอ็นเอ *PAP1* แทรกอยู่ (1-20 คือ หมายเลขโคเลนของพลาสมิดที่สกัดได้และตัดด้วย *Bam*HI M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน)

เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ *PAP2* สามารถตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pHTT202 และเวกเตอร์ pBI121 ได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงชนิดเดียวคือเอนไซม์ *Hind*III จึงได้นำไปตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอโดยไม่ได้ตรวจสอบว่าเวกเตอร์มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่หรือไม่ เพราะเวกเตอร์ทั้งสองชนิดมีจุดตัดเพียงตำแหน่งเดียวบนเวกเตอร์ถ้าเวกเตอร์ไม่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกอยู่เมื่อนำไปตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

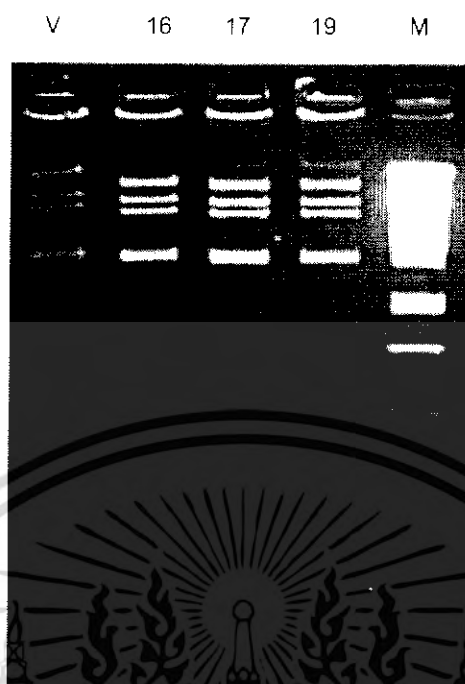
4.2.2 ผลการคัดเลือกพลาสมิดที่ให้การแสดงออกของยีน *PAP*

จากข้อมูลของ GenBank *PAP1* มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *EcoT14I* ที่เบสลำดับที่ 501 และ 683 ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 ชิ้น ซึ่งมีขนาด 501, 182 และ 64 คู่เบส และพลาสมิด pBI121 มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *HindIII* 1 ตำแหน่งที่บริเวณหน้าโปรโมเตอร์ เมื่อตัดพลาสมิด pBI121 ด้วย *HindIII* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ซึ่งมีขนาด 740 และ 12,318 คู่เบส ดังนั้นเมื่อ *PAP1* แทรกอยู่ในพลาสมิด pBI121 ถ้าตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว จะสามารถคัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ หรือกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์ได้ โดย pBI121 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *EcoT14I* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 182, 1241 และ 12,382 คู่เบส ดังรูปที่ 4.10 ก แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่กลับทิศทางกับโปรโมเตอร์เมื่อตัดแล้วจะได้ 182, 804 และ 12,979 คู่เบส ดังรูปที่ 4.10 ข



รูปที่ 4.10 ก และ ข แสดงทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นดีเอ็นเอ *PAP1* กับพลาสมิด pBI121 และจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* และ *EcoT14I* (รูป ก ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์(sense) และ ข ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกกลับทิศทางกับ โปรโมเตอร์(antisense))

คัดเลือกพลาสมิด pBI121 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอ *PAP1* ที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ (sense) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoT14I* และ *HindIII* ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.11

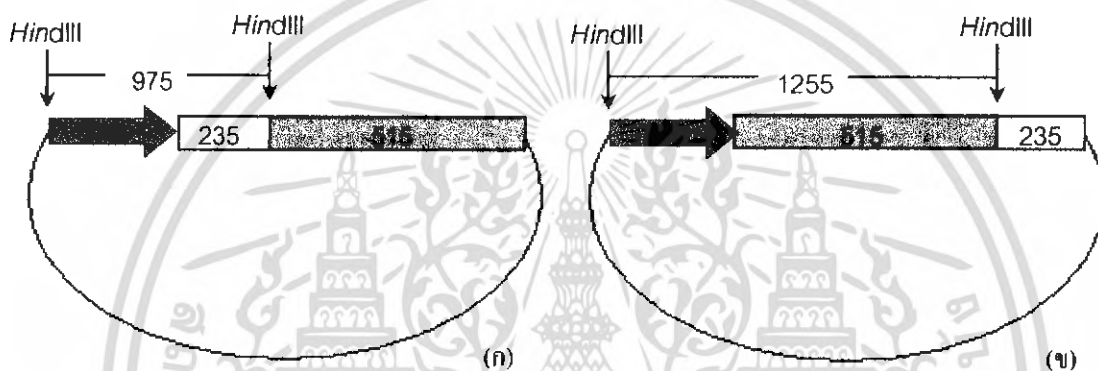


รูปที่ 4.11 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *PAPI* ด้วย *HindIII* และ *EcoT14I* เพื่อคัดเลือกพลาสมิด ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ (sense) (หมายเลข 16, 17 และ 19 คือ โคลนของพลาสมิด pBI121 ที่น่าจะมี *PAPI* แทรกอยู่ซึ่งเป็นหมายเลขเดียวกับรูปที่ 4.9 V คือเวกเตอร์ pBI121 M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน)

จากการตัดโคลนหมายเลข 16, 17 และ 19 ปรากฏว่าไม่ได้ชิ้นดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุ คือ

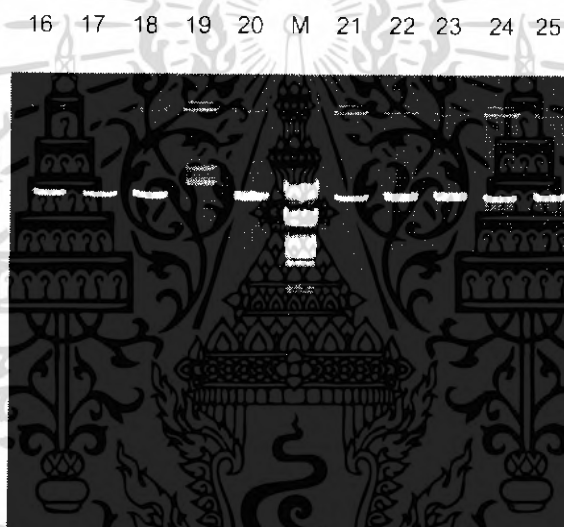
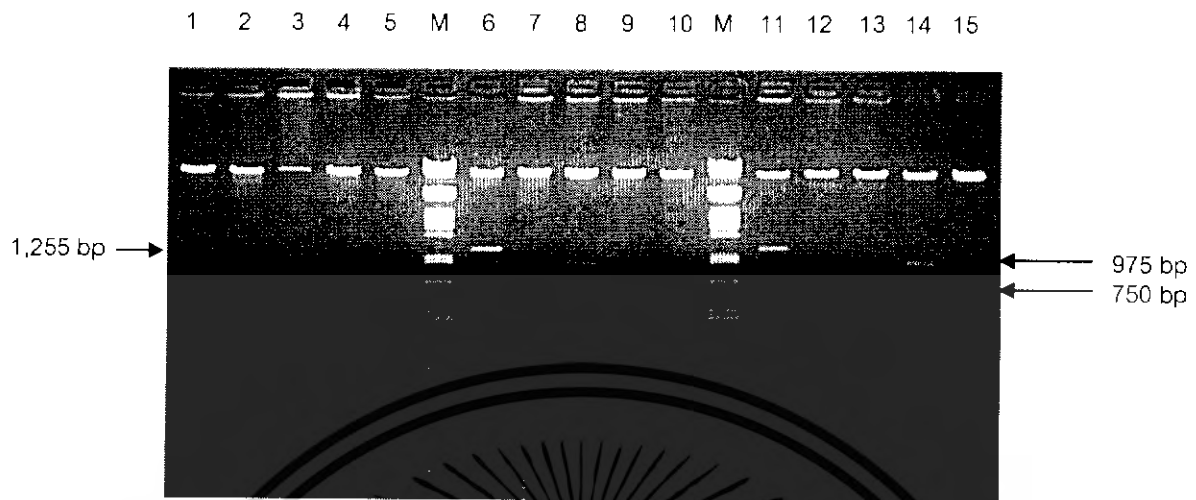
- เอนไซม์ *EcoT14I* ที่ใช้มีจุดจดจำเพียง 4 เบส คาดว่าเกิดการตัดภายในพลาสมิดที่ไม่ทราบจุดตัดที่แน่นอน จึงไม่สามารถคำนวณขนาดที่แน่นอนได้

จากข้อมูลของ GenBank *PAP2* มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *HindIII* ที่เบสลำดับที่ 235 ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ซึ่งมีขนาด 235 และ 515 คู่เบส เมื่อ *PAP2* แทรกอยู่ในพลาสมิด pBI121 ถ้าตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวจะสามารถคัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ หรือกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์ได้ โดย pBI121 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 975 คู่เบส ดังรูปที่ 4.12 ก แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่กลับทิศทางกับโปรโมเตอร์เมื่อตัดแล้วจะได้ 1,255 คู่เบส ดังรูปที่ 4.12 ข



รูปที่ 4.12 ก และ ข แสดงทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นดีเอ็นเอ *PAP2* กับพลาสมิด pBI121 และจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (รูป ก ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ (sense) และ ข ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์ (antisense)(หมายเหตุ ; ลูกศรแทนโปรโมเตอร์ CaMV 35S) (หมายเหตุ ; ลูกศรแทนโปรโมเตอร์ CaMV 35S))

การคัดเลือกพลาสมิด pBI121 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอ *PAP2* ที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ (sense) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.13

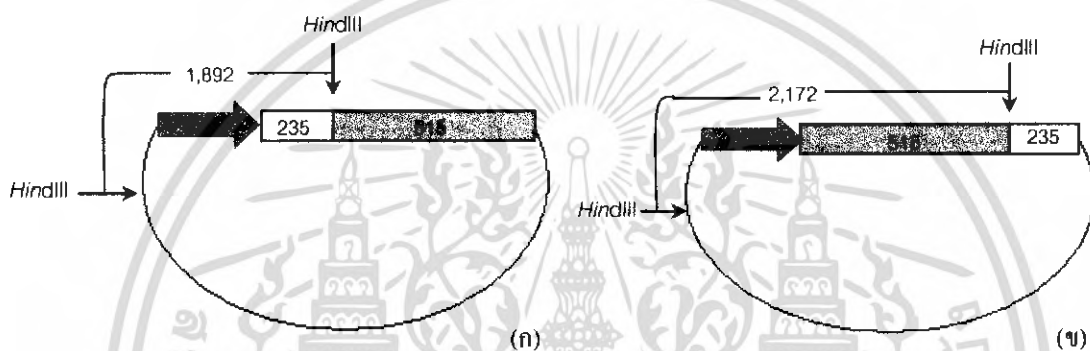


รูปที่ 4.13 ผลการตัดพลาสมิด pBI121 ที่มีซันดีเอ็นเอ *PAP2* ด้วย *HindIII* เพื่อคัดเลือกพลาสมิด ที่มีทิศทางของซันดีเอ็นเอแทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับ โปรโมเตอร์ (sense) (หมายเลข 1- 25 คือ โคลนของพลาสมิด pBI121 ที่น่าจะมี *PAP2* แทรกอยู่ซึ่งได้จากการสกัดพลาสมิด M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน)

จากการตัดโคลนหมายเลข 1-25 ปรากฏว่าได้ซันดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ โดยโคลนที่มีทิศทางการแทรกของซันดีเอ็นเออยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ได้แก่หมายเลข 8 โคลนที่มีทิศทางการแทรกของซันดีเอ็นเอกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์ได้แก่หมายเลข 6 และ 11 ส่วนโคลนหมายเลข 14 มีซันดีเอ็นเอมากกว่าที่คาดไว้ ซึ่งอาจเกิดจากการแทรกของซันดีเอ็นเอมากกว่า 1 ชิ้น ส่วนโคลนหมายเลขอื่นน่าจะเป็นเวกเตอร์เปล่า

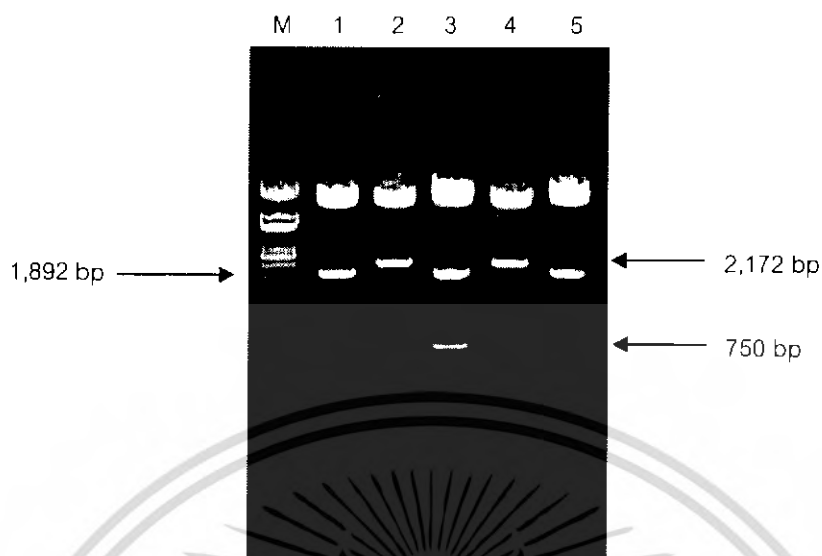
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลของ GenBank *PAP2* มีตำแหน่งการตัดจำเพาะของ *HindIII* ที่เบสลำดับที่ 235 ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ซึ่งมีขนาด 235 และ 515 คู่เบส เมื่อ *PAP2* แทรกอยู่ในพลาสมิด pHTT202 ถ้าตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว จะสามารถคัดเลือกพลาสมิดที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ หรือกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์ได้ โดย pHTT202 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,892 คู่เบส ดังรูปที่ 4.14 ก แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่กลับทิศทางกับโปรโมเตอร์เมื่อตัดแล้วจะได้ 2,172 คู่เบส ดังรูปที่ 4.14 ข



รูปที่ 4.14 ก และ ข แสดงทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นดีเอ็นเอ *PAP2* กับพลาสมิด pHTT202 และจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (รูป ก ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์(sense) และ ข ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแทรกกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์(antisense) (หมายเหตุ ; ลูกศรแทนโปรโมเตอร์ CaMV 35S))

การคัดเลือกพลาสมิด pHTT202 ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอ *PAP2* ที่แทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ (sense) โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ตรวจสอบโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ได้ผลเป็นดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 ผลการตัดพลาสมิด pHTT202 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ *PAP2* ด้วย *HindIII* เพื่อคัดเลือกพลาสมิด ที่มีทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ในทิศทางเดียวกันกับ โปรโมเตอร์ (sense) (หมายเลข 1- 5 คือ โคลนของพลาสมิด pHTT202 ที่น่าจะมี *PAP2* แทรกอยู่ซึ่งได้จากการสกัดพลาสมิด M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน)

จากการตัดโคลนหมายเลข 1-5 ปรากฏว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ โดยโคลนที่มีทิศทางการแทรกของชิ้นดีเอ็นเออยู่ในทิศทางเดียวกันกับ โปรโมเตอร์ได้แก่หมายเลข 1 และ 5 ส่วนโคลนที่มีทิศทางการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอกลับทิศทางกับ โปรโมเตอร์ได้แก่หมายเลข 2 และ 4 ส่วนโคลนหมายเลข 3 ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

4.3 การถ่ายโอนยีนเข้าสู่ *Agrobacterium*

การสร้างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุมเนื่องจากพลาสมิด pBI121+ *PAP1* ไม่สามารถตรวจสอบทิศทางของชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ใน พลาสมิด pBI121 จึงไม่นำมาถ่ายโอนพลาสมิดนี้เข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม แต่สำหรับ pBI121 + *PAP2* และ pHTT202 + *PAP2* สามารถตรวจสอบทิศทางแทรกของชิ้นดีเอ็นเออย่างถูกต้องได้ โดยแทรกในทิศทางเดียวกันกับ โปรโมเตอร์ และแทรกกลับทิศทางกับ โปรโมเตอร์ได้จึงได้ทำการถ่ายโอนพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมเพื่อสร้างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมที่มีชิ้นส่วนของยีน ควบคุมชนิดดังกล่าว ทั้งนี้ยังได้ทำการสร้างสายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุม *Myb-PI* และ *Myc-RP* (ได้รับมาจาก Chiba University; Japan) โดยยีนดังกล่าวเชื่อมต่อกับพลาสมิด pHTT202

เนื่องจากระบบการทำงานของพลาสมิด pBI121 และ pHTT202 มีความแตกต่างกัน โดย pBI121 มีระบบการทำงานเป็นแบบ binary vector และ pHTT202 มีระบบการทำงานเป็นแบบ cointegrate vector จึงต้องมีการเลือกใช้สายพันธุ์ของอะโครแบคทีเรียที่เหมาะสมกับระบบของเวกเตอร์ด้วย โดยการสร้างสายพันธุ์อะโครแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆมีการเลือกใช้สายพันธุ์อะโครแบคทีเรียดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 สายพันธุ์อะโครแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายโอนเวกเตอร์แต่ละชนิด

เวกเตอร์ที่ใช้ในการถ่ายโอน	สายพันธุ์อะโครแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายโอน
pBI121 + <i>PAP2</i> sense	LBA4404
pBI121 + <i>PAP2</i> antisense	LBA4404
pHTT202 + <i>PAP2</i> sense	C58C1 (pGV3850)
pHTT202 + <i>PAP2</i> antisense	C58C1 (pGV3850)
pHTT202 + <i>Myb-PI</i> sense	C58C1 (pGV3850)
pHTT202 + <i>Myb-PI</i> antisense	C58C1 (pGV3850)
pHTT202 + <i>Myc-RP</i> sense	C58C1 (pGV3850)

4.4 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโครแบคทีเรีย

4.4.1 การถ่ายโอนยีนโดยใช้อะโครแบคทีเรียเข้าสู่ต้นยาสูบ

ใช้เชื้ออะโครแบคทีเรียที่ได้สร้างขึ้นในข้อ 4.3.1 มาทำการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ต้นยาสูบโดยจุ่มใบยาสูบที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร ลงในสารละลายแขวนลอยของเชื้ออะโครแบคทีเรียเป็นเวลา 60 วินาที โดยทำการทดลองทั้งหมด ดังตาราง 4.2

ตาราง 4.2 จำนวนที่ทำการถ่ายโอนอะโครแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนยีนควบคุมชนิดต่างๆเข้าสู่ชิ้นใบยาสูบ

สายพันธุ์อะโครแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆ	จำนวนที่ทำการทดลอง
pBI121 + <i>PAP2</i> sense	50 ใบ
pBI121 + <i>PAP2</i> antisense	50 ใบ
pHTT202 + <i>PAP2</i> sense	50 ใบ
pHTT202 + <i>PAP2</i> antisense	50 ใบ
pHTT202 + <i>Myb</i> -P1 sense	50 ใบ
pHTT202 + <i>Myb</i> -P1 antisense	50 ใบ
pHTT202 + <i>Myc</i> -RP sense	50 ใบ

เลี้ยงชิ้นส่วนของใบที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 3 วัน ก่อนย้ายลงในอาหารสูตรเดียวกันที่มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลินเพื่อฆ่าอะโครแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะคานามัยซิน เพื่อคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีน หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้น ใบมีสีเขียว และมีราก ซึ่งคาดว่าจะเป็ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของ T-DNA ซึ่งมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะคานามัยซิน

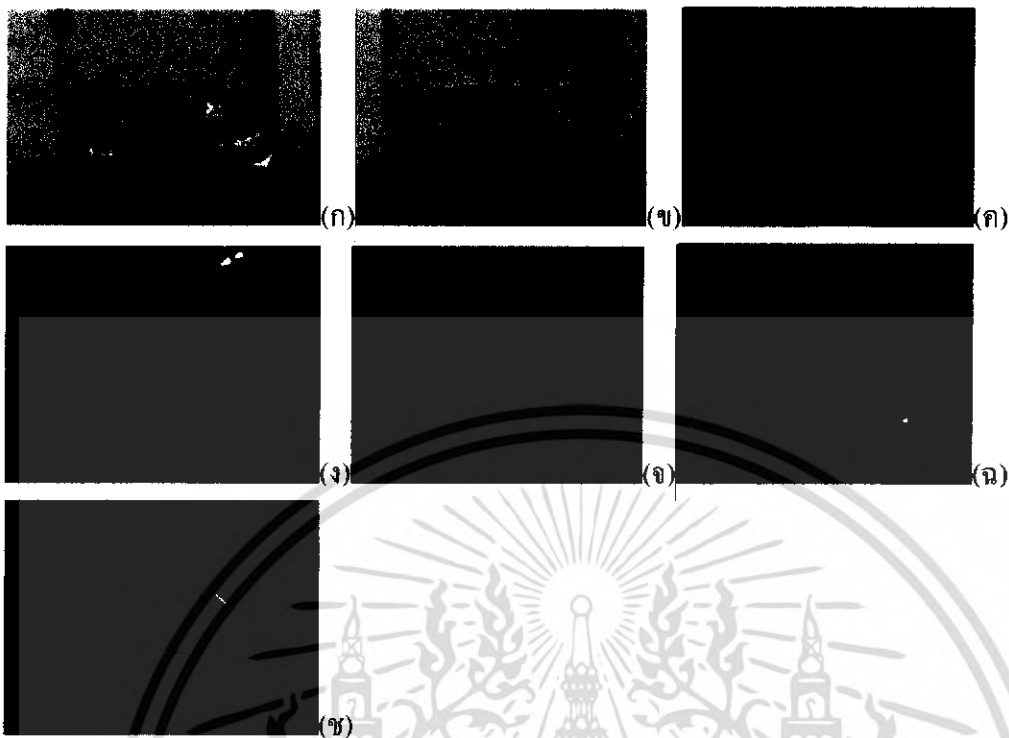
4.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน

โดยทำการนับจำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัส แล้วทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนของอะโครแบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 จำนวนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆ และสามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

สายพันธุ์อะโครแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆ	จำนวนใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้	ประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีน (เปอร์เซ็นต์)
pBI121 + <i>PAP2</i> sense	48 ใบ	96
pBI121 + <i>PAP2</i> antisense	47 ใบ	94
pHTT202 + <i>PAP2</i> sense	0 ใบ	0
pHTT202 + <i>PAP2</i> antisense	0 ใบ	0
pHTT202 + <i>Myb-PI</i> sense	0 ใบ	0
pHTT202 + <i>Myb-PI</i> antisense	0 ใบ	0
pHTT202 + <i>Myc-RP</i> sense	0 ใบ	0

การคัดเลือกใบเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนจะทำการคัดเลือกใบที่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ (ดังรูปที่ 4.16 ก-ข) ซึ่งเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ปกติ ซึ่งอาหารนี้มียาปฏิชีวนะคาร์เบนนิซิลินเพื่อฆ่าอะโครแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะคานามัยซิน แคลลัสจะสามารถเจริญไปเป็นยอดได้ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ซึ่งคาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีนได้



รูปที่ 4.16 ก-ข แสดงภาพเปรียบเทียบการพัฒนาไปเป็นแคลลัสของใบยาสูบ (รูป ก และ ข คือใบยาสูบที่ถูกถ่ายโอนด้วยอะโกรแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ pBI121 + *PAP2* sense และ antisense ตามลำดับ โดยแคลลัสมีอายุ 1 สัปดาห์, รูป ค และ ง คือใบยาสูบที่ถูกถ่ายโอนด้วย อะโกรแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ pHTT202 + *PAP2* sense และ antisense ตามลำดับ, รูป จ และ ฉ คือใบยาสูบที่ถูกถ่ายโอนด้วยอะโกรแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ pHTT202 + *Myb-PI* sense และ antisense ตามลำดับ และรูป ช คือใบยาสูบที่ถูกถ่ายโอนด้วย อะโกรแบคทีเรียที่มีเวกเตอร์ pHTT202 + *Myc-RP* sense) โดยรูป ก-ข ใบมีอายุ 2 เดือน ซึ่งไม่มีการพัฒนาไปเป็นแคลลัส

4.5 การคัดเลือกต้นพืชทดลองที่คาดว่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน

4.5.1 คัดเลือกพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์

การคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้น ใบมีสีเขียว และมีราก ซึ่งคาดว่าจะ เป็นต้นที่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของ T-DNA ซึ่งมีชิ้นส่วนทานยาปฏิชีวนะคานามัยซิน โดยทำการเลี้ยงต้นพืชในอาหารที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซินแล้วทำการคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์ ได้ผลกระทดลองดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 จำนวนของแคลลัสของยาสูบที่ได้รับการถ่ายโอนชิ้นส่วนยีนควบคุมที่สามารถเจริญเป็นยอดและเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้

สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีนควบคุมชนิดต่างๆ	จำนวนของยอดที่สามารถเจริญจากแคลลัสได้ (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนต้นพืชที่สมบูรณ์ (เปอร์เซ็นต์)
pBI121 + <i>PAP2</i> sense	117 (243.75)	59 (50.42)
pBI121 + <i>PAP2</i> antisense	126 (268.08)	37 (29.36)

ต้นพืชที่สามารถเจริญจากแคลลัสได้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ ต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์ คือ ส่วนของลำต้น ใบมีสีเขียว และมีราก ซึ่งคาดว่าจะเป็ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของ T-DNA ซึ่งมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะคานามัยซิน และต้นพืชที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ คือ ลำต้นและใบมีสีเหลืองหรือมีลักษณะใบใส ซึ่งคาดว่าจะเป็ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนส่วนของ T-DNA ดังรูปที่ 4.17 ก และ ข



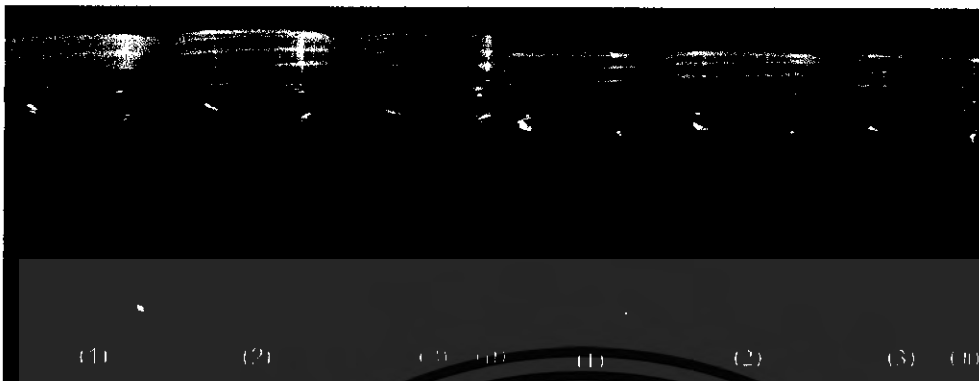
รูปที่ 4.17 ก และ ข แสดงภาพเปรียบเทียบต้นพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ โดยต้นพืชมีอายุ 2 เดือน (รูป ก คือภาพของต้นพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์ และ รูป ข คือภาพของต้นพืชทดลองที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์)

อย่างไรก็ตามต้นที่มีลักษณะสมบูรณ์อาจจะไม่ได้รับยีนควบคุมแต่ได้รับยีนต้านทานยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ซึ่งอาจเกิดจากการความผิดพลาดในการถ่ายโอนชิ้นส่วนของ T-DNA หรือต้นพืชอาจมี

กลไกบางอย่างในการทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอม ซึ่งอาจทำให้ชิ้นส่วนของยีนควบคุมหายไป ต้นพืชที่มีลักษณะสมบูรณ์จึงอาจไม่ได้รับยีนควบคุม ดังนั้นควรทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่อไป

4.5.2 ตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ

นำพืชทดลองที่มีลักษณะสมบูรณ์ และมีลักษณะใกล้เคียงกันนำมาทดสอบสภาวะเครียด คือ ทำการทดสอบสภาวะทนเค็ม และสภาวะแรงดันออสโมติก โดยทำการเลี้ยงต้นพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนใน 3 สภาวะ คือ สภาวะปกติเพื่อใช้เป็นต้นควบคุมโดยเลี้ยงในอาหาร MS ปกติ สภาวะทนเค็ม โดยเลี้ยงในอาหาร MS ที่มีการใส่โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ความเข้มข้น 150 mM และสภาวะแรงดันออสโมติกโดยเลี้ยงในอาหาร MS ที่ใส่แมนนิทอล (mannitol) ความเข้มข้น 0.3 M แล้วทำการเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน โดยทำการสังเกตลักษณะของต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ เปรียบเทียบต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์ผลปรากฏว่าต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์มีแนวโน้มที่จะสามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ดีกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกลับทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ ซึ่งลักษณะของต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์มีการเจริญของยอดเพิ่มมากขึ้นซึ่งมากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกลับทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ และต้นที่ได้รับสภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติกจะโทรมลงมากกว่าต้นที่ได้รับสภาวะเครียดจากความเค็มเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม (ดังรูปที่ 4.18 ก และ ข)



รูปที่ 4.18 ก และ ข แสดงภาพเปรียบเทียบลักษณะของต้นที่เจริญในอาหาร MS หลังได้รับสภาวะเครียด (รูป ก ต้นที่ได้รับการถ่ายโอนขึ้นในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ และรูป ข ได้รับการถ่ายโอนขึ้นกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์ โดย 1 เป็นต้นควบคุมที่เสี่ยงในอาหาร MS ปกติ 2 เป็นต้นที่เสี่ยงในอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ความเข้มข้น 150 mM และ 3 เป็นต้นที่เสี่ยงในอาหาร MS ที่มีแมนนิทอล (mannitol) ความเข้มข้น 0.3 M)

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การโคลนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

จากการโคลนยีนควบคุม ที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินจาก cDNA ของอะราบิโดปซิสโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ร่วมที่สามารถทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ครอบคลุมบริเวณ ORF ของยีน *PAP1* และยีน *PAP2* แล้วเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM เพื่อเพิ่มจำนวน และตรวจสอบโคลน พบว่าได้โคลนที่เป็น *PAP2* จำนวน 3 โคลน จากโคลนทั้งหมด 37 โคลน ได้ทำการคัดเลือกโคลนมา 5 โคลนจาก 34 โคลนที่คาดว่าจะจะเป็น *PAP1* หลังจากตรวจสอบ พบว่าได้โคลนที่เป็น *PAP1* ทั้งหมด

5.2 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ *Agrobacterium* expression vector

ได้โคลนของเวกเตอร์ pBI121 ที่มียีน *PAP2* แทรกอยู่ จำนวน 3 โคลน และโคลนของเวกเตอร์ pHTT202 ที่มียีน *PAP2* แทรกอยู่ จำนวน 4 โคลน เมื่อนำไปตรวจสอบทิศทางการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอ พบว่าได้โคลนของเวกเตอร์ pBI121 ที่มียีน *PAP2* เชื่อมต่อทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ จำนวน 1 โคลน และเชื่อมต่อกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์ จำนวน 2 โคลน ส่วนโคลนของเวกเตอร์ pHTT202 ที่มียีน *PAP2* เชื่อมต่อทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ จำนวน 2 โคลน และเชื่อมต่อกลับทิศทางกับ โปรโมเตอร์ จำนวน 2 โคลน

ได้โคลนของเวกเตอร์ pBI121 ที่มียีน *PAP1* แทรกอยู่ จำนวน 3 โคลน แต่ไม่สามารถตรวจสอบทิศทางการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอได้ ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุ 2 ประการ คือ เอนไซม์ *EcoT14I* ที่ใช้มีจุดจดจำเพียง 4 เบส คาดว่าเกิดการตัดภายในพลาสมิดที่ไม่ทราบจุดตัดที่แน่นอน จึงไม่สามารถคำนวณขนาดที่แน่นอนได้

5.3 การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

จากการศึกษาการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ยาสูบ โดยถ่ายโอน pBI121 ที่มี *PAP2* แทรกอยู่ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 ใบที่ได้รับการถ่ายโอนเวกเตอร์ pBI121 ที่มียีน *PAP2* เชื่อมต่อทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์จะมีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ 48 ใบ จากทั้งหมด 50 ใบ คิด

เป็น 96 เปอร์เซ็นต์ จากแคลลัสสามารถเจริญไปเป็นยอดได้ 117 ต้น โดยเจริญไปเป็นต้นพืชสมบูรณ์ทั้งหมด 59 ต้น คิดเป็น 50.43 เปอร์เซ็นต์ และเชื่อมต่อกลับทิศทางกับโปรโมเตอร์จะมีการเจริญไปเป็นแคลลัสได้ 47 ใบ จากทั้งหมด 50 ใบ คิดเป็น 94 เปอร์เซ็นต์ จากแคลลัสสามารถเจริญไปเป็นยอดได้ 126 ต้น โดยเจริญไปเป็นต้นพืชสมบูรณ์ทั้งหมด 37 ต้น คิดเป็น 29.37 เปอร์เซ็นต์ และการถ่ายโอน pHTT202 ที่มียีน *PAP2* ยีน *myb-pl* และยีน *myc-rp* แทรกอยู่ โดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ C58C1 พบว่าใบที่ทำการถ่ายโอนไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้เลย จะเห็นว่าประสิทธิภาพการถ่ายโอนของเวกเตอร์ pBI121 เข้าสู่ยาสูบโดยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ LBA4404 มีประสิทธิภาพดีกว่าการถ่ายโอนของเวกเตอร์ pHTT202 เข้าสู่ยาสูบโดยอะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ C58C1 และพลาสมิดที่มียีนเชื่อมต่อกับทิศทางเดียวกันกับ โปรโมเตอร์เมื่อทำการถ่ายโอนเข้าสู่ต้นยาสูบสามารถเจริญไปเป็นต้นพืชทดลองที่สมบูรณ์ได้มากกว่า พลาสมิดที่มียีนเชื่อมต่อกับทิศทางกับโปรโมเตอร์

5.4 ตรวจสอบการแสดงออกของพืชทดลองที่ได้รับการถ่ายโอนยีนควบคุมภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ

ต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์มีแนวโน้มที่จะสามารถทนต่อสภาวะเครียดได้ดีกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกลับทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ ซึ่งลักษณะของต้นพืชที่ได้รับการถ่ายโอนยีนในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์มีการเจริญของยอดเพิ่มมากขึ้นซึ่งมากกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีนกลับทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ และต้นที่ได้รับสภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติกจะโทรมลงมากกว่าต้นที่ได้รับสภาวะเครียดจากความเค็มเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุม

เอกสารอ้างอิง

- กนกพร สมพรไพหลิน. [ม.ป.ป.] บทปฏิบัติการวิชาพันธุวิศวกรรม. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กนกพร สมพรไพหลิน. [ม.ป.ป.] บทปฏิบัติการวิชาเทคโนโลยีชีวภาพของพืช. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กนกพร สมพรไพหลิน. 2545. ผลของชีวสังเคราะห์แอนโทไซยานินต่อการควบคุมสีในพืช. *วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง*. 10(1) : 23-27.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อ้อมบุญ สวรรค์รัตน์. [ม.ป.ป.] *การตรวจสอบพลีโวนอยด์*. กรุงเทพฯ : [ม.ป.ท.]
- Baudry, A., Heim, M. A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. and Lepiniec, L. 2004. *TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (39) : 366-380.
- Buchholz, G., Ehmann, B. and Wellmann, E. 1995. Ultraviolet light inhibition of phytochromeinduced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons (*Sinapis alba* L.). *Plant Physiol.* (108) : 277-234.
- Borevitz, J., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. and Lamb, C. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell.* (12) : 2383-2393.
- Caboche, M., Debeuejon, I., Jond, C., Lepiniec, L. and Nesi, N. 2000. The *TT8* gene encodes a basic-helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis siliques*. *Plant Cell.* (12) : 1863-1878.
- Chiristic, P. J., Alfenito, M. R. and Walbot, V. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenyl propanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta.* (194) : 541-549.
- Cormier, F., Crevier, H. A. and Do, C. B. 1989. Effect of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension. *Can. J. Bot.* (68) : 1822-1825.
- Cornish, E. and Holton, T. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell.* (7) : 1071-1083.

- Dong, Y.-H., Beuning, L., Davies, K., Mitra, D., Morris, B. and Kootstra, A. 1998. Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers. *Aust. J. Plant Physiol.* (25) : 245-252.
- Ithal, N. and Reddy, R. A. 2004. Rice flavonoid pathway genes, *OsDfr* and *OsAns*, are induced by dehydration, high salt and ABA, and contain stress responsive promoter elements that interact with the transcription activator, OsC1-MYB. *Plant Science.* (166) : 1505-1513.
- Kaliamoorthy, S. and Rao, A. S. 1994. Effect of salinity on anthocyanin accumulation in the root of maize. *Ind. J. Plant Physiol.* (37) : 169-170.
- Leyva, A., Jarillo, J. A., Salinas, J. and Martinez, Z. 1995. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* (108) : 39-46.
- Martin, C. and Ares, P. J. 1997. MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics.* 13(2) : 67-73.
- Mckown, R., Kuroki, G. and Warren, G. 1996. Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance. *J. Exp.Bot.* (47) : 1919-1925.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. and Nakamura, K. 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J.* (11) : 841-851.
- Mol, J., Jenkins, G., Schafer, E. and Weiss, D. 1996. Signal perception, transduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis. *Crit.Rev. Plant Sci.* (15) : 525-557.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R., and Smith, T.F. 1994. The ancient regulatory protein family of WD-repeat proteins. *Nature.* (371) : 297-300.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M. and Lepiniec, L. 2000. The *TT8* gene encodes a basic Helix-Loop-Helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis siliques*. *Plant Cell.* (12) : 1863-1878.
- Pierre Broun. 2005. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Biology.* (8) : 272-279.

- Ramanjulu, S., Veeranjaneyulu, K. and Sudhakar, C. 1993. Physiological changes induced by NaCl in *mulberry* var. *Mysore* local. *Ind. J. Plant Physiol.* (36) : 273-275.
- Reddy, R. A., Chaitanya, K. V. and Vivekanandan, M. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161(11) : 1189-1202.
- Sharley, W. B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, Biochemistry and biotechnology. *Plant physiology.* (126) : 485-493.
- Shichijo, C., Hamada, T., Hiraoka, M., Johnson, C. B. and Hashimoto, T. 1993. Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta.* (191) : 238-245.
- Sompompailin, K., Makita, Y., Yamazaki, M. and Saito, K. 2002. A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant Mol Biol.* (50) : 485-495.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. and Neer, E. J. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* (24) : 181-185.
- Tester, M. and Davenport, R. 2002. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany.* (91) : 503-527.
- Tholalabavi, A., Zwiabek, J. J. and Thorpe, R. A. 1994. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations, and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoids* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cell Dev. Biol.* (30) : 164-170.
- Tholalabavi, A., Zwiabek, J. J. and Thorpe, R. A. 1997. Osmotically-stressed poplar cell culture: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition. *J. Plant Physiol.* (151) : 489-496.
- Xiaoyan, D., Zwiabek, J. J. and Thorpe, T. A. 2001. Functional conversation of plant secondary metabolic enzyme revealed by complementation of *Arabidopsis* flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiol.* (127) : 46-57.

Yamazaki, M., Makita, Y., Springob, K. and Saito K. 2002. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochemical Engineering*. (14) : 191-197

<http://www.biochem.northwestern>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร LB (Luria-Bertani)

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

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YEB

Bacto beef extract	5	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	1	กรัม/ลิตร
Bacto peptone	5	กรัม/ลิตร
Sucrose	5	กรัม/ลิตร
MgSO ₄	2	มิลลิโมลาร์

ปรับพีเอชให้เป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2XYT

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

ปรับพีเอชเป็น 7.2

(หากเป็นอาหารแข็ง ให้เติม Agar 15 กรัม/ลิตร)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB

Bacto tryptone	2	กรัม/ลิตร
Bacto yeast extract	0.2	กรัม/ลิตร
NaCl	0.0585	กรัม/ลิตร
KCl	0.0186	กรัม/ลิตร
MgCl ₂	10	มิลลิโมลาร์
MgSO ₄	10	มิลลิโมลาร์

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOC

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SOB	1	ลิตร
กลูโคสเข้มข้น 2 โมลาร์	10	มิลลิลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. อาหารสูตร MS

ตารางที่ 6.1 แสดงการเตรียม stock ของอาหารสูตร MS

สูตรอาหาร MS	ชื่อสารเคมี	ความเข้มข้น (เท่า)	จำนวนที่ใช้ (มิลลิกรัม)ต่อลิตร
stock 1	NH_4NO_3	100x	165
	KNO_3		192
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		37
	KH_2PO_4		17
stock 2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100x	44
stock 3	H_3BO_3	1000x	3.1
	KI		0.415
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.125
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.0125
stock 4	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100x	2.23
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0.86
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.0025
stock 5	Na_2EDTA	100x	3.73
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		2.78
stock 6	Inositol	100x	5
	Nicotinic acid		0.025
	Pyridoxin HCl		0.025
	Thiamine HCl		0.005
	Glycine		0.1

7. อาหารสูตรชักนำแคลลัส

อาหารสูตร MS เต็ม	40	มก./ล.	Adenine
	0.5	ก./ล.	MES
	20	ก./ล.	Sucrose
	1.0	มก./ล.	BAP
	0.1	มก./ล.	IAA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทดลอง

1. การแยกดีเอ็นเอจากเจล (Amersham Biosciences Crop.)

- 1.1 ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว ตัดเจลส่วนที่มีชิ้นดีเอ็นเอนั้นใส่ในหลอด eppendorf
- 1.2 เติม capture buffer ลงในหลอดจากข้อ 1 ในอัตราส่วน capture buffer 10 ไมโครลิตรต่อเจลหนัก 10 มิลลิกรัม
- 1.3 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5-15 นาที จนกว่าเจลจะละลายหมด
- 1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบต่ำ เพื่อให้ของเหลวในหลอดตกลงมารวมกัน
- 1.5 ย้ายของเหลวในหลอด eppendorf ไปใส่ในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ (GFX column) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
- 1.6 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจะจับกับคอลัมน์
- 1.7 เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในจีเอฟเอกซ์คอลัมน์อันเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 1.8 ย้ายจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ใส่ในหลอด eppendorf หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำดีไอออไนซ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 20 ไมโครลิตร ลงไปในคอลัมน์ เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ติดกับคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
- 1.9 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ที่ใส่ในหลอด eppendorf ไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 1.10 นำจีเอฟเอกซ์คอลัมน์ออก จะได้สารละลายดีเอ็นเออยู่ในหลอด eppendorf

2. การทำคอมพิเทนที่เซลล์ (กนกพร, ม.ป.ป.)

- 2.1 ถ่ายเชื้อ *Escherichia coli* 1 โคลนลงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

- 2.2 ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ลงในอาหาร 2XYT ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ซึ่งมีแมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้เชื้อปริมาณเท่ากับ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 0.4-0.5
- 2.3 นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.4 เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- 2.5 วางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 2.6 เทส่วนใสทิ้ง แล้ววางหลอดบนน้ำแข็ง ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งโดยใช้ TFB buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
- 2.7 เติม DMSO 30 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันพอดี
- 2.8 แบ่งเซลล์แขวนลอยลงในหลอด eppendorf หลอดละ 200 ไมโครลิตร
- 2.9 เก็บเซลล์ที่ -70 องศาเซลเซียส

3. การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์โดยวิธี heat-shock และการคัดเลือกโคลน

- 3.1 การถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์
 - 3.1.1 นำคอมพีเทนท์เซลล์ซึ่งเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส มาละลายโดยวางบนน้ำแข็ง
 - 3.1.2 คูดคอมพีเทนท์เซลล์ที่ละลายแล้วปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ซึ่งแช่บนน้ำแข็ง แล้วเติม ligation solution และผสมให้เข้ากัน โดยการเปิดชั้นลงวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
 - 3.1.3 นำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
 - 3.1.4 เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 3.2 การคัดเลือกโคลนที่คาดว่าได้รับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, Co., Ltd.) ที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่
 - 3.2.1 เตรียมเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สเปกเซลล์แขวนลอยที่เหลือนบนเพลตที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

4. การสกัดพลาสมิด

- 4.1 ถ่ายยโอนโคโลนีเดี่ยวบนเพลตที่มีอาหาร LB ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน ลงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะคานามัยซิน (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
- 4.2 นำสารละลายแขวนลอยของเซลล์ ใส่หลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการเก็บเซลล์
- 4.3 เทส่วนอาหารทิ้ง เติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นวางหลอดบนน้ำแข็ง
- 4.4 เติม Solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 4.5 เติม Solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที
- 4.6 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
- 4.7 ย้ายของเหลวส่วนบนไปใส่หลอด eppendorf ใหม่ แล้วเติมเอทานอลที่เย็นจัดเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 4.8 นำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที
- 4.9 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 4.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
- 4.11 นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้ง
- 4.12 ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการคว่ำหลอดลงบนกระดาษทิชชูหรือใช้เคซิเคเตอร์
- 4.13 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งมี RNase เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 4.14 เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมเชื้อและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่อะโครแบคทีเรียโดยวิธี freeze-thaw

(กนกพร, ม.ป.ป.)

- 5.1 เลี้ยงเชื้ออะโครแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร YEB หรือ LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน
- 5.2 นำสารละลายเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาวางบนน้ำแข็ง 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 5.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
 - 5.4 เทส่วนบนทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาละลายในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บนน้ำแข็ง
 - 5.5 นำเซลล์แขวนลอยในแคลเซียมคลอไรด์มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendorf ใหม่และผสมเวกเตอร์ที่มีอินที่สนใจประมาณ 2 ไมโครกรัม โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ 2-3 ครั้ง บนน้ำแข็ง
 - 5.6 นำสารละลายนี้เข้าในไนโตรเจนเหลวจนเป็นน้ำแข็งแล้วนำมาบ่ม ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จากนั้นเติมอาหาร YEB 1 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เจาะที่ 200 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง
 - 5.7 นำสารละลายดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
 - 5.8 เทอาหารส่วนบนทิ้งไป ทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งด้วยอาหารสูตร YEB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
 - 5.9 สเปรดเซลล์บนอาหารแข็งสูตร YEB ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน
6. การศึกษาขั้นตอนการถ่ายโอนยีนเข้าสู่สตูบโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย (กนกพร, ม.ป.ป.)
- 6.1 เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียคิสอาร์มสายพันธุ์ LBA4404/pBI121 ที่มีอิน *NPTII* ซึ่งให้เอนไซม์นีโอไมซินฟอสโฟทรานส์เฟอเรส และอิน *GUS* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ที่รุนแรง (CaMV 35S) ในอาหารเหลวสูตร YEB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน นานข้ามคืน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เจาะที่ 250 รอบต่อนาที
 - 6.2 นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตรมาใส่ในอาหารเหลวสูตร YEB ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เจาะที่ 250 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรประมาณ 0.8
 - 6.3 นำเซลล์แขวนลอยที่ได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
 - 6.4 เทส่วนอาหารทิ้งไป แล้วทำให้เซลล์แขวนลอยอีกครั้งในสารละลายซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ Tween-80 0.5 เปอร์เซ็นต์
 - 6.5 นำใบยาสูบที่ปราศจากเชื้อมาทำให้เกิดบาดแผลโดยตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสและจุ่มในเซลล์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 6.4 เป็นเวลา 60 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 6.6 นำชิ้นส่วนของพืชดังกล่าววางบนเพลต ที่มีกระดาษทิชชูซึ่งปราศจากเชื้อ เพื่อกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียมส่วนเกินออก
- 6.7 วางชิ้นส่วนของพืชบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จากข้อ 3.2.2
- 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมงและมีมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน หลังจากบ่มเนื้อเชื้อประมาณ 2-3 วัน อะโกราแบคทีเรียมจะย้ายส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ตรงบริเวณรอยตัดของพืช และ T-DNA นี้จะเข้าไปรวมกับโครโมโซมพืช
- 6.9 ย้ายชิ้นส่วนพืชลงในอาหารชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ที่สามารถฆ่าอะโกราแบคทีเรียมได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยมีการให้แสง 16 ชั่วโมง และมีมืด 8 ชั่วโมงต่อวัน
- 6.10 ทำการย้ายชิ้นส่วนพืชบนอาหารใหม่ตามข้อ 6.9 ทุกๆ 2 สัปดาห์และคัดเลือктต้นที่คาดว่าจะได้รับยีน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ลำดับเบสของยีน

1. *Arabidopsis thaliana* Production of Anthocyanin Pigment 1 protein (PAP1) gene

ขนาด 747 bp

```
1 atggaggggt cgtccaaagg gctgcgaaaa ggtgcttggc ctactgaaga agatagtctc
61 ttgagacagt gcattaataa gtatggagaa ggcaaatggc accaagtcc tgtaagagct
121 gggctaaaac ggtgcaggaa aagttgtaga ttaagatggg tgaactatct gaagccaagt
181 atcaagagag gaaaacttag ctctgatgaa gtcgatcttc ttcttcgcct tcatagcctt
241 ctagggaata ggtggtcttt aattgctgga agattacctg gtcggaccgc aaatgacgtc
301 aagaattact ggaacactca tctgagtaag aaacatgaac cgtggtgtaa gataaagatg
361 aaaagagag acattacgcc cattcctaca acaccggcac taaaaaaca tgtttataag
421 cctcgacctc gatcctccac agttaacaac gactgcaacc atctcaatgc ccaccaaaa
481 gttgacgtta atcctccatg ccttggactt aacatcaata atggttgatg caatagtatc
541 atatacaaca aagataagaa gaaagaccaa ctagtgaata atttgattga tggagataat
601 atgtggttag agaaattcct agaggaaagc caagaggtag atatcttggg tcctgaagcg
661 acgacaacag aaaaggggga caccttggct ttgacggtg atcaactttg gagtcttttc
721 gatggagaga ctgtgaaatt tgattag
```

2. *Arabidopsis thaliana* Production of Anthocyanin Pigment 2 protein (PAP2) gene

ขนาด 750 bp

```
1 atggaggggt cgtccaaagg gttgaggaaa ggtgcatgga ctgctgaaga agatagtctc
61 ttgaggtctat gtattgataa gtatggagaa ggcaaatggc atcaagtcc ttgagagct
121 gggctaaate gatgcagaaa gattgtgaga ctaagatggg tgaactatct gaagccaagt
181 atcaagagag gaagacttag caatgatgaa gttgatcttc ttcttcgcct tcataagctt
241 ctaggaaata ggtggtcctc gattgctggt cgattgcctg gtcggaccgc taatgatgtc
301 aaaaattact ggaacaccca tctgagtaaa aaacatgagt cttcgtgttg taagtctaaa
361 atgaaaaaga aaaacattat ttccctcctt adaacaccgg tccaaaaat cgggtgtttt
421 aagcctcgac ctcgatcctt ctctgtaaac aatggttgca gccatctcaa tggctgcca
481 gaagttgatt taattccttc atgcttggc ctcaagaaaa ataatgtttg tgaaaatagt
541 atccatgta acaaagatga tgagaaagat gatcttctga ataatcctaa gaatggagat
601 aatattgtgg tggagaattt actgggggaa aaccaagaag ctgatgcgat tgttcctgaa
661 gcgacgacag ctgaacatgg ggccactttg gggtttgacg ttgagcaact ttggagtctg
721 tttgatggag agactggtga acttgattag
```